

Alexandre Leme Godoy dos Santos

**Papel do polimorfismo genético na expressão das
metaloproteases na tendinopatia primária
do tendão tibial posterior**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Rames Mattar Junior

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Godoy-Santos, Alexandre Leme

Papel do polimorfismo genético na expressão das metaloproteases na tendinopatia primária do tendão tibial posterior / Alexandre Leme Godoy dos Santos. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Rames Mattar Junior.

Descritores: 1.Tendinopatia 2.Disfunção do tendão tibial posterior
3.Metaloproteases 4.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-400/11

DEDICATÓRIA

A minha irmã Maria Cristina, exemplo de dedicação à vida acadêmica.

Ao meu avó Hugo de Almeida Leme, exemplo de homem, de pai e de Professor.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que participaram desse estudo e contribuíram para o avanço da ciência nessa área do conhecimento médico.

Ao Professor Rames Mattar Junior, por sua brilhante ajuda e pelo apoio no desenvolvimento desse projeto.

Aos Professores Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, Olavo Pires de Camargo e Gilberto Luís Camanho pelas oportunidades e pelo estímulo contínuo ao meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Professor Arnaldo Valdir Zumiotti por seu exemplo pessoal, pelo incentivo a minha pós-graduação e pelo convívio enriquecedor.

Ao Professor Túlio Diniz Fernandes pela expressiva contribuição para minha formação pessoal e profissional.

Ao Doutor Jorge dos Santos Silva, pelo apoio e estímulo constantes.

Ao Doutor Marcos Hideyo Sakaki, pelas importantes oportunidades.

Ao Doutor Marcos de Andrade Corsato, pela contribuição ao meu crescimento pessoal.

Ao Doutor Rafael Trevisan Ortiz por seu entusiasmo e pelo exemplo de dedicação ao Instituto de Ortopedia e Traumatologia da USP.

Aos meus pais Walter e Edna Maria por seu carinho, suporte e dedicação aos 5 filhos, pelo exemplo, educação e valores, que hoje pautam as nossas vidas; pela sabedoria de nos dar aquilo que precisávamos e não aquilo que queríamos.

Aos meus irmãos Rafael, Walter e Fernando pelas alegrias e pelo orgulho que dão a nossa família.

A minhas avós Aglaé e Angelina, mulheres elegantes, atuantes em suas profissões; avós carinhosas e atentas, que influenciaram de forma marcante a minha vida.

A minha querida Flávia, por sua presença em todos os momentos.

Lista de Abreviaturas

CAPPESQ.	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
COL5A1.	collagen type V alpha 1
DNA.	deoxyribonucleic acid
EDTA.	quelante ethylenediaminetetraacetic acid
et. al.	e outros
FMUSP.	Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo
<i>GDF-5.</i>	growth differentiation factor 5
GT.	guanina-timina
<i>MMPs.</i>	metaloproteases
<i>MMP-1.</i>	metaloprotease tipo 1
<i>MMP-3.</i>	metaloprotease tipo 3
<i>MMP-8.</i>	metaloprotease tipo 8
<i>MMP-9.</i>	metaloprotease tipo 9
<i>MMP-13.</i>	metaloprotease tipo 13
ON.	overnight
<i>PCR.</i>	Polimerase Chain Reaction
<i>RFLP.</i>	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNPs.	Single Nucleotide Polymorphisms
TBE.	Solução tampão Tris/Borato/EDTA
<i>TGF-β1.</i>	transforming growth factor beta
TE.	solução de Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8) e 1 mM EDTA
TNE.	solução de 10 MM Tris pH 8, 150 MM NaCl e 2 mM EDTA
TNC.	tenascin C
UFPR	Universidade Federal do Paraná
USP	Universidade de São Paulo

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1: Critérios de não inclusão.....	21
Tabela 2: Informações sobre condições da técnica de <i>PCR</i> e de <i>RFLP</i>	23
Tabela 3: Média de idade e distribuição por faixa de IMC da amostra nos grupos de estudo.	26
Tabela 4: Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo -1607 do gene da MMP-1.....	29
Tabela 5: Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo -1612 do gene da MMP-3.....	31
Tabela 6: Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo -799 do gene da MMP-8.....	33
Quadro 1: Estágios da insuficiência do tendão tibial posterior.....	43

Lista de Figuras

Figura 1: Genótipos da MMP-1 (-1607).....	28
Figura 2: Genótipos da MMP-3 (-1612).....	30
Figura 3: Genótipos da MMP-8 (-799).....	32

RESUMO

Godoy-Santos AL. *Papel do polimorfismo genético dos genes que expressam as metaloproteases na tendinopatia primária do tendão tibial posterior* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Este trabalho investiga a influência de polimorfismos na região promotora do gene das metaloproteases 1, 3 e 8 na fisiopatogenia da insuficiência primária do tendão tibial posterior. A amostra de 150 pacientes selecionados é dividida em grupo-teste: 50 pacientes com diagnóstico clínico e anatomopatológico de tendinopatia do tendão tibial posterior e grupo-controle: 100 pacientes com tendão tibial posterior íntegro. O DNA dos voluntários é obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal mediante a extração com acetato de amônia. As técnicas de PCR e RFLP são utilizadas para análise dos genótipos. A análise estatística dos resultados é realizada pelo teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%. Os resultados mostram que os polimorfismos -1607 da MMP-1 e -799 da MMP-8 estão relacionados com risco maior para tendinopatia primária do tendão tibial posterior, enquanto o polimorfismo -1612 da MMP-3 parece não influenciar essa tendinopatia.

DESCRITORES: 1.Tendinopatia 2.Tendão tibial posterior 3.Metaloprotease 4. Polimorfismo genético

SUMMARY

Godoy-Santos AL. *Role of genetic polymorphism of the genes that express the metalloprotease in tendinopathy primary posterior tibial tendon* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

The aim of this study was to investigate the influence of polymorphisms in the promoter region of the gene of metalloproteinases 1, 3 and 8 in physiopatology of primary posterior tibial tendon insufficiency. The sample of 150 selected patients was divided into test group: 50 patients undergoing surgical procedures and pathological diagnosis of degenerative lesions of the posterior tibial tendon, and control group: 100 patients with posterior tibial tendon intact and no signs of degeneration. The DNA of the volunteers was obtained from oral mucosa epithelial cells, by extraction with ammonium acetate. PCR and RFLP were used for analysis of genotypes. Statistical analysis of results was performed by Chi-squared test with significance level of 5%. The results show that polymorphisms -1607 of MMP-1 and -799 of the MMP-8 are associated with increased risk for primary tendinopathy of the posterior tibial tendon, while the -1612 polymorphism of MMP-3 does not influence this tendinopathy.

DESCRIPTORS: 1.Tendinopathy 2. Tibial posterior tendon 3.Metalloprotease 4. Genetic polymorphism

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	6
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Metaloproteases da Matriz.....	9
3.1.1 MMP-1.....	11
3.1.2 MMP-3.....	12
3.1.3 MMP-8.....	13
3.2 Polimorfismo Genético e Metaloproteases.....	15
3.3 Polimorfismo Genético e Tendinopatias.....	17
4 MÉTODOS.....	19
4.1 Obtenção de DNA.....	21
4.2 Extração de DNA.....	22
4.3 Técnica de Polimerase Chain Reaction.....	22
4.4 Determinação do Genótipo.....	23
4.5 Eletroforese.....	24
4.6 Análise Estatística dos Resultados.....	24
4.7 Análise da Amostra.....	24
5 RESULTADOS.....	27
5.1 MMP-1.....	28
5.2 MMP-3.....	29
5.3 MMP-8.....	31
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÕES.....	40
8 ANEXOS.....	42
9 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

O músculo tibial posterior tem origem proximal na região posterior da tibia, fibula e membrana interóssea, sendo ele o mais profundo do compartimento posterior da perna. O tendão tibial posterior emerge da porção medial do músculo no terço médio da perna e recebe fibras até atingir o túnel osteofibroso na região posterior do maléolo medial, onde se apresenta anterior ao tendão flexor longo dos dedos, ao feixe neurovascular tibial posterior e ao tendão flexor longo do hálux. Ele passa sob o ligamento deltoide no tornozelo e plantar ao ligamento calcaneonavicular no retropé, para se inserir nas porções medial e plantar da tuberosidade do navicular e da cunha medial, com expansões para as cunhas intermédia e lateral e para as bases do segundo ao quarto metatarsos (Sarrafian, 1983).

O tendão tibial posterior é o inversor primário do retropé e do complexo articular subtalar, no início do despreendimento do pé do solo, durante a fase de apoio do ciclo da marcha. Participa ainda da flexão plantar do tornozelo, é o antagonista primário dos tendões fibulares e o estabilizador dinâmico do arco longitudinal medial do pé (Mann, 1993).

A insuficiência do tendão tibial posterior é reconhecida como principal etiologia do pé plano adquirido do adulto, causando significativa perda funcional, dor e osteoartrose secundária das articulações do retropé. O maior entendimento desta condição, durante os últimos 25 anos, resulta do aumento expressivo dos estudos focados nas ciências básicas e no conhecimento da fisiopatogenia dessa síndrome clínica (Pomeroy *et. al.*, 1999).

A primeira publicação a respeito dessa doença é do autor norte-americano Kulowski, que, em 1936, descreve a tenossinovite do tendão tibial posterior.

Vinte anos mais tarde, Fowler (1955) publica uma série de casos submetidos a tratamento cirúrgico, seguido de Williams (1963) e Kettelkamp e Alexander (1969), com resultados funcionais limitados.

Nas décadas seguintes, novas ferramentas para diagnóstico precoce, protocolos de tratamento e técnicas cirúrgicas são desenvolvidas (Jahss, 1982; Mann, 1982; Johnson, 1983, 1989). Porém, algumas questões a cerca da fisiopatogenia e do tratamento da tendinopatia primária do tendão tibial posterior permanecem, ainda, não solucionadas.

A insuficiência do tendão tibial posterior é três vezes mais frequente no gênero feminino, a média de idade para início dos sintomas é 40 anos, apresentando pico de incidência aos 55 anos, é mais comum em caucasianas, obesas e hipertensas (Deland *et. al.*, 2005). O único estudo de prevalência publicado na literatura mostra índice de 3,3% na população feminina inglesa (Kohls-Gatzoulis *et. al.*, 2009).

Diversos fatores etiológicos são propostos para explicar a síndrome: a presença de pé plano congênito (Kettelkamp; Alexander 1969, Dyal *et. al.*, 1978; Jahss, 1982; Mann, 1982; Johnson 1983, 1989; Funk *et. al.*, 1986), o impacto no túnel osteofibroso (Jahss, 1991), a presença do osso navicular acessório (Kidner, 1933), a região hipovascular do tendão (Frey *et. al.*, 1990, Holmes; Mann, 1992) e a demanda mecânica aumentada (Pomeroy *et. al.*, 1999).

Investigações bioquímicas revelam que o tendão tibial posterior é caracteristicamente composto por mais de 95% de fibras de colágeno tipo I e quantidades relativamente pequenas de fibras de colágeno tipos III, IV e V (Gonçalves *et. al.*, 2002; Satomi *et. al.*, 2008).

Collins e Raleigh (2009) revelam que características individuais podem predispor a lesões do aparelho locomotor, sugerindo que fatores intrínsecos do paciente desempenham papel etiológico importante.

Desde que a diferenciação e função das células são dependentes de mediadores inflamatórios, torna-se importante estudar os fatores genéticos que determinam a expressão desses elementos biológicos, dentre eles, as metaloproteases da matriz (MMPs). Estas desempenham papel fundamental na destruição tecidual e podem exercer função significativa na patogênese das tendinopatias.

As alterações genéticas mais estudadas são nos genes que expressam as enzimas tenascina-C (*TNC*), fator transformador de crescimento beta 1 (*TGF- β 1*), fator 5 de diferenciação de crescimento (*GDF-5*), colágeno tipo V e metaloproteases 2, 3 e 8 (Mokone *et. al.*, 2006; September *et. al.*, 2007, 2009; Magra; Maffulli, 2008; Skittone *et. al.*, 2008; Taylor *et. al.*, 2009; Posthumus *et. al.*, 2009; Posthumus *et. al.*, 2010; Scott; Khan, 2010).

Uma vez que as MMP-1, MMP-3 e MMP-8 são capazes de modificar uma grande quantidade de proteínas extracelulares e gerar degradação e remodelação de tecidos lesados, o estudo dos genes que expressam essas metaloproteases pode ser importante para melhor compreensão do processo de degeneração tendinosa.

A determinação desses padrões genéticos, em pacientes com tendinopatias primárias do tendão tibial posterior, possibilita a identificação de indivíduos com maior risco de desenvolver essa doença, bem como aqueles suscetíveis à falha na regeneração.

Dessa forma, marcadores genéticos podem ser identificados, contribuindo para elaboração de estratégias de prevenção e terapêutica individualizadas, visando modular os marcadores genéticos e aumentar a taxa de sucesso dos tratamentos.

2 OBJETIVO

Investigar a influência dos polimorfismos funcionais nas regiões promotoras dos genes da MMP-1(-1612), MMP-3 (-1612) e MMP-8 (-799) na fisiopatogenia da degeneração primária do tendão tibial posterior.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Degenerações dos tendões são comuns e constituem problema frequente na prática médica. Alguns tendões são particularmente vulneráveis e usualmente apresentam alteração degenerativa primária, como o patelar, o calcâneo, os do manguito rotador, o do bíceps do braço, o tibial posterior e os fibulares (Riley, 2004).

Avanços significativos dos estudos histopatológicos e das técnicas de investigação por imagem contribuem para o melhor entendimento da fisiopatogenia das degenerações tendíneas (James *et. al.*, 1978; Johnson *et. al.*, 1983; Satomi *et. al.*, 2008). Entretanto, os conhecimentos dos fatores mecânicos, vasculares e neurológicos apresentam alcance limitado na explicação etiológica de muitos casos (Rolf; Movin, 1997; McLauchlan; Handoll, 2001; Riley, 2004).

Características individuais podem influenciar o desenvolvimento de tendinopatias, entre elas, a herança genética (Mokone *et. al.*, 2005). Assim, parece existir um grupo de indivíduos com carga genética que lhes confere maior suscetibilidade para desenvolver doenças do tendão (Posthumus *et. al.*, 2009a; Collins; Raleigh, 2009).

3.1 Metaloproteases da Matriz

Elas são um grupo de enzimas endopeptidases que têm capacidade de degradar praticamente toda a matriz extracelular, membrana basal e seus componentes (Birkedal-Hansen *et. al.*, 1993).

As MMPs são secretadas na forma de zimógeno e como um complexo enzima-inibidor (Stricklin *et. al.*, 1983; Emonard; Grimaud, 1990). Sua ativação ocorre em duas etapas:

Inicialmente, o zimógeno sofre clivagem proteolítica, que resulta na remoção da porção amino-terminal. A clivagem pode ser feita por várias enzimas, como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase.

Na segunda etapa, a enzima sofre autodigestão, que resulta na sua forma ativada. Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o aminoácido cisteína e o íon zinco, que bloqueia o sítio ativo da molécula (Van Wart; Birkedal-Hansen, 1990).

Outra característica comum entre as MMPs é a dependência dos íons zinco e cálcio. A interação do zinco com três resíduos de histidina, presentes no domínio catalítico da molécula, é imprescindível para o funcionamento adequado das MMPs (Hadler-Oslen *et. al.*, 2011). Os dois átomos de cálcio conferem estabilidade à estrutura terciária da proteína (Dioszegi *et. al.*, 1995).

O grupo das MMPs em humanos é composto por 24 tipos e apresentam similaridades estruturais e funcionais. Para ser classificada como uma metaloprotease, a proteína deve ter, pelo menos, um pró-domínio e um domínio catalítico, ligado a um sítio de zinco. Adicionalmente, as MMPs possuem regiões ricas em prolinas e um domínio C-terminal hemopexin (Hadler-Oslen *et. al.*, 2011). Todas elas possuem um arranjo gênico similar, sugerindo que foram duplicadas de um gene ancestral comum.

Dos genes das MMPs humanas, oito estão no cromossomo 11, entre elas: MMP-1, 3 e 8. Outros genes que as sintetizam estão distribuídos entre os cromossomos 1, 8, 12, 14, 16, 20 e 22 (Shapiro, 1998).

As metaloproteases desempenham papel relevante em vários processos de remodelação fisiológica, como no desenvolvimento embrionário, na involução uterina pós-parto, remodelação óssea e cicatrização de feridas (Woessner, 1991).

Alterações nas atividades das MMPs são relatadas em diversos processos patológicos, como na inflamação por meio da migração leucocitária (Knauper *et al.*, 1993), destruição de cartilagem e osso na artrite reumatóide (Ye *et al.*, 2007), infarto agudo do miocárdio (Koh *et al.*, 2007), osteoartrite (Barlas *et al.*, 2008), colite (Madisch *et al.*, 2011), fibrilação atrial persistente (Lombardi *et al.*, 2011), no crescimento e expansão de tumores benignos e metástases (Basset *et al.*, 1997, Johnsen *et al.*, 1998; Egeblad; Werb, 2002), nas neoplasias primárias (Zhou *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011), na surdez (Nam *et al.*, 2011), na doença periodontal (Souza *et al.*, 2003) e na reabsorção óssea (Okada *et al.*, 1995).

3.1.1 MMP-1

Também chamada de collagenase-1, a MMP-1 apresenta um proeminente papel na degradação específica do colágeno tipo I, o maior componente da matriz extracelular, bem como outros tipos de colágenos: II, III, V, IX (Ziober *et al.*, 2000; Kerkela; Saarialho Kere, 2003) e o colágeno tipo X em pH neutro (Vincenti *et al.*, 1996). Como eles são os mais abundantes componentes da matriz extracelular, a MMP-1 é crítica para a degradação e remodelagem dos tecidos (Vincenti *et al.*, 1996).

Ela é expressa em uma ampla variedade de células normais, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, condrócitos,

osteoblastos e osteoclastos e em várias células tumorais (Brinckerhoff *et. al.*, 2000). Em condições fisiológicas normais, a MMP-1 é expressa em baixos níveis (Birkedal-Hanssen *et. al.* 1993), no entanto, sua expressão pode aumentar significativamente em condições patológicas.

O aumento da expressão de MMP-1 é associado a um prognóstico reservado em vários tipos de neoplasias, como: câncer colorretal (Woo *et. al.*, 2007), câncer de bexiga (Tasci *et. al.*, 2008), carcinoma oral (Shimizu *et. al.*, 2008; Nishizawa *et. al.*, 2007), carcinoma de nasofaringe (Nasr *et. al.*, 2007) e também em outros processos patológicos, como: doença arterial coronariana (Horne *et. al.*, 2008), doença arterial obstrutiva periférica (Flex *et. al.*, 2007) e soltura precoce de prótese do quadril. (Godoy-Santos *et. al.*, 2009).

3.1.2 MMP-3

Também chamada de estromelina-1, a MMP-3 é capaz de degradar colágeno tipos II, IV e IX, elastina, proteoglicanos e fibronectina, entre outras proteínas extracelulares, além de ativar outras MMPs (Birkedal-Hansen *et. al.*, 1993). Essa estromelina está associada à cicatrização de feridas (Di Colandrea *et. al.*, 1998, Bullard *et. al.*, 1999) e, em conjunto com outras MMPs, é amplamente expressa na lesão aterosclerótica (Henney *et. al.*, 1991).

A metaloprotease 3 também está associada a infarto do miocárdio (Siminelakis *et. al.*, 2009; Ghaderian *et. al.*, 2010), risco de estenose da artéria coronária (Fallah *et. al.*, 2010), obesidade (Sookoian *et. al.*, 2005), doença vascular do sistema nervoso central (doença de Moyamoya) (Li *et. al.*, 2010), úlcera duodenal

(Yeh *et. al.*, 2010), desenvolvimento de aneurisma (Newman *et. al.*, 1994, Knox *et. al.*, 1997), carcinoma epidermóide e fibrose submucosa oral (Chaudhary *et. al.*, 2010).

Essa enzima é produzida por vários tipos de células, como: fibroblastos, células musculares lisas, macrófagos, células sinoviais e condrócitos (Constantin *et. al.*, 2002), mas também pode ser observada nas lesões marginais de processos invasivos (Kusukawa *et. al.*, 1995) e em células epiteliais durante o processo de reparação tecidual (Madlener *et. al.*, 1998).

A expressão da MMP-3 é primariamente regulada no nível da transcrição, onde o promotor do gene responde a vários estímulos, incluindo fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumor e oncogenes, entre outros (Buttice *et. al.*, 1991). Sua expressão também pode ser induzida em resposta às condições locais, como a carga mecânica (Leong *et. al.*, 2010) e inflamação (Ito *et. al.*, 1996). Sua produção é de extrema importância para a ativação da cascata latente de pró-MMPs, como a pró-MMP-1, 8, 9, e 13 (Kahari; Saarialho-Kere, 1999).

3.1.3 MMP-8

A MMP-8, também conhecida como collagenase-2, foi anteriormente descoberta como sendo um produto exclusivo de neutrófilos, mas, subsequentemente, mostrou ser expressa por uma variedade de outros tipos de células, como: as endoteliais, musculares lisas, macrófagos, polimorfonucleares, fibroblastos gengivais, queratinócitos, condrócitos e odontoblastos (Cole *et. al.*, 1996; Palosaari *et. al.*, 2000; Herman *et. al.*, 2001; Prikk *et. al.*, 2001; Wahlgren *et.*

al., 2001; Pirilä *et. al.*, 2003), bem como células de neoplasia bucal (Moilanen *et. al.*, 2002).

Potencialmente, a MMP-8 degrada colágeno tipo I, contribuindo para degradação e remodelação tecidual (Galis *et. al.*, 1994) e alguns componentes fora da matriz, como a angiotensina I (Laxton *et. al.*, 2009). Ela é um importante mediador de destruição em diversas doenças inflamatórias e está relacionada a doenças cardiovasculares (Herman *et. al.*, 2001), arteriosclerose (Laxton *et. al.*, 2009), bronquiectasia (Lee *et. al.*, 2007), insuficiência pulmonar (Roderfeld *et. al.*, 2009), periodontite (Chen *et. al.*, 2000), melanomas (Vihinen *et. al.*, 2008), neoplasias do sistema nervoso central (Köhrmann *et. al.*, 2009) e cicatrização em diabéticos (Kumar *et. al.*, 2006).

Gutiérrez-Fernández *et. al.* (2008) demonstraram que ratos que não produzem MMP-8 apresentam um atraso significativo na cicatrização de feridas e alteração na resposta inflamatória, com atraso da infiltração neutrofílica inicial e persistência do processo inflamatório em momentos posteriores. Estas alterações são acompanhadas por outras na sinalização via *TGF-β1*. Além disso, os autores verificaram que esses ratos tiveram um aumento significativo na expressão de MMP-9, sugerindo que as metaloproteases poderiam agir coordenadamente no processo.

3.2 Polimorfismo Genético e Metaloproteases

Polimorfismos são pequenas variações genéticas nas quais um ou mais alelos têm frequência gênica maior que 1% (Thompson *et. al.*, 1991). Aproximadamente 90% dos polimorfismos de DNA são polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs-Single Nucleotide Polymorphisms*), devido a uma troca ou inserção/deleção de uma única base (Ra; Park, 2007). Embora os polimorfismos de DNA, em sua maioria, sejam funcionalmente neutros, uma parte deles pode exercer efeito alelo específico na regulação da expressão gênica ou função das proteínas codificadas e, assim, tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada doença (Ye, 2000). Polimorfismos em região promotora podem influenciar a regulação transcricional de proteínas, como as metaloproteases (Cargill *et. al.*, 1999).

Polimorfismos em genes que expressam metaloproteases são associados com muitas doenças, dentre elas: cirrose hepática (Hung *et. al.*, 2009), fibrilação atrial (Gai *et. al.*, 2009), glaucoma (Cong *et. al.*, 2009), esclerose múltipla (Fernandes *et. al.*, 2009), infarto do miocárdio (Román-García *et. al.*, 2009) e mudanças na mineralização dentária (Souza *et. al.*, 2003).

O nível de expressão das MMPs pode ser influenciado por diferentes polimorfismos na região promotora. O gene da MMP-1 está localizado no cromossomo 11 (11q22.3); uma inserção/deleção de uma guanina na posição -1607 do gene da MMP-1 cria dois alelos diferentes: um com uma única guanina (1G) e outro com duas (2G) (Rutter *et. al.*, 1998). Rutter *et. al.* (2009) indicam que este é um polimorfismo funcional.

O mesmo autor demonstra que em fibroblastos normais e células de melanoma, o alelo 2G liga quantidades substancialmente maiores de fator de transcrição recombinante Ets-1 e tem atividade significativamente maior do que o promotor com o alelo 1G (Rutter *et. al.*, 1998). Este polimorfismo é associado à suscetibilidade para diversas doenças e alterações fisiológicas, como neoplasias (Ye, 2000; Cao; Li, 2006; Nishizawa *et. al.*, 2007; Tasci *et. al.*, 2007; Woo *et. al.*, 2007; Chaudhary *et. al.*, 2010; Altas *et. al.*, 2010; Liu *et. al.*, 2011), doença degenerativa do disco intervertebral (Song *et. al.*, 2008), tuberculose endobrônquica (Kuo *et. al.*, 2008), artrite reumatoide (Massarotti *et. al.*, 2002), arteriosclerose (Orbe *et. al.*, 2003), surdez súbita (Nam *et. al.*, 2011), glioblastoma multiforme (Malik *et. al.*, 2011), periodontite (Souza *et. al.*, 2003), falha na osseointegração de implantes (Santos *et. al.*, 2004; Leite *et. al.*, 2008), doença coronária (Drzewoski *et. al.*, 2008) e fibrose pulmonar (Wang *et. al.*, 2010).

O promotor do gene da MMP-3, localizado no cromossomo 11 (11q22.3), apresenta um polimorfismo na posição -1612 (Ye *et. al.*, 1995), o qual mostra uma variação na sequência de adenina no sítio inicial de transcrição. Após uma sequência de cinco adeninas, pode haver adição de mais uma, resultando no alelo 5A e 6A. O primeiro parece aumentar a atividade e transcrição da MMP-3 e segundo diminuir (Ye *et. al.*, 1996).

Esse polimorfismo é associado à artrite reumatoide (Scherer *et. al.*, 2010), degeneração de disco lombar (Yuan *et. al.*, 2010), infarto do miocárdio (Terashima *et. al.*, 1999), doenças cardiovasculares (Ye *et. al.*, 2006; Ozkok *et. al.*, 2008; Chen *et. al.*, 2009), progressão da doença arterial coronariana (Beyzade *et. al.*, 2003, Hirashiki *et. al.*, 2003), aneurisma do sistema nervoso central (YOON *et. al.*, 1999),

neoplasias (Bramhall *et. al.*, 1997; Zinzindohoué *et. al.*, 2005; Vairaktaris *et. al.*, 2007; Srivastava *et. al.*, 2010), hipertensão arterial sistêmica (Djurić *et. al.*, 2005), doença periodontal (Astolfi *et. al.*, 2006), doença pulmonar (Santus *et. al.*, 2009), miopia (Hall *et. al.*, 2009), enxaqueca (Kara *et. al.*, 2007), aterosclerose de artéria carótida (Djurić *et. al.*, 2008), úlcera duodenal (Yeh *et. al.*, 2010), carcinoma epidermoide e fibrose submucosa oral (Chaudhary *et. al.*, 2010).

O gene da MMP-8, localizado no cromossomo 11, apresenta um polimorfismo funcional na região promotora -799, caracterizado por uma substituição de uma citosina por uma timina - C-799T (rs11225395) (Wang *et. al.*, 2004). Tal polimorfismo está associado à dilatação crônica dos brônquios (LEE *et. al.*, 2007) e neoplasia mamária (Decock *et. al.*, 2007).

3.3 Polimorfismo Genético e Tendinopatias

Os polimorfismos genéticos provavelmente influenciam a degeneração tendínea por meio do efeito acumulado de múltiplos polimorfismos, envolvendo interações complexas entre múltiplos genes (Adamo *et. al.*, 2001). Para entender a importância de cada alelo polimórfico, é necessário avaliar a contribuição de cada polimorfismo no fenótipo da doença (Magra; Mafulli, 2008).

Mokone *et. al.* (2005) demonstram que o polimorfismo no gene alfa 1 do colágeno tipo V (*COL5A1*) está associado com sintomas de patologias do tendão calcâneo, onde o alelo A2 parece exercer um papel protetor.

O mesmo grupo comprova também o papel da tenascina-C nesse processo (Mokone *et. al.*, 2006). A análise do polimorfismo no gene da tenascina-C

caracterizado pela repetição de guanina-timina (GT) indica que os indivíduos com 12 e 14 repetições GT no gene tenascina-C apresentam um risco seis vezes maior de desenvolver lesões no tendão calcâneo.

Um polimorfismo na cadeia alfa 1 do colágeno tipo I (GT) está associado a rupturas do ligamento cruzado anterior (Posthumus *et. al.*, 2009a), mas não com lesões de tendão calcâneo (Posthumus *et. al.*, 2009b).

Collins e Raleigh (2009) relatam que o polimorfismo do gene *COL5A1* está associado às doenças crônicas do tendão calcâneo.

Posthumus e Collins (2010) notam a comparação dos genótipos em pacientes com patologia do tendão de calcâneo *versus* pacientes normais; o principal achado revela que indivíduos que carregam polimorfismo do gene que expressa o fator transformador de crescimento beta 1 (*TGF-β1*), variante rs1800469 e o fator 5 de diferenciação de crescimento (*GDF-5*) variante rs143383 apresentam o dobro de risco para desenvolver a lesão.

4 MÉTODOS

O protocolo foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) sob o número 708, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 0901/09 e pela Comissão Científica da Universidade Federal do Paraná sob o número 200923474.

Esse estudo foi realizado mediante parceria do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e o Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Após explicação do trabalho e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II), os voluntários foram recrutados entre os pacientes do Grupo de Pé e Tornozelo do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Estes pacientes foram identificados segundo idade, gênero, índice de massa corpórea, diagnóstico da doença, uso de medicamentos, antecedentes pessoais de doenças sistêmicas e infecciosas, antecedentes familiares de doenças inflamatórias e informação sobre a presença prévia de pé plano.

Foram divididos em dois grupos:

- **Grupo-Teste:** 50 mulheres com diagnóstico clínico e anatomopatológico de lesão degenerativa primária do tendão tibial posterior.
- **Grupo-Controle:** 100 mulheres assintomáticas e com tendão tibial posterior íntegro na ressonância magnética.

Pacientes de ambos os grupos apresentaram boas condições sistêmicas e ausência dos critérios de não inclusão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Critérios de não inclusão

Doenças reumatológicas
Doenças imunológicas
Diabetes
Doenças hepáticas e renais
Infecção ou lesão prévia ou atual na topografia do pé e tornozelo
Obesidade superior ao grau I
Gênero masculino

O estudo do polimorfismo genético foi realizado no Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. O grupo de pesquisadores de processamento do material celular não teve conhecimento do grupo ao qual fazia parte o voluntário.

4.1 Obtenção de DNA

O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por meio de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) durante 2 minutos (Trevilatto; Line, 2000). O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção do material de estudo, pois constitui o método menos invasivo e mais prático de obtenção do DNA. Nesta solução, foi adicionado 1 ml de solução *TNE* (10 MM Tris pH 8, 150 MM NaCl e 2 mM *EDTA*) e então centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm, para coleta da fase celular. Para a suspensão das células, foi acrescentado 1,3 ml de solução de extração

(Tris-Cl a 10 mM, (pH 7,8), *EDTA* a 5 mM e SDS a 0,5%) e as amostras foram congeladas a -20°C até o momento de extração do DNA.

O material foi transportado por empresa credenciada, conforme o Procedimento Operacional Padrão da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

4.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada na Universidade Federal do Paraná conforme protocolo de Aidar e Line (2007). As amostras foram incubadas *overnight* (ON) com 20 mg/ml de proteinase K (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA*) a 56 °C. Foram adicionados 500 ul de solução de acetato de amônio 10mM com EDTA 1mM e vortexado por 5 segundos. Após centrifugação a 170000g por 10 minutos, o sobrenadando foi coletado e foram adicionados 540 ul de isopropanol para cada 900 ul da solução contendo DNA. Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido à lavagem com etanol a 70% e seco por 15 minutos a 37 °C. O DNA foi realizada suspensão em 100 ul de tampão *TE* (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM) a temperatura ambiente por três horas.

4.3 Técnica de “*Polimerase Chain Reaction*”

A técnica de “*Polimerase Chain Reaction*” (*PCR*) foi utilizada para amplificação dos fragmentos das regiões reguladoras dos genes da MMP-1, MMP-3 e MMP-8. Os oligonucleotídios iniciadores (“*primers*”) de fragmento da MMP-1 foram usados conforme Rutter *et. al.* (1998). O “*primer*” reverso do fragmento da

MMP-3 foi empregado conforme descrito por Dunleavey *et. al.* (2000). Os primers do fragmento da MMP-8 foram desenhados para este estudo.

A técnica de *PCR* teve um volume final de 10 ul, contendo aproximadamente 400 ng de DNA, *taq Green* (Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) e primers específicos para cada fragmento. A mistura com os reagentes foi submetida à desnaturação inicial por 3 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C, anelamento à temperatura adequada para cada fragmento e extensão a 72°C. Os primers, a temperatura e o tempo de anelamento (amplificação) estão descritos na Tabela 2.

4.4 Determinação do Genótipo

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores, técnica de “*Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*”. A digestão foi realizada com volume final de 10 ul, por 16 horas a 37°C. A Tabela 2 mostra as enzimas de restrição que foram utilizadas para análise de cada sítio polimórfico, além do tamanho dos fragmentos gerados (pb).

Tabela 2: Informações sobre condições da técnica de *PCR* e de *RFLP*

SNP	Primer (5' – 3')	Anelamento	RFLP	pb PCR pb RFLP
MMP-1 (-1607)	F*: TCGTGAGAATGTCTTCCATT R**: TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC	55°C 30 segundos	XmnI 37°C	118 89 + 29
MMP-3 (-1612)	F*: GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGGAAAGA R**: CTCCTATTACATCACTGCCACCACT	63°C 1 minuto	PsyI 37°C	129 97 + 32
MMP-8 (-799)	F*: CAGAGACTCAAGTGGGA R**: TTCATTTGTGGAGGGGC	51°C 1 minuto	BfmI 37°C	106 74 + 32

* *Primer Foward.*

** *Primer Reverse.*

4.5 Eletroforese

As sequências amplificadas (*PCR*) e digeridas (*RFLP*) foram analisadas por eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 10% em TBE 1x (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 15 mA, sendo o tempo de corrida variável de acordo com o tamanho do fragmento.

4.6 Análise Estatística dos Resultados

A associação entre os polimorfismos genéticos estudados e a tendinopatia primária do tendão tibial posterior foi avaliada pelo teste Qui-Quadrado, ao nível de significância de 5%.

O programa ARLEQUIN (v. 2.0 – Schneider et al., 2000) foi utilizado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra estudada.

4.7 Análise da Amostra

Respeitados os critérios de inclusão e não inclusão, a amostra foi obtida por conveniência e composta por 150 mulheres, 50 indivíduos no grupo-teste submetidos a procedimento cirúrgico e com diagnóstico clínico e anatomopatológico de lesão degenerativa primária do tendão tibial posterior e 100 indivíduos no grupo-controle com tendão tibial posterior íntegro e sem sinais de degeneração na ressonância magnética, realizada como investigação diagnóstica de queixa em outra topografia do tornozelo e pé.

Quanto ao estágio da Insuficiência do Tendão Tibial Posterior, o grupo-teste apresenta 23 pacientes no estágio II e 27 pacientes no estágio III, conforme Sistema de Classificação descrito no Quadro 1 (Anexo I) (Johnson; Strom, 1989).

Quanto aos procedimentos cirúrgicos realizados no grupo-teste, os pacientes em estágio II foram submetidos à ressecção da porção distal do tendão tibial posterior e tenodese da porção proximal no tendão flexor longo dos dedos, transferência do tendão flexor longo dos dedos para o osso navicular e osteotomia varizante do calcâneo; aqueles classificados no estágio III foram submetidos à ressecção do tendão tibial posterior e artrodese tripla modelante com correção do valgismo do retropé.

A idade dos pacientes dos grupos da amostra, considerada como variável independente, continua e com distribuição não normal, foi analisada através do teste U de *Mann Whitney*, que não identificou diferença estatística ($p=0,0839$) entre os dois grupos estudados.

Os dados de índice de massa corpórea de ambos os grupos foram identificados conforme o sistema de classificação em indivíduo normal (de 18,5 a 24,9) ou indivíduo com obesidade grau I (de 25,0 a 29,9). Considerados como variável independente, categórica e com distribuição não normal, foram analisados através do teste exato de *Fisher*, que não identificou diferença estatística ($p=0,721$) entre os dois grupos estudados.

A média de idade e a distribuição do índice de massa corpórea (IMC) da amostra estudada estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3: Média de idade e distribuição por faixa de IMC da amostra nos grupos de estudo

Parâmetros	Controle (n = 100)	Teste (n = 50)
Média de idade	51,76 anos (47-56)	53,06 anos (48-56)
IMC	61(normal)/ 39(obesidade grau I)	33(normal)/ 17(obesidade grau I)

Em relação ao questionamento sobre a presença de pé plano desde a maturidade esquelética – fim da adolescência – a resposta foi positiva em 30% dos indivíduos do grupo-teste e em 32% dos indivíduos do grupo-controle.

5 RESULTADOS

5.1 MMP-1

O polimorfismo do gene da MMP-1 na posição -1607 é caracterizado pela inserção de uma base guanina (G), criando dois alelos diferentes (1G ou 2G). O alelo 2G está relacionado com o aumento da expressão desse gene (Rutter *et. al.*, 1998). A enzima de restrição *XmnI* reconhece o alelo 1G e na presença deste o produto de *PCR* (118 pares de bases) é digerido em duas partes (89 e 29 pares de bases). Na eletroforese, o alelo 2G foi representado por uma banda de DNA de 118 pares de bases, o alelo 1G por uma banda de DNA de 89 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (118 e 89 pares de bases). Durante a eletroforese, a banda com 29 pares de bases saía do gel. A Figura 1 mostra os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-1 (-1607), caracterizando os diferentes genótipos.

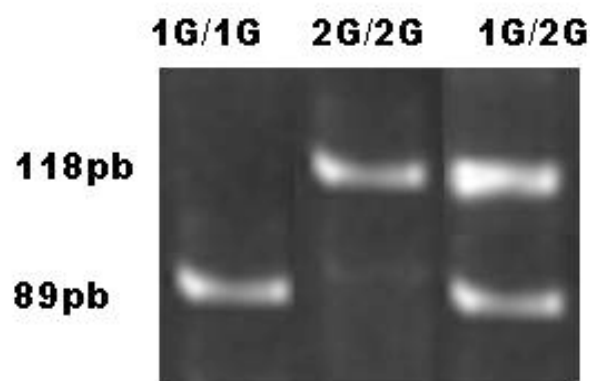


Figura 1: Genótipos da MMP-1 (-1607)

A análise do polimorfismo -1607 do gene da MMP-1 indica diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

Enquanto no grupo-controle 75% dos voluntários apresentaram alelo 1G, no grupo-teste o alelo 2G apareceu em 78% dos pacientes. O genótipo 1G/1G foi o mais frequente no grupo-controle (62%), enquanto o genótipo 2G/2G foi o mais frequente no grupo-teste (72%), como demonstra a Tabela 4.

Tabela 4: Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo -1607 do gene da MMP-1

MMP-1	Grupo-Controle		Grupo-Teste		Qui-Quadrado
(-1607)	n	%	n	%	
Alelos	N = 200		n = 100		p < 0,001
1G	150	75	22	22	
2G	50	25	78	78	
Genótipos	N = 100		n = 50		p < 0,001
1G/1G	62	62	08	16	
2G/2G	12	12	36	72	
1G/2G	07	07	06	12	

5.2 MMP-3

O polimorfismo estudado no gene da MMP-3 caracteriza-se por apresentar uma variação na sequência de adenina na posição -1612, resultando no alelo 5A ou 6A (rs3025058). O 5A parece aumentar a atividade e transcrição da MMP-3 e o 6A

diminuir (YE *et. al.*, 1996). A enzima de restrição Tth111 reconhece o alelo 5A e na presença deste o produto de *PCR* (129 pares de bases) é digerido em duas partes (97 e 32 pares de bases). Na eletroforese, o 6A foi representado por uma banda de DNA de 129 pares de bases, o 5A foi representado por uma banda de DNA de 97 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (129 e 97 pares de bases). Durante a eletroforese, a banda com 32 pares de bases saía do gel. A Figura 2 assinala os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-3 (-1612), caracterizando os diferentes genótipos.

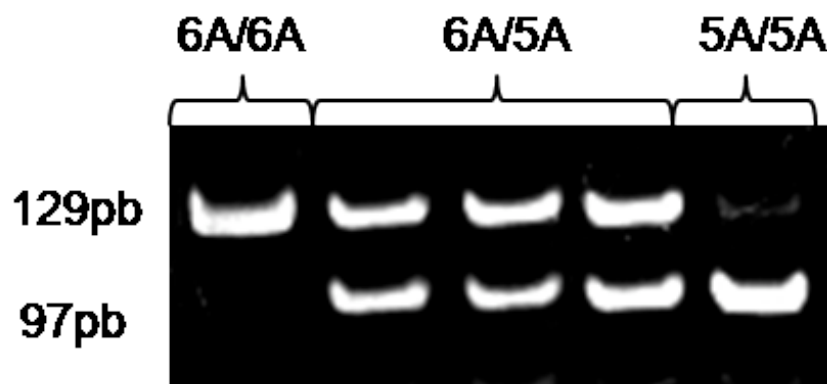


Figura 2: Genótipos da MMP-3 (-1612)

Não foi observada diferença estatística significativa na frequência genotípica ($p = 0,425$) e na frequência alélica ($p = 0,366$) do polimorfismo MMP-3 (-1612) entre 5A e 6A.

O resultado evidencia que em ambos os grupos a maior frequência foi do alelo 6A (57,5% dos pacientes que compuseram o grupo-controle e 52% dos pacientes do grupo-teste) e do genótipo 5A/6A (61% do grupo-controle e 56% do grupo-teste), sugerindo que esse polimorfismo não influencia o processo de tendinopatia primária do tendão tibial posterior na população analisada.

A frequência alélica e genotípica do polimorfismo -1612 do gene da MMP-3 está indicada na Tabela 5.

Tabela 5: Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo -1612 do gene da MMP-3

MMP-3	Grupo-Controle		Grupo-Teste		Qui-Quadrado
(-1612)	n	%	n	%	
Alelos	n = 200		n = 100		p = 0,366
6A	115	57,5	52	52	
5 ^a	85	42,5	48	48	
Genótipos	n = 100		n = 50		p = 0,425
6A/6A	27	27	12	24	
5A/5A	12	12	10	20	
6A/5A	61	61	28	56	

A análise do polimorfismo -1612 do gene da MMP-3 indica não haver diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

5.3 MMP-8

Na posição -799 do gene da MMP-8, o polimorfismo caracteriza-se por uma troca de citosina por timina (rs11225395), apresentando dois alelos diferentes (C ou T). Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados durante esse trabalho foram

eficientes na amplificação dos fragmentos. Na eletroforese, o alelo T foi representado por uma banda de DNA de 106 pares de bases e o alelo C por uma banda de DNA de 74 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (106 e 74 pares de bases).

A Figura 3 mostra os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-8 (-799), caracterizando cada genótipo.

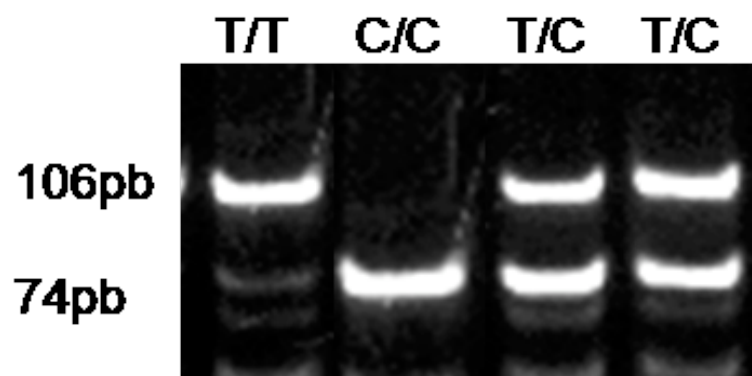


Figura 3: Genótipos da MMP-8 (-799)

A análise do polimorfismo -799 do gene da MMP-8 assinalou que no grupo-controle 72% dos voluntários apresentaram alelo C, enquanto no grupo-teste, este alelo apareceu apenas em 46% dos indivíduos. O genótipo C/C foi o mais frequente no grupo-controle (67%), enquanto o genótipo T/T foi o mais frequente no grupo-teste (46%), como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Frequência dos alelos e genótipos do polimorfismo -799 do gene da MMP-8

MMP-8	Grupo-Controle		Grupo-Teste		Qui-Quadrado
(-799)	n	%	n	%	
Alelos	n = 200		n = 100		p < 0,001
C	144	72	46	46	
T	56	28	54	54	
Genótipos	n = 100		n = 50		p = 0,003
C/C	67	67	19	38	
T/T	23	23	23	46	
C/T	10	10	08	16	

A análise do polimorfismo -799 do gene da MMP-8 indica diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

6 DISCUSSÃO

Esse estudo faz parte de uma linha de pesquisa genética ampla que envolve a análise de diversos genes e é realizado pela parceria entre o Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e o Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os resultados demonstram que o método de extração de DNA utilizado foi adequado para obtenção de quantidades suficientes de DNA. As técnicas de *PCR* e *RFLP* foram eficientes para identificação dos genótipos da MMP-1, MMP-3 e MMP-8.

A amplificação dos fragmentos por técnica de *PCR* teve suas condições otimizadas e a escolha das enzimas de restrições para a técnica de *RFLP* foi adequada para a análise dos polimorfismos estudados.

Assim, com metodologia reprodutível, de baixo custo e pouco invasiva, foi possível identificar marcadores moleculares para pacientes com tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

O presente estudo obteve um banco de DNA de 150 indivíduos, sendo 50 pacientes com lesão degenerativa do tendão tibial posterior e 100 com tendão tibial posterior íntegro. Esse banco é resultado de critérios rígidos na obtenção da amostra, visando diminuir a influência de fatores sistêmicos que podem mascarar ou acentuar o real papel dos polimorfismos genéticos na fisiopatogenia dessa tendinopatia.

O interesse do grupo envolvido nessa linha de pesquisa é catalogar diferentes polimorfismos relacionados à tendinopatia primária, uma vez que o perfil genômico permite definir um banco de marcadores genéticos para suscetibilidade a tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é a base da genética de populações e define que em uma população mendeliana dentro de condições normais, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. A teoria de que alelos raros se tornam cada vez mais raros e que alelos frequentes aumentem cada vez mais sua frequência, simplesmente por já serem raros ou comuns, é matematicamente refutada pelo princípio de Hardy-Weinberg.

Os polimorfismos nos genes da MMP-1, MMP-3 e MMP-8 apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg, garantindo, assim, que a distribuição genotípica ocorreu ao acaso.

Esse estudo nota que o polimorfismo na região promotora do gene da MMP-1 (posição -1607) está fortemente associado à tendinopatia primária do tendão tibial posterior. O alelo 2G foi observado em uma frequência significativamente maior nos pacientes com diagnóstico anatomopatológico de lesão degenerativa do tendão tibial posterior (78% no grupo-teste *versus* 25% no controle). Esse alelo aumenta a transcrição do gene e potencializa o nível da expressão dessa proteína (Rutter *et. al.*, 1998), fornecendo a base molecular para explicar a intensa degradação da matriz extracelular na tendinopatia.

Em relação ao polimorfismo C-799T do gene da MMP-8, os oligonucleotídeos iniciadores desenhados durante esse estudo foram eficientes na amplificação do fragmento que contém o sítio polimórfico. Dessa forma, essa nova técnica de PCR e RFLP revelaram-se eficazes para o estudo desse polimorfismo.

Os resultados indicam que o polimorfismo na região promotora da MMP-8 na posição C-799T (Wang *et. al.*, 2004) é funcional e está associado à tendinopatia primária do tendão tibial posterior. O alelo T (54%) e o genótipo T/T (46%) são

observados em uma frequência significativamente maior no grupo-teste, enquanto o alelo C (72%) e o genótipo C/C (67%) prevalecem no grupo-controle. Portanto, esse polimorfismo pode ser usado com marcador para avaliar pacientes em relação ao risco de desenvolver tendinopatia primária do tendão tibial posterior, onde a presença do alelo T indica um risco maior.

A análise relacionada ao polimorfismo -1612 do gene da MMP-3 constata que em ambos os grupos o alelo 6A e o genótipo 5A/6A são os mais frequentes, sugerindo que, apesar de modificar a expressão da respectiva proteína, esse polimorfismo parece não influenciar o processo dessa tendinopatia.

É importante considerar que a transcrição de genes de MMPs pode ser regulada por diversos fatores locais, como: citocinas, hormônios e fatores de crescimento, metabólitos de bactérias e moléculas de adesão. Além disso, Zhou *et al.* (2000) mostram em camundongos *knockout* que para diferentes MMPs, inclusive MMP-3, não ocorre qualquer distúrbio aparente, o que remete a funções compartilhadas de algumas metaloproteases e que o polimorfismo de um único gene de MMP pode não ter efeito suficiente na suscetibilidade a doença.

O polimorfismo -1612 do gene da MMP-3 pode ter seus efeitos mascarados por polimorfismos em diferentes regiões do mesmo gene ou em outros genes que participam da complexa rede de mediadores inflamatórios dos tendões. Dessa maneira, somente a presença do polimorfismo -1612 da MMP-3 não é um fator de risco genético para tendinopatia primária do tendão tibial posterior.

Uma vez que o colágeno tipo I é o componente principal da matriz extracelular do tendão tibial posterior e a degradação deste tecido é considerada um dos fatores-chave nas lesões degenerativas, as collagenases 1 e 2 (MMP-1 e MMP-8)

estão fortemente associadas, já que pontuam eficiência para iniciar a degradação do colágeno tipo I (Sorsa *et. al.*, 2006). Embora estas MMPs exerçam seu papel principal na degradação da matriz, elas também podem modular a resposta inflamatória e imune (Kuula *et. al.*, 2009, Korpi *et. al.*, 2009). O desequilíbrio na produção das MMP-1 e MMP-8 fornece a base molecular para explicar uma intensa degradação do colágeno tipo I, criando condições que acentuam a tendinopatia.

É importante salientar que os resultados aqui reportados podem ser diferentes quando analisados em populações etnicamente distintas, uma vez que a origem étnica pode influenciar a frequência alélica (Mourant *et. al.*, 1976).

Na degeneração tendínea, como em qualquer processo multifatorial (Michalowicz *et. al.*, 2000), a combinação de vários polimorfismos de risco significativo agem sinergicamente para elevar a suscetibilidade e a alteração fisiológica. Alguns sítios polimórficos podem ser herdados em combinação, são os chamados haplótipos, os quais fornecem informações mais completas e confiáveis da influência dos polimorfismos no genótipo do processo.

Nesse sentido, a análise das frequências de haplótipos e os resultados de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos das MMP-1, MMP-3 e MMP-8, localizados no cromossomo 11q22.3 adjacente um ao outro, parecem ser de grande valor para compreensão da tendinopatia e dos mecanismos de compensação funcional do indivíduo.

Os estudos genéticos relacionados a tendinopatias publicados na literatura apresentam análise da correlação de polimorfismos nos genes que expressam o colágeno tipo V (*COL5A1*), a tenascina-C, o colágeno tipo I (GT), o fator transformador de crescimento beta 1 (*TGF- β 1*) variante rs1800469 e o fator 5 de

diferenciação de crescimento (*GDF-5*) variante rs143383, com alterações do tendão calcâneo, mas não em relação ao tendão tibial posterior (Mokone *et. al.*, 2005; Mokone *et. al.*, 2006; Posthumus *et. al.*, 2009b; Collins; Raleigh, 2009; Posthumus; Collins, 2010).

O conhecimento de marcadores genéticos relacionados à tendinopatia primária do tendão tibial posterior possibilita a identificação de indivíduos suscetíveis e a análise de polimorfismos em MMPs relacionados tem valor clínico significativo, aumentando o entendimento da fisiopatogenia da degeneração desse tendão.

No futuro, a investigação de outros marcadores genéticos poderá definir e padronizar todos os genes de risco para essa doença e, assim, criar condições adequadas para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas individualizadas, como, por exemplo, o uso dos inibidores de MMPs de baixo peso molecular para pacientes suscetíveis à insuficiência do tendão tibial posterior.

7 CONCLUSÕES

- O polimorfismo na posição -1607 do gene da MMP-1 está associado à tendinopatia primária do tendão tibial posterior na população estudada. Os resultados apresentados sugerem que indivíduos com o alelo 2G têm maior risco de desenvolver a tendinopatia.
- O polimorfismo na posição -799 do gene da MMP-8 está associado à tendinopatia primária do tendão tibial posterior na população estudada. Os resultados apresentados sugerem que indivíduos com o alelo T têm risco maior de desenvolver a tendinopatia.
- O polimorfismo estudado no gene da MMP-3 (-1612) não está associado à tendinopatia primária do tendão tibial posterior na população estudada.

8 ANEXOS

ANEXO I

Quadro 1: Estágios da insuficiência do tendão tibial posterior

Estágio	Tendão/Deformidade
I	tendinopatia/ sem deformidade
II	tendinopatia/ deformidade pé plano flexível
III	tendinopatia/ deformidade pé plano rígido

ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-
HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE

CEP:.....TELEFONE: (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

Grau de parentesco

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE: (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *Papel do polimorfismo dos genes que expressam as metaloproteases na tendinopatia primária do tendão tibial posterior.*

PESQUISADOR: Túlio Diniz Fernandes

CARGO/FUNÇÃO: Professor-Doutor. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 48089

UNIDADE DO HCFMUSP: IOT

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

- As lesões dos tendões por degeneração têm explicações ligadas a traumatismos, a problemas de circulação sanguínea e problemas dos nervos, mas muitas doenças que levam à degeneração dos tendões ainda permanecem sem uma explicação médica adequada. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa esclarecer os motivos que causam as degenerações dos tendões do pé. Por esse motivo, a possibilidade de causas genéticas para essas lesões precisam ser estudadas e o objetivo desse estudo é investigar a frequência dos genes em pacientes com diagnóstico de lesão do tendão tibial posterior, para verificar a possível relação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento dessa doença.
- Esse estudo será feito com um único exame mediante coleta simples de saliva. Os pacientes selecionados farão bochecho com água e açúcar e, em seguida, cuspirão em um recipiente plástico pequeno. A leitura das informações genéticas presentes na saliva é exame de alta tecnologia não rotineiro no nosso meio. Não haverá outros exames ou procedimentos invasivos.
- Não haverá desconfortos ou riscos na coleta e execução desse exame.
- Em relação aos benefícios para os participantes, não há benefício direto para o participante; trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que fatores genéticos interfiram na degeneração dos tendões.
- Com esse estudo, poderemos concluir a presença de algum benefício aos pacientes.
- Está garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos achados da pesquisa, ao

seu prontuário e aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Os responsáveis pelo estudo são o professor Túlio Diniz Fernandes e o doutor Alexandre Leme Godoy dos Santos, que podem ser encontrados no endereço Rua Ovídio Pires de Campos, nº 333, 3º andar, sala da Secretaria de Graduação, Instituto de Ortopedia e Traumatologia da USP, São Paulo, Capital, Brasil, pelo telefone 3069 6888.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) à Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, telefone 3069 6442, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 3069 6442, ramal 26. *E-mail*: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

É garantido aos participantes o direito de confidencialidade das informações obtidas no estudo, as quais serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.

É garantido o direito aos participantes de serem mantidos atualizados sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, nem compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Há compromisso absoluto do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *“Papel do polimorfismo dos genes que expressam as metaloproteases na tendinopatia primária do tendão tibial posterior”*.

Eu discuti com o Dr. Túlio Diniz Fernandes sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de

despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

9 REFERÊNCIAS

1. Adamo CT, Mailhot JM, Smith AK, Borke JL. Connexin-43 expression in oral-derived human osteoblasts after transforming growth factor-beta and prostaglandin E2 exposure. *J Oral Implantol*. 2001;27:25-31.
2. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18:148-52.
3. Altaş M, Bayrak Of, Ayan E, Bolukbasi F, Silav G, COSKUN KK, Culha M, Sahin F, Sevli S, Elmaci I. The effect of polymorphisms in the promoter region of the MMP-1 gene on the occurrence and invasiveness of hypophyseal adenoma. *Acta Neurochir (Wien)*. 2010;152(9):1611-7.
4. Astolfi CM, Shinohara AL, Da Silva RA, Santos MC, Line SR, De Souza AP. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2006;33:699-703.
5. Autio-Harmainen H, Karttunen T, Hurskainen T, Höyhty M, Kauppila A, Tryggvason K. Expression of 72 kDa type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. *Lab Invest*. 1993;69:312-21.
6. Barlas IO, Sezgin M, Erdal ME, Sahin G, Ankarali HC, Altintas ZM, Turkman E. Association of (-1,607) 1G/2G polymorphism of matrix metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms). *Rheumatol Int*. 2009;29:383-8.
7. Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq JP, Rio MC. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol*. 1997;15:535-41.
8. Beyzade S, Zhang S, Wongyk, Day IN, Eriksson P, Ye S. Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:2130-7.
9. Birkedal-Hanssen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hanssen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4:197-250.

10. Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol.* 1997;182:347-55.
11. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4823-30.
12. Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, et al., Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg.* 1999;230:260-5.
13. Buttice G, Quinones S, Kurkinen M. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of human stromelysin gene. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:3723-31.
14. Cao ZG, Li CZ 2006 A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances oral squamous cell carcinoma susceptibility in a Chinese population. *Oral Oncol.* 2006;42:32-8.
15. Cargill M, Alshuler D, Ireland J, Sklar P, Daley GQ, Lander ES. Characterization of single-nucleotide polymorphism in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 1999;22:231-8.
16. Chaudhary AK, Pandya S, Mehrotra R, Bharti AC, Jain S, Singh M. Functional polymorphism of the MMP-1 promoter (-1607 1G/2G) in potentially malignant and malignant head and neck lesions in an Indian population. *Biomarkers.* 2010;15(8):684-92.
17. Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Singh M, Shukla S, Singh AK, Mehrotra R. Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) promoter (-1171 5A->6A) polymorphism in oral submucous fibrosis and head and neck lesions. *BMC Cancer.* 2010;10:369.
18. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mäntylä P, Rönkä H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2000;27:366-9.
19. Chen QJ, Lu L, Peng WH, HU J, Yan XX, Wang LJ, Zhang Q, Zhang RY, Shen WF. Polymorphisms of MMP-3 and TIMP-4 genes affect angiographic

- coronary plaque progression in non-diabetic and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta*. 2009;405(1-2):97-103.
20. Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Szabo G, Yao J, Mikecz K, Hasty KA, Kuettner KE. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. *J Biol Chem*. 1996; 271: 11023-11026.
 21. Cong Y, Guo X, Liu X, Cao D, Jia X, Xiao X, Li S, Fang S, Zhang Q. Association of the single nucleotide polymorphisms in the extracellular matrix metalloprotease-9 gene with PACG in southern China. *Mol Vis*. 2009;15:1412-7.
 22. Constantin A, Lauwers-Cancès V, Navaux F, et al. Stromelysin 1 (Matrix Metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms - association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. *Arthritis Rheum*. 2002;46:1754-62.
 23. Decock J, Long JR, Laxton RC, Shu XO, Hodgkinson C, Hendrickx W, Pearce EG, Gao YT, Pereira AC, Paridaens R, Zheng W, Ye S. Association of matrix metalloproteinase-8 gene variation with breast cancer prognosis. *Cancer Res*. 2007;67:10214-21.
 24. Deland JT, De Asla RJ, Sung IH, Emberg LA, Potter HG. Posterior tibial tendon insufficiency: which ligaments are involved? *Foot Ankle Int*. 2005;26:427-35.
 25. Di Colandrea T, Wang L, Wille J, D'Armiento J, Chada KK. Epidermal expression of collagenase delays wound-healing in transgenic mice. *J Invest Dermatol*. 1998;111:1029-33.
 26. Dioszegi M, Cannon P, Van Wart H. Vertebrate collagenases. *Methods Enzymol*. 1995;248:413-49.
 27. Djurić T, Zivković M, Radak D, Jekić D, Radak S, Stojković L, Raicević R, Stanković A, Alavantić D. Association of MMP-3 5A/6A gene polymorphism with susceptibility to carotid atherosclerosis. *Clin Biochem*. 2008;41:1326-9.

28. Djurić T, Zivković M, Stanković A, Mecanin S, Alavantić D. Endothelial NOS G894 T and MMP-3 5A/6A gene polymorphisms and hypertension in Serbian population. *J Clin Lab Anal.* 2005;19:241-6.
29. Drzewoski J, Sliwińska A, Przybyłowska K, Sliwiński T, Kasznicki J, Zurawska-Klis M, Kosmowski M, Majsterek I. Gene polymorphisms and antigen levels of matrix metalloproteinase-1 in type 2 diabetes mellitus coexisting with coronary heart disease. *Kardiol Pol.* 2008;66:1042-8.
30. Dunleavey L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biol.* 2000;19:175-7.
31. Dyal C, Feder J, Deland JT, et al. Pes planus in patients with posterior tibial tendon insufficiency: asymptomatic versus symptomatic foot. *Foot Ankle Int.* 1987;181:24-7.
32. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:161-74.
33. Emonard H, Grimaud J-A. Matrix metalloproteinases. *Cell Molec Biol.* 1990;36:131-53.
34. Fallah S, Seifi M, Samadikuchaksaraei A. Risk of coronary artery stenosis in Iranian type 2 diabetics: is there a role for matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism? *J Physiol Biochem.* 2010;66:359-64.
35. Fernandes KS, Brum DG, Sandrim VC, Guerreiro CT, Barreira AA, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase-9 genotypes and haplotypes are associated with multiple sclerosis and with the degree of disability of the disease. *J Neuroimmunol.* 2009;214:128-31.
36. Flex A, Gaetani E, Angelini F, Sabusco A, Chillà C, Straface G, Biscetti F, Pola P, Castellot JJ Jr, Pola R. Proinflammatory genetic profiles in subjects with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia. *J Int Med.* 2007;262:124-30.
37. Fowler AW. Tibialis posterior syndrome. In: Proceedings of the South-West Orthopaedic Club. *J Bone Joint Surg.* 1955;37-B(3):520.

38. Frey C, Shereff M, Greenidge N. Vascularity of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg.* 1990;72-A:884-8.
39. Funk D, Cass JR, Johnson KA. Acquired adult flat foot secondary to posterior tibial-tendon pathology. *J Bone Joint Surg.* 1986;68-A:95-102.
40. Gai X, Lan X, Luo Z, Wang F, Liang Y, Zhang H, Zhang W, Hou J, Huang M. Association of MMP-9 gene polymorphisms with atrial fibrillation in hypertensive heart disease patients. *Clin Chim Acta.* 2009;408:105-9.
41. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493-503.
42. Ghaderian SM, Najjar RA, Panah AS, Rezaie G, Ferimani AR, Harchegani AB, Azargashb E. Matrix metalloproteinase: investigation from gene to protein as effective factor in myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis.* 2010;30:404-1011.
43. Godoy-Satos AL, D'elia CO, Teixeira WJ, Cabrita HB, Camanho GL. Aseptic loosening onf total hip arthroplasty: preliminary genetic investigation. *J Arthroplasty.* 2009;24(2):297-302.
44. Gonçalves Neto J, Witzel SS, Teodoro WR, et al. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine.* 2002;69:189-94.
45. Gutiérrez-Fernández A, Fueyo A, Folgueras AR, Garabaya C, Pennington CJ, Pilgrim S, Edwards DR, Holliday DL, Jones JL, Span PN, Sweep FC, Puente XS, López-Otín C. Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. *Cancer Res.* 2008;68:2755-63.
46. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J.* 2011;278(1):28-45.
47. Hall NF, Gale CR, Ye S, Martyn CN. Myopia and polymorphisms in genes for matrix metalloproteinases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:2632-6.

48. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci.* 1991; 88: 8154-8158.
49. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schönbeck U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation.* 2001;104:1899-904.
50. Hirashiki A, Yamada Y, Murase Y. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low- or high-risk subjects defined by conventional risk factors. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1429-37.
51. Holmes GB Jr, Mann RA. Possible etiologic factors associated with rupture of the posterior tibial tendon. *Foot Ankle.* 1992;13:70-9.
52. Horne BD, May HT, Anderson JL, Kfoury AG, Bailey BM, McClure BS, Renlund DG, Lappé DL, Carlquist JF, Fisher PW, Pearson RR, Bair TL, Adams TD, Muhlestein JB. Usefulness of routine periodic fasting to lower risk of coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *Am J Cardiol.* 2008;102:814-9.
53. Hung TM, Chang SC, Yu WH, Wang YW, Huang C, Lu SC, Lee PH, Chang MF. A novel nonsynonymous variant of matrix metalloproteinase-7 confers risk of liver cirrhosis. *Hepatology.* 2009;50:1184-93.
54. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, et al. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1996;271:14657-60.
55. Jahss MH. Spontaneous rupture of the tibialis posterior tendon: clinical findings, tenographic studies, and a new technique of repair. *Foot Ankle.* 1982;3:158-66.
56. Jahss MH, editor. Disorders of the foot and ankle. Medical and surgical management. Philadelphia: W. B. Saunders; 1991. p.1461-513: Tendon disorders of the foot and ankle.
57. James SL, Bates BT, Osternig LR. Injuries to runners. *Am J Sports Med.* 1978;6:40-50.

58. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholdt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10: 667-71.
59. Johnson KA. Tibialis posterior tendon rupture. *Clin Orthop.* 1983;177:140-7.
60. Johnson KA, Strom DE. Tibialis posterior tendo dysfunction. *Clin Orthop.* 1989;239:196-206.
61. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med.* 1999;31:34-45.
62. Kara I, Ozkok E, Aydin M. Combined effects of ACE and MMP-3 polymorphisms on migraine development. *Cephalalgia.* 2007;27:235-43.
63. Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.* 2003;12:109-25.
64. Kettelkamp DB, Alexander HH. Spontaneous rupture of the posterior tibial tendo. *J Bone Joint Surg.* 1969;51-A:759-64.
65. Kidner FC. The prehallux in relation to flatfoot. *JAMA.* 1933;101:1539-42.
66. Knauper V, Osthues A, Declerck YA, Langley KE, Blaser J, Tscheesche H. Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. *Biochem J.* 1993;291;847-54.
67. Knox JB, Sukhova GK, Whitemore AD, Libby P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation.* 1997;95:205-12.
68. Koh YS, Chang K, Kim PJ, Seung KB, Baek SH, Shin WS, Lim SH, Kim JH, Choi KB. A close relationship between functional polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2007;127:430-2.
69. Kohls-Gatzoulis J, Woods B, Angel JC, et al. The prevalence of symptomatic posterior tibialis tendon dysfunction in women over the age of 40 in England. *Foot Ankle Surg.* 2009;15(2):75-81.

70. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: new findings and review of the literature. *BMC Cancer*. 2006;90:188.
71. Korpi JT, Aström P, Lehtonen N, Tjäderhane L, Kallio-Pulkkinen S, Siponen M, Sorsa T, Pirilä E, Salo T. Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice. *Eur J Oral Sci*. 2009;117:248-54.
72. Kulowski J. Tendovaginitis (tenosynovitis). General discussion and report of one case involving the posterior tibial tendo. *J Missouri State Med Assn*. 1936;33:135-7.
73. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2006;77:1803-8.
74. Kuo HP, Wang YM, Wang CH, He CC, Lin SM, Lin HC, Liu CY, Huang KH, Hsieh LL, Huang CD. Matrix metalloproteinase-1 polymorphism in Taiwanese patients with endobronchial tuberculosis. *Tuberculosis*. 2008;88 262-7.
75. Kusakawa J, Sasaguri Y, Morimatsu M, Kameyama T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53:530-4.
76. Kuula H, Salo T, Pirilä E, Hagström J, Loumanen M, Gutierrez-Fernandez A, Romanos GE, Sorsa T. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol*. 2008;53:175-86.
77. Laxton RC, Hu Y, Duchene J, Zhang F, Zhang Z, Leung KI, Xiao Q, Scotland RS, Hodgkinson C, Smith K, Willet J, López C, Simpson A, Kiechl S, Ahluwalia A, Xu Q, Ye S. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res*. 2009;105:921-9.
78. Lee J, Kim HR, Min JW, Park JS, Jin SM, Han SK, Shim YS, Yim JJ. Lack of association between matrix metalloproteinase 8 promoter polymorphism and bronchiectasis in Koreans. *J Korean Med Sci*. 2007;22:667-71.

79. Leite MFF, Santos MCLG, Souza AP, Line SRP. Osseintegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519). *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23:653-8.
80. Leong DJ, Gu XI, Li Y, et al. Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is upregulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. *Matrix Biol*. 2010;29:420-6.
81. Li H, Zhang ZS, Liu W, Yang WZ, Dong ZN, Ma MJ, Han C, Yang H, Cao WC, Duan L. Association of a functional polymorphism in the MMP-3 gene with Moyamoya Disease in the Chinese Han population. *Cerebrovasc Dis*. 2010;30(6):618-25.
82. Liu L, Wu J, Wu C, Wang Y, Zhong R, Zhang X, Tan W, Nie S, Miao X, Lin D. A functional polymorphism (-1607 1G→2G) in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with development and progression of lung cancer. *Cancer*. 2011;117:5172-81.
83. Lombardi F, Belletti I, Bartezzati S, Pier M, Pacciolla M, Biondi MS. MMP-1 and MMP-3 polymorphism and arrhythmia recurrence after electrical cardioversion in patients with persistent atrial fibrillation. *J Cardiovasc Med*. 2011;12:37-42.
84. Madich I, Hellming S, Schreiber S, Bethke B, Stolte M, Miehke S. Allelic variation of the matrix metalloproteinase-9 gene is associated with collagenous colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;234:142-54.
85. Madlener MC, Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res*. 1998;242:201-10.
86. Magra M, Maffulli N. Genetic aspects of tendinopathy. *J Sci Med Sport*. 2008;11(3):243-7.
87. Magra M, Maffulli N. Genetic aspects of tendinopathy. *J Sci Med Sport*. 2008;11(3):243-7.

88. Malik N, Kumar R, Prasad KN, Kawal P, Srivastava A, Mahapatra AK. Association of matrix metalloproteinase-1 gene polymorphism with glioblastoma multiforme in a northern Indian population. *J Neurooncol.* 2011;102(3):347-52.
89. Mann RA. Rupture of the tibialis posterior tendon. In: American Academy of Orthopaedics Surgeons. *Instructional course lectures*. St Louis: C. V. Mosby; 1982. v. 33, p.302-9
90. Mann RA. Flatfoot in Adults. In: Mann RA, Coughlin MJ, editors. *Surgery of the foot and ankle*. St Louis: C. V. Mosby; 1993. p.757-84.
91. Massarotti M, Marchesoni A, Biondi ML, Marasini B. 2002 Polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter gene and severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29:2241-2.
92. McLauchlan GJ, Handoll HHG. Interventions for treating acute and chronic Achilles tendinitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;2:CD000232.
93. Moilanen M, Pirilä E, Grénman R, Sorsa T, Salo T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol.* 2002;197:72-81.
94. Mokone GG, Gajjar M, September AV, Schweltnus MP, Greenberg J, Noakes TD, Collins M. The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C gene is associated with Achilles tendon injuries. *Am J Sports Med.* 2005;33(7):1016-21.
95. Mokone GG, Schweltnus MP, Noakes TD, Collins M. The COL5A1 gene and Achilles tendon pathology. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16(1):19-26.
96. Mosier SM, Lucas DR, Pomeroy GC, et al. Pathology of the posterior tibial tendon in posterior tibial tendon insufficiency. *Foot Ankle Int.* 1998;19:520-4.
97. Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K. *The distribution of the human blood groups*. Oxford: Oxford University Press; 1976.
98. Nam SI, Yu GI, Kim HJ, Park KO, Chung JH, Ha E, Shin DH. A polymorphism at -1607 2G in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)

- increased risk of sudden deafness in Korean population but not at -519A/G in MMP-1. *Laryngoscope*. 2011;121(1):171-5.
99. Nasr HB, Mestiri S, Chahed K, Bouaouina N, Gabbouj S, Jalbout M, Couchane L. Matrix metalloproteinase-1 (-1607) 1G/2G and -9 (-1562) C/T promoter polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in nasopharyngeal carcinomas. *Clin Chim Acta*. 2007;384:57-63.
100. Newman KM, Ogata Y, Malon AM, Irizarry E, Gandhi RH, Nagase H, Tilson MD. Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1315-20.
101. Nishizawa R, Nagata M, Noman AA, Kitamura N, Fujita H, Hoshina H, Kubota T, Itagaki M, Shingaki S, Ohnishi M, Kurita H, Katsura K, Saito C, Yoshie H, Takagi R. The 2G allele of promoter region of matrix metalloproteinase-1 as an essential pre-condition for the early onset of oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2007;7:187.
102. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest*. 1995;72:311-22.
103. Orbe J, Fernandez L, Rodriguez JA, Rabago G, Belzunce M, Monasterio A, Roncal C, Páramo JA. 2003 Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis*. 2003;170:269-76.
104. Ozkök E, Aydin M, Babalik E, Ozbek Z, Ince N, Kara I. Combined impact of matrix metalloproteinase-3 and paraoxonase 1 55/192 gene variants on coronary artery disease in Turkish patients. *Med Sci Monit*. 2008;14:36-542.
105. Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönkä H, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *J Dent Res*. 2000;79:77-84.

106. Park KS, Kim SJ, Kim KH, Kim JC. Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(2):391-7.
107. Pirilä E, Ramamurthy NS, Sorsa T, Salo T, Hietanen J, Maisi P. Gelatinase A (MMP-2), collagenase-2 (MMP-8), and laminin-5 gamma2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). *Dig Dis Sci.* 2003;48:93-8.
108. Pomeroy GC, Maine SP, Pike RH, et al. Current concepts Rreview - acquired flatfoot in adults due to dysfunction of the posterior tibial tendon. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81-A:1173-82.
109. Posthumus M, Collins M, Cook J, et al. Components of the transforming growth factor-beta family and the pathogenesis of human Achilles tendon pathology--a genetic association study. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(11):2090-7.
110. Posthumus M, September AV, Keegan M, O'Cuinneagain D, Van Der Merwe W, Schwellnus MP, Collins M. Genetic risk factors for anterior cruciate ligament ruptures: COL1A1 gene variant. *Br J Sports Med.* 2009;43:352-6.
111. Posthumus M, September AV, O'Cuinneagain D, et al. The COL5A1 gene is associated with increased risk of anterior cruciate ligament ruptures in female participants. *Am J Sports Med.* 2009;37(11):2234-40.
112. Posthumus M, September AV, Schwellnus MP, Collins M. Investigation of the Sp1-binding site polymorphism within the COL1A1 gene in participants with Achilles tendon injuries and controls. *J Sci Med Sport.* 2009;12(1):184-9.
113. Prikk K, Maisi P, Pirilä E, Sepper R, Salo T, Wahlgren J, Sorsa T. In vivo collagenase-2 (MMP-8) expression by human bronchial epithelial cells and monocytes/macrophages in bronchiectasis. *J Pathol.* 2001;194:232-8.
114. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* 2007;26:587-96.
115. Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology.* 2004;43:131-42.

116. Roderfeld M, Rath T, Schulz R, Seeger W, Tschuschner A, Graf J, Roeb E. Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. *J Cyst Fibros*. 2009;8:338-47.
117. Rolf C, Movin T. Etiology, histopathology and outcome of surgery in achillodynia. *Foot Ankle Int*. 1997;18:565-9.
118. Román-García P, Coto E, Reguero JR, Cannata-Andía JB, Lozano I, Avanzas P, Morís C, Rodríguez I. Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. *Coron Artery Dis*. 2009;20:383-6.
119. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res*. 1998;58:5321-5.
120. Santos MC, Campos MI, Souza AP, Trevilatto PC, Line SR. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19:38-43.
121. Santus P, Casanova F, Biondi ML, Blasi F, Di Marco F, Centanni S. Stromelysin-1 polymorphism as a new potential risk factor in progression of chronic obstructive pulmonary disease. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2009;71:15-20.
122. Sarrafian SK. Anatomy of the foot and ankle: descriptive, topographic, functional. Philadelphia: J. B. Lippincott; 1983. p.173-4.
123. Satomi E, Teodoro WR, Parrac ER, et al. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen. *Clinics*. 2008;63(1):9-14.
124. Scherer S, De Souza TB, De Paoli J, Brenol CV, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA, Simon D. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2010;30(3):369-73.
125. Scott A, Khan K. Genetic associations with Achilles tendinopathy. *Rheumatology* (Oxford). 2010;49(11):2005-6.

126. September AV, Cook J, Handley CJ, et al. Variants within the COL5A1 gene are associated with Achilles tendinopathy in two populations. *Br J Sports Med.* 2009;43(5):357-65.
127. September AV, Schweltnus MP, Collins M. Tendon and ligament injuries: the genetic component. *Br J Sports Med.* 2007;41(4):241-6.
128. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:602-8.
129. Shimizu Y, Kondo S, Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer. *Auris Nasus Larynx.* 2008;35 381-9.
130. Siminelakis S, Kotsanti A, Kolaitis N, Niokou D, Vlachou I, Dimakopoulos G, Pappadopoulou C. Circulating matrix metalloproteinase 3 due to myocardial ischemia. *Heart Surg Forum.* 2009;12:E230-4.
131. Skittone LK, Liu X, Tseng A. Matrix metalloproteinase-2 expression and promoter/enhancer activity in skeletal muscle atrophy. *Musc J Orthop Res.* 2008;26(3):357-63.
132. Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosthet Dent.* 1989;62:567-72.
133. Song YQ, Ho DW, Karppinen J, Kao PY, Fan BJ, Luk KD, Yip SP, Leong JC, Cheah KS, Sham P, Chan D, Cheung KM. Association between promoter -1607 polymorphism of MMP1 and lumbar disc disease in Southern Chinese. *BMC Med Genet.* 2008;9:38.
134. Sookoian S, Garcia S, Gianotti TF, Dieuzeide G, Gonzalez CD, Pirola CJ. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor- α gene is associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome. *AJH.* 2005;18:1271-5.
135. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38:306-21.

136. Souza AP, Trevilatto PC, Scarell-Caminaga RM, Brito JR. RB, Line SRP. MMP1 promoter polymorphism: association with chronic periodontitis severity in a brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2003;30:154-8.
137. Srivastava P, Mandhani A, Kapoor R, Mittal RD. Role of MMP-3 and MMP-9 and their haplotypes in risk of bladder câncer in North indian cohort. *Ann Surg Oncol*. 2010;10:1153-6.
138. Stricklin GP, Jeffrey JJ, Roswit WT, Eisen AZ. Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. *Biochemistry*. 1983;22:61-8.
139. Tasci AI, Tugcu V, Ozbek E, Ozbay B, Simsek A, Koksall V. A single-nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances bladder câncer susceptibility. *BJU Int*. 2008;101:503-7.
140. Taylor Se, Vaughan-Thomas A, Clements DN, et al. Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009;26:10-27.
141. Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, Matsuda Y, Takai E, Iwai C, Kurogane H, Yoshida Y, Yokoyama M. Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction. *Circulation*. 1999;99(21):2717-9.
142. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF, Thompson MW. Thompson & Thompson: genetics in medicine. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 1991.
143. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for pcr amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000;18:6-9.
144. Vairaktaris E, Yapijakis C, Vasiliou S. Association of -1171 promoter polymorphism of matrix metalloproteinase-3 with increased risk for oral cancer. *Anticancer Res*. 2007;27:4095-100.
145. Van Wart HE, Birkedal-Hanssen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87:5578-82.

146. Vihinen P, Koskivuo I, Syrjänen K, Tervahartiala T, Sorsa T, Pyrhönen S. Serum matrix metalloproteinase-8 is associated with ulceration and vascular invasion of malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2008;18:268-73.
147. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. 1996 Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1996;6:391-411.
148. Wahlgren J, Maisi P, Sorsa T, Sutinen M, Tervahartiala T, Pirilä E, Teronen O, Hietanen J, Tjäderhane L, Salo T. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol.* 2001;194:217-24.
149. Wang CH, Lin HC, Lin SM, Huang CD, Liu CY, Huang KH, Hsieh LL, Chung KF, KUO HPMMP-1(-1607G) polymorphism as a risk factor for fibrosis after pulmonary tuberculosis in Taiwan. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14(5):627-34.
150. Wang H, Parry S, Macones G. Functionally significant SNP MMP8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Hum Mol Genet.* 2004;13:2659-69.
151. Weinberg W. Sur Vererbung des Zwergwuchses. *Arch. Rassen. Ges. Biol.* 1912;9:710-17.
152. Williams R. Chronic non-specific tendovaginitis of the tibialis posterior. *J Bone Joint Surg.* 1963;45-B(3):542-5.
153. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991;8:2145-54.
154. Woo M, Park K, Nam J, Kim JC. Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:1064-70.
155. Wu S, Lu S, Tao H, Zhang L, Lin W, Shang H, Xie J. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis

- of early stage cervical cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2011;31(1):114-9.
156. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem.* 1996;271:13055-60.
157. Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM, Genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J.* 1995;73:209-15.
158. Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res.* 2006;69:636-45.
159. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000;19:623-39.
160. Yeh YC, Cheng HC, Chang WL, Yang HB, Sheu BS. Matrix metalloproteinase-3 promoter polymorphisms but not dupA-H. pylori correlate to duodenal ulcers in H. pylori-infected females. *BMC Microbiol.* 2010;10:218.
161. Yoon S, Tromp G, Vongpunsawad S, Ronkainen A, Juvonen T, Kuivaniemi H. Genetic analysis of MMP3, MMP9, and PAI-1 in Finnish patients with abdominal aortic or intracranial aneurysms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265:563-8.
162. Yuan HY, Tang Y, Liang YX, Lei L, Xiao GB, Wang S, Xia ZL. Matrix metalloproteinase-3 and vitamin d receptor genetic polymorphisms, and their interactions with occupational exposure in lumbar disc degeneration. *J Occup Health.* 2010;52:23-30.
163. Zhou X, Gao Y, Johnson NW, Gao J. Immunoexpression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue. *Aust Dent J.* 2010;55:385-9.
164. Zinzindohoué F, Lecomte T, Ferraz JM, Houllier AM, Cugnenc PH, Berger A, Blons H, Laurent-Puig P. Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3

- functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(2 pt 1):594-9.
165. Ziober BL, Turner MA, Palefsky JM, Banda MJ, Kramer RH. Type I collagen degradation by invasive oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2000;36:365.