
Maurício Pinto Rodrigues

**Influência de polimorfismos genéticos em metaloproteínas na
Moléstia de Dupuytren**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Rames Mattar
Júnior

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Mauricio Pinto
Influência de polimorfismos genéticos em
metaloproteinases na Moléstia de Dupuytren /
Mauricio Pinto Rodrigues. -- São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientador: Rames Mattar Junior.

Descritores: 1.Contratura de dupuytren
2.Metaloproteases 3.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-247/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Waldemar (*in memorian*) e Maria Luiza (*in memorian*) pelo amor, carinho e dedicação ao longo dos anos que pude desfrutar de seus ensinamentos, passando seus valores que moldaram meu caráter e permitiram conquistar frutos tanto na vida pessoal quanto profissional.

Aos meus sogros Vládir (*in memorian*) e Arabela pela fundamental ajuda na criação das minhas filhas, um “porto seguro” em minha caminhada profissional.

À minha esposa Fernanda, também “mãe”, amiga, médica... Te amo!

Às minhas filhas Juliana e Victória, frutos desse grande amor.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes que participaram deste estudo e contribuíram para o progresso da ciência.

Aos Professores Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho, Olavo Pires de Camargo e Gilberto Luís Camanho pela oportunidade da realização deste trabalho em minha casa, o Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT–HC–FMUSP).

Ao Professor Rames Mattar Júnior, pela sua luta na criação do Grupo de Reimplantes do IOT-HC FMUSP, o que permitiu meu retorno para minha casa, e pela sua grande ajuda na elaboração do projeto, orientação e apoio na execução deste trabalho.

Aos Drs. Leandro Yoshinobu Kiyohara e Danielle Tiemi Simão pela parceria e amizade em todos estes anos nos plantões, principalmente durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Rosa de Rezende e ao Dr. Teng Hsiang Wei, chefes do Grupo de Mão e Microcirurgia do IOT–HC–FMUSP pela amizade e apoio por todos estes anos.

Aos Drs. Emygdio José Leomil de Paula e Luiz Koiti Kimura pelos constantes ensinamentos desde minha residência até os dias atuais.

À Profa. Maria Cristina Godoy dos Santos pela análise dos polimorfismos e auxílio na elaboração deste trabalho.

Às bibliotecárias do IOT-HC-FMUSP Andressa da Costa Santos Souza e Camila Gomes da Rocha Agostini pela ajuda na pesquisa da literatura, formatação da dissertação e submissão do artigo científico.

Aos demais colegas do Grupo de Mão e Microcirurgia do IOT-HC-FMUSP pelo companheirismo por todos estes anos, fazendo do nosso grupo uma verdadeira família.

Aos Drs. Hugo Alberto Nakamoto e Marina Tommasini Carrara de Sambuy pela parceria e convívio no ambulatório de Dupuytren.

A Deus.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Nome das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica, aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia - CTA-SBA. 1ª ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole; 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5ª edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto nº 6583/2008.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVO.....	7
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3.1 Moléstia de Dupuytren.....	9
3.2 Metaloproteinases da matriz.....	11
3.3 Metaloproteinases da matriz e moléstia de Dupuytren.....	15
3.4 <i>Single nucleotide polymorphism</i> (SNP).....	18
3.5 <i>Single nucleotide polymorphism</i> (SNP) e moléstia de Dupuytren.....	19
4 MÉTODOS.....	24
4.1 Obtenção do DNA.....	25
4.2 Extração do DNA.....	25
4.3 Técnicas de PCR e RFLP.....	26
4.4 Determinação do genótipo.....	27
4.5 Eletroforese.....	29
4.6 Análise estatística dos resultados.....	31
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	37

7	CONCLUSÃO.....	43
8	ANEXOS.....	45
9	REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Genótipos da MMP-1 (-1607).....	30
Figura 2	Genótipos da MMP-2 (-1306).....	30
Figura 3	Genótipos da MMP-13 (-77).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações sobre as condições da técnica de PCR.....	27
Tabela 2	Informações sobre as enzimas de restrições e os alelos obtidos.....	28
Tabela 3	Dados epidemiológicos.....	33
Tabela 4	Frequência dos SNPs dos genes MMP-1 (rs1799750), MMP-2 (rs243865) e MMP-13 (rs2252070) nos grupos controle e teste.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
C	Citosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gravidade
G	Guanina
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
mA	Miliampere
MD	Moléstia de Dupuytren
MEC	Matriz extracelular
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase da matriz
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nmol	Nanomol
°C	Grau Celsius
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico

RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
T	Timina
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TIMP	Inibidoras teciduais das metaloproteinases
Tri	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Volts
W	Watt

RESUMO

Rodrigues MP. *Influência de polimorfismos genéticos em metaloproteinases na Moléstia de Dupuytren* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: Na Moléstia de Dupuytren, o aumento da expressão tecidual das metaloproteinases da matriz foi demonstrado. Polimorfismos genéticos nas regiões promotoras dos genes codificadores destas enzimas podem influenciar neste aumento. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos (-1607) da MMP-1, (-1306) da MMP-2 e (-77) da MMP-13 na Moléstia de Dupuytren. **MÉTODOS:** Avaliamos um grupo de 50 pacientes com diagnóstico clínico de Moléstia de Dupuytren e pareamos, segundo idade e sexo, com um segundo grupo de 100 pacientes sem o diagnóstico clínico. O DNA foi obtido através de amostras de saliva de todos os pacientes e os genótipos através das técnicas de PCR e RFLP. A análise estatística foi realizada através do teste qui-quadrado com nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** Em relação ao polimorfismo da MMP-1, encontramos, no grupo controle o alelo 1G e o genótipo 1G/1G em 69,5% e 47% respectivamente, enquanto no grupo teste, 54% e 26% ($p=0,011$ e $0,024$). Na MMP-13, o alelo A em 63,5% no grupo controle e 76% no grupo teste ($p=0,040$). No grupo teste, o genótipo A/A foi observado em 58% dos casos, enquanto no grupo controle, o genótipo A/G foi o mais observado (61%), com $p = 0,011$. Não houve diferença estatística em relação ao polimorfismo estudado da MMP-2. **CONCLUSÃO:** o polimorfismo das regiões promotoras dos genes das metaloproteinases MMP-1 (-1607) e MMP-13 (-77) estão relacionados à Moléstia de Dupuytren.

Descritores: Contratura de Dupuytren; Metaloproteinases; Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Rodrigues MP. *Influence of genetic polymorphisms on metalloproteinases in Dupuytren's disease* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: In Dupuytren's disease, increased tissue expression of matrix metalloproteinases (MMPs) has been demonstrated. Genetic polymorphisms within genes promoter regions of these enzymes may influence this increase. The purpose of this study was to evaluate the influence of the polymorphisms MMP-1 (-1607), MMP-2 (-1306) and MMP-13 (-77) in Dupuytren's disease. **METHODS:** A group of 50 patients were evaluated with a clinical diagnosis of Dupuytren's disease and matched, according with age and gender, with a second group of 100 patients without the clinical diagnosis. DNA was obtained through saliva samples from all patients and genotypes through Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) techniques. Statistical analysis was carried out through the chi-square test with significance level of 5%. **RESULTS:** In the control group, allele 1G and genotype 1G/1G were found 69.5% and 47% respectively, while in the test group 54% and 26% ($p=0.011$ and 0.024). In MMP-13, allele A was 63.5% in the control group and 75% in the test group ($p=0.040$). In the test group, genotype A/A was observed in 58% of the cases, while in the control group, genotype A/G was the most observed (61%), with $p = 0.011$. There was no statistical difference from the studied on polymorphism MMP-2. **CONCLUSION:** The polymorphism of the genes promoter regions of MMP-1 metalloproteinases (-1607) and MMP-13 metalloproteinases (-77) are related to Dupuytren's disease.

Descriptors: Dupuytren contracture; Metalloproteases; Polymorphism, Genetic.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Moléstia de Dupuytren (MD) é uma fibromatose da fáscia palmar mediada por contração de miofibroblastos, levando a uma deformidade progressiva em flexão das articulações metacarpofalângicas e interfalângicas proximais dos dedos.

A fáscia palmar é uma aponeurose com formato triangular na região palmar e central da mão. Tem o ápice proximal e a base distal e se localiza logo abaixo da pele e do tecido subcutâneo, estendendo-se até os dedos. Constitui um complexo com fibras longitudinais, transversais e verticais. A função desse sistema é a fixação da pele aos planos mais profundos, qualidade esta importante para o ato de preensão dos objetos¹.

A apresentação clínica inicial da MD geralmente é de um nódulo fibroelástico, firme, aderido à pele e à fáscia palmar e localizado ao redor da prega palmar distal. Com a progressão da doença, aparece a contratura causada pelas cordas, levando à deformidade clássica em flexão das articulações metacarpofalângicas e interfalângicas proximais com o acometimento mais frequente dos dedos anelar e mínimo².

A MD pode acontecer na forma ectópica. Nesta, a apresentação mais frequente são os nódulos dorsais na articulação interfalângica proximal (Garrod), que podem ser a primeira manifestação da doença e raramente levam a contraturas. Outras formas podem ser a fibromatose plantar (Moléstia de Ledderhose) e a peniana (Moléstia de Peyronie)³.

Dois tipos clínicos foram descritos: o paciente considerado típico é um homem branco, caucasiano, do norte europeu, em torno da sexta década de vida, com acometimento bilateral, assimétrico, com aproximadamente 10 anos de evolução, progressivo e com mais de um dedo envolvido, geralmente com história familiar. Por outro lado, no paciente atípico, os dados de idade, sexo e grupo étnico são irrelevantes. O

paciente pode ter história de trauma, diabetes, alcoolismo ou epilepsia com uso de medicação anticonvulsivante. Geralmente é uma apresentação menos progressiva e sem história familiar⁴.

A chamada diátese de Dupuytren, inicialmente descrita por **Hueston**⁵ e depois revista⁶, inclui fatores como: início precoce da doença (abaixo dos 50 anos), sexo masculino, acometimento bilateral, história familiar e acometimento ectópico (nódulos de Garrod). A presença desses fatores está relacionada com uma maior gravidade da doença e uma maior taxa de recidiva pós-operatória.

A prevalência da MD varia de 0,2 a 56% dependendo da faixa etária, população estudada e método de coleta dos dados. A proporção homem:mulher é de aproximadamente 6:1, aproximando-se de 1:1 na nona década de vida. Acomete homens geralmente uma década mais cedo do que as mulheres (quinta x sexta décadas)⁷. Mulheres têm uma maior incidência da chamada *flare reaction* (uma variante da Síndrome Dolorosa Complexa Regional)⁸.

A etiologia da MD ainda é incerta. A associação com diabetes^{9,10}, alcoolismo/doença hepática^{11,12}, epilepsia¹³, trauma¹⁴ e tabagismo^{15,16} é demonstrada em vários trabalhos, com controvérsias¹⁷⁻¹⁹. Alguns relatos isolados de casos de MD em gêmeos idênticos²⁰, e estudos com busca ativa de familiares de pacientes acometidos, sugeriram uma causa genética para a MD²¹.

A contratura da fásia palmar é mediada por uma alteração celular encontrada nos nódulos e cordas, que é a presença do miofibroblasto²². O fibroblasto normalmente presente no tecido conectivo possui uma quantidade pequena de fibras de actina dispersas principalmente próximo da membrana celular e o seu núcleo é arredondado. Já o miofibroblasto passa a expressar uma quantidade muito maior de fibras de actina, do tipo alfa, dispostas em feixes, semelhantes às encontradas na fibra muscular lisa vascular²³.

Seu núcleo passa a ter um formato com indentações/sulcos, sugerindo um processo de contração²⁴.

Associada à atividade contrátil do miofibroblastos, a remodelação da matriz extracelular (MEC), mediada por enzimas conhecidas como metaloproteinases da matriz (MMP), é de fundamental participação na fisiopatologia da MD²⁵.

As MMPs constituem uma família de 23 enzimas conhecidas até o momento que são capazes de degradar praticamente todos os componentes da MEC, incluindo o colágeno tipo I (que é o principal componente da fáscia palmar) e o colágeno tipo III (que aumenta sua proporção consideravelmente na fáscia acometida pela MD).

A homeostase da MEC é garantida por ritmos iguais de deposição e retirada do colágeno, esta última atividade mediada pelas MMPs. Um desbalanço pode levar, quando predomina a retirada, aos quadros de tendinopatias, como por exemplo a do tendão tibial posterior²⁶ e a do manguito rotador do ombro²⁷. Quando predomina a deposição, podemos observar os processos fibróticos como a MD e a capsulite adesiva do ombro²⁸. Um dos motivos para esse desequilíbrio pode ser uma variação nos genes responsáveis pela produção das MMPs, alterando o grau de atividade dessas enzimas.

O DNA humano, já mapeado graças ao Projeto Genoma Humano^{29,30}, possui em torno de 3,2 bilhões de pares de bases (pb) de nucleotídeos e, de toda essa sequência, 99,9% é exatamente idêntica entre dois indivíduos. As variações genéticas, restritas geralmente ao 0,1% restante, são frequentes, e a mais comum é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP - *single nucleotide polymorphism*), correspondendo a 90% das variações. O SNP é definido quando existe uma troca ou deleção/inserção de uma base na sequência e o alelo de menor frequência ocorre em pelo menos 1% da população. Estima-se a ocorrência de aproximadamente um SNP a cada 1000 pb, com cerca de três milhões de SNPs conhecidos atualmente que, em sua maioria, são funcionalmente

neutros^{31,32}.

Entretanto, uma pequena parte pode interferir na regulação da expressão gênica ou na função da proteína codificada, tornando o indivíduo mais ou menos suscetível a doenças³³.

Estudos já demonstraram a expressão tecidual aumentada das MMPs -1, -2 e -13 nos nódulos e cordas obtidos de pacientes operados pela MD^{34,35}. Outros estudos demonstraram a participação das MMPs na contração de fibroblastos *in vitro*³⁶.

Pela quantidade de SNPs já conhecidos e pelo papel desempenhado pelas MMPs -1, -2 e -13 na remodelação da MEC e na MD, a associação de SNPs das MMPs com a MD pode ajudar no entendimento da etiologia e abrir novas possibilidades no tratamento dessa afecção.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Investigar a influência dos polimorfismos funcionais das regiões promotoras dos genes das metaloproteinases MMP-1 (-1607) (rs1799750), MMP-2 (-1306) (rs243865) e MMP-13 (-77) (rs2252070) na Moléstia de Dupuytren e, assim, defini-los como possíveis marcadores genéticos relacionados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Moléstia de Dupuytren

Elliot (1999)^{37,38} cita que a primeira referência à MD é feita por Felix Plater em 1614, associando a contratura em flexão ao trauma dos tendões flexores. Ainda segundo Elliot, Henry Cline Senior, em 1777, diseca uma mão acometida pela moléstia e observa a fásia palmar espessada. O autor refere ainda que Sir Astley Cooper (aluno de Cline), em 1822, atribui a causa da doença ao espessamento da fásia e sugere que ela pode ser tratada com a fasciotomia.

Baron Guillaume Dupuytren (1833)³⁹ descreve o padrão anatômico da fásia palmar, com as bandas acometidas e propõe a ressecção de cada uma delas durante a liberação cirúrgica com preservação do feixe vasculonervoso.

Luck (1959)⁴⁰ propõe uma classificação histológica da doença:

1. Fase proliferativa: é o início da doença, com a formação dos nódulos.

Tomasek et al. (1986)⁴¹ observam nessa fase a transformação de fibroblastos em miofibroblastos, com o aparecimento de microfilamentos de actina organizados em feixes que estão paralelos ao eixo das células, assemelhando-se a uma fibra muscular lisa.

2. Fase involucional: há um alinhamento dos miofibroblastos com as linhas de estresse do tecido, iniciando a contratura dos microfilamentos. **Schultz et al. (1990)**⁴² afirmam que nessa fase há uma conexão das fibras intracelulares com as fibras de fibronectina da matriz extracelular, causando uma contratura ainda maior.

3. Fase residual: há uma diminuição da celularidade, com predomínio de tecido fibroso formado por fibras colágenas tipo I e III.

Ling (1963)²¹ faz um levantamento de parentes de pacientes com MD e destaca que o fator genético tem sido amplamente estudado, desde Goyrand em 1833, que é o primeiro a sugerir que a MD poderia ter uma apresentação familiar. O autor comenta que Stackenberg, em 1932, e Schröder, em 1934, sugerem uma herança dominante em um terço das famílias investigadas; cita ainda a existência de relatos na literatura de acometimento de gêmeos, como Schröder em 1934, Jentsch em 1937, **Couch em 1938**²⁰ e Then Bergh 1939, reforçando a hipótese da participação do fator genético na gênese da MD.

Brickey-Parsons et al. (1981)⁴³ demonstram que o colágeno tipo III normalmente está ausente na fáscia normal, mas presente na fáscia do paciente com MD, mesmo sem a contratura.

Hueston (1984)⁴⁴ observa que pacientes com história familiar, idade de início da afecção abaixo dos 50 anos, acometimento bilateral e em regiões ectópicas, como o dorso das articulações interfalângicas ou a planta do pé, apresentam quadros mais graves e com uma chance maior de recidiva. O autor denomina esse conjunto de características de diátese e define o tempo ideal para o tratamento cirúrgico quando o paciente não consegue apoiar mais por completo a mão espalmada numa mesa (*table top test* positivo).

Tubiana (1986)⁴⁵ modifica e completa sua classificação previamente publicada em 1961. O autor define uma classificação que considera a contratura em flexão de cada raio da mão, somando-se os valores obtidos nas articulações metacarpofalângicas, interfalângicas proximais e distais. Nos casos de hiperextensão da interfalângica distal, esse valor também é somado; temos, então, quatro estágios: I (quando a somatória fica entre 0° e 45°), II (45° a 90°); III (90° a 135°) e IV (acima de 135°).

Burge (1999)⁴⁶ formula a hipótese de um traço complexo envolvido na gênese da MD, condicionando isso a quatro fatores: heterogeneidade genética, penetrância incompleta, fenocópias e herança poligênica. O autor ainda exemplifica que doenças como coronariopatias, diabetes, hipertensão e câncer possuem o mesmo padrão de complexidade.

Lam et al. (2010)⁴⁷ propõem a mesma classificação de Luck, baseando-se na relação entre os colágenos tipo III e I. Assim, na fase proliferativa encontramos colágeno tipo III acima de 35%, na involucional entre 20 e 35% e na residual abaixo de 20%.

Shih et al. (2010)⁴⁸ dizem ser incerto se a MD é uma condição monogênica mendeliana ou oligogênica complexa. Outras alterações propostas são mutações genéticas, rearranjo genômico, polimorfismos ou variações do número de cópias.

3.2 Metaloproteinases da matriz

Gross e Lapiere (1962)⁴⁹ são os primeiros a descreverem a atividade colagenolítica durante a metamorfose em girinos. Adicionam células da cauda, brânquias e intestino a um gel de colágeno previamente preparado, extraído de cobaias e observa a atividade lítica no gel. Os autores concluem considerando improvável que uma quantidade apreciável de uma enzima capaz de degradar elementos estruturais importantes seja amplamente distribuída na forma ativa.

Eisen et al. (1968)⁵⁰ demonstram atividade colagenolítica em cultura de pele humana, relatam que essa enzima atua na forma fibrilar nativa do colágeno a 37° com pH ótimo de 7,0 a 8,0. Através de eletromicrografia, os autores encontram como resultante da digestão dois fragmentos: um maior com 75% do tamanho original e outro de 25%.

Bauer et al. (1970)⁵¹, através de cultura de pele humana, identificam dois tipos de colagenases através da eletroforese em gel de poliacrilamida, nomeando-as “fast-moving” e “slow-moving”. Por reação imunológica, os autores encontram semelhança entre estas colagenases e aquelas obtidas através de preparação de gengiva e sinovial humanas e concluem se tratar de proteínas muito parecidas.

Goldberg et al. (1986)⁵² identificam a sequência de aminoácidos da colagenase extraída da pele humana (mais tarde nomeada como colagenase 1 ou MMP-1), assim como do DNA relacionado a essa enzima. Os autores relatam que a presença de três resíduos de cisteína e a perda de 81 aminoácidos da porção aminoterminal estão envolvidos na ativação da enzima.

Spurr et al. (1988)⁵³ localizam as até então conhecidas colagenase (MMP-1) e estromelina (MMP-3) no cromossomo 11 (11q21-22.1 e 11q22.2-22.3 respectivamente). Os autores comentam a existência de oncogenes já conhecidos nessa mesma região cromossômica, e que os seus mapeamentos poderiam ter utilidade futuramente.

Collier et al. (1988)⁵⁴ descrevem a sequência de uma enzima secretada na forma latente com 72 kDa e com ação preferencial na degradação de gelatina, colágenos tipos IV, V e VII e fibronectina, nomeando-a de 72kDa colagenase IV. Essa enzima possui um domínio aminoterminal com 192 aminoácidos e um carboxiterminal com 254 aminoácidos, comuns às MMPs até então conhecidas, difere na presença de um domínio central com três motivos iguais de 58 aminoácidos cada de ligação para fibronectina. Os autores consideram a enzima como uma gelatinase, classificada posteriormente como a gelatinase A (MMP-2).

Collier et al. (1991)⁵⁵ localizam o gene da até então denominada 72kDa colagenase IV (MMP-2) no braço longo do cromossomo 16 (16q13). Os autores observam que esse gene possui 13 exons, 3 a mais que a maioria das MMPs, que estão relacionados com os

domínios de fibronectina, característicos das gelatinases. Os autores destacam ainda que o *turnover* do colágeno é geralmente lento, mas aumenta drasticamente em situações de remodelação do tecido conectivo, involução uterina, reabsorção óssea e cicatrização de feridas.

Freije et al. (1994)⁵⁶ codificam a sequência de 471 aminoácidos de uma nova colagenase que identifica como 3 (MMP-13), obtida através de cDNA (complementar) de células de carcinoma mamário. Os autores não observam sua presença em células normais da placenta, próstata, glândula mamária, entre outros tecidos, e concluem que essa enzima possui um papel fundamental nesse tipo de câncer, podendo ser utilizada como marcador ou mesmo alvo de inibição seletiva.

Aimes e Quigley (1995)⁵⁷ mostram que a MMP-2 (75 kDa gelatinase A) é secretada no ambiente extracelular e digere os colágenos tipos I ao V, bem como a fibronectina, elastina e a porção central de algumas proteoglicanas, dentre elas a decorina.

Pendas et al. (1997)⁵⁸ isolam e codificam o gene da colagenase 3 (MMP-13), localizam-no no braço longo do cromossomo 11 (11q22), num agrupamento de genes de outras MMPs (1, 7 e 12) identificados também até então. Este gene possui 10 exons e 9 introns, com uma sequência de 12,5 kb. Os autores comentam que essa enzima tem maior afinidade para a degradação do colágeno tipo II, atuando também nos tipos I e III, além de alguma atividade de gelatinase.

Nagase e Woessner (1999)⁽⁵⁹⁾, numa revisão, atualizam a família das MMPs, classificando em 6 subtipos: colagenases (MMP-1, -8 e -13); gelatinases (MMP-2 e -9); estromelinas (MMP-3, -10 e -11); matrinas (MMP-7 e -26); as tipomembranas MT-MMP (MT-MMP 1 a 6 ou MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25) e o grupo “outros” (MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27 e -28), somando 23 no total.

Brew et al. (2000)⁽⁶⁰⁾ citam que as MMPs possuem inibidoras teciduais, as TIMPs

(*tissue inhibitors of metalloproteinases*), que se ligam numa relação estequiométrica de 1:1. Quatro TIMPs já foram identificadas (TIMP-1, -2, -3 e -4). Em condições patológicas associadas a uma atividade anormal das MMPs, alterações nos níveis das TIMPs são consideradas relevantes pois podem interferir diretamente na atividade das MMPs.

Chang e Werb (2001)⁶¹ comentam que as MMPs participam em processos fisiológicos e patológicos como remodelação tecidual, desenvolvimento dos órgãos, cicatrização de feridas, neovascularização, invasão celular inflamatória, infiltração tumoral e metástases.

Ulrich et al. (2003)⁶² definem que as MMPs são endopeptidases dependentes de zinco produzidas por alguns tipos de células envolvidas na reparação tecidual, como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e queratinócitos.

Visse e Nagase (2003)⁶³ definem que a estrutura das MMPs, apesar de conter pequenas variações entre os subtipos, consta de uma sequência inicial mais um pró-domínio, um domínio catalítico, um domínio articulado e um domínio C-terminal de hemopexina. Sob condições fisiológicas normais, sua atividade é precisamente regulada no nível de transcrição da proteína, ativação de zimógenos precursores (pró-formas), interação com componentes específicos da MEC e inibição por inibidores endógenos.

Tardif et al. (2004)⁶⁴ demonstram que a MMP-13 degrada o colágeno tipo II mais efetivamente do que os tipos I e III, além de ter uma atividade gelatinolítica mais acentuada que as MMP-1 e -8. Sua forma latente é ativada pela MMP-2, -3, -10, -14 e -15, tripsina e plasmina. É inibida principalmente pelas TIMP-1 e -3. A MMP-13 ativa a forma latente da MMP-2.

Amälinei et al. (2007)⁶⁵ relatam que a MMP-1 atua na digestão dos colágenos tipos I, II e III, num ponto específico com surgimento de dois fragmentos: um C-terminal de $\frac{1}{4}$ e o outro N-terminal de $\frac{3}{4}$, que rapidamente desnaturam para gelatina na temperatura do

corpo e se tornam suscetíveis a degradação por outras MMPs, como as gelatinases 1 e 2 (MMP-2 e -9 respectivamente). Sua ativação plena é dependente da ação de outra MMP, a estromelisina 1 (MMP-3).

Hadler-Olsen et al. (2011)⁶⁶ observam que a maioria das MMPs é secretada na forma de pró-enzima e sua ativação ocorre no espaço peri e extracelular. Dois mecanismos estão envolvidos nessa ativação: a) uma atividade proteolítica, com clivagem e remoção do pró-domínio ou b) uma ativação alostérica, com um deslocamento do pró-domínio em relação ao sítio catalítico, sem clivagem.

3.3 Metaloproteinasas da matriz e moléstia de Dupuytren

Hutchinson et al. (1998)²⁸ descrevem uma série de 24 pacientes com carcinoma gástrico inoperável, tratados com um inibidor sintético de amplo espectro das MMPs, chamado Marismatat. Após 1 mês, 12 pacientes com uma resposta considerada satisfatória, continuaram com o tratamento. Após 4 meses, 3 pacientes desenvolveram um quadro semelhante à MD associado à capsulite adesiva e outros 3 desenvolveram apenas capsulite adesiva. Os autores sugerem que uma diminuição na relação MMP/TIMP favorece o aparecimento de processos fibróticos, como a capsulite adesiva e a MD.

Ulrich et al. (2003)⁶⁷ avaliam o nível sérico e a presença tecidual através da imunohistoquímica das enzimas MMP-1, -2 e -9 e TIMP-1 e -2, comparando 22 pacientes com MD (5 mulheres e 17 homens) com 20 pacientes (13 mulheres e 7 homens) submetidos ao tratamento cirúrgico para a síndrome do túnel do carpo. Encontram nível sérico elevado nos pacientes com MD apenas da TIMP-1 e presença tecidual aumentada

das TIMP-1 e -2 nos pacientes com MD. A razão MMP/TIMP nos pacientes com MD se encontra diminuída e eles concluem que a perda neste equilíbrio pode representar uma via importante na fisiopatologia desta doença.

Augoff et al. (2006)⁶⁸ analisam a razão da ativação da MMP-2 (MMP-2 ativa/pró-MMP-2), comparando a fásia de 71 pacientes (62 homens: 9 mulheres) operados com MD, com 16 pacientes (13 mulheres: 3 homens) operados para liberação do túnel do carpo. Através de zimografia em gel, os autores encontram um índice médio de ativação no grupo com MD de 0,51 e no grupo controle de 0,075 e sugerem também que parte da ação da forma ativa da MMP-2 pode ser através da ativação do TGF- β_1 , degradando a decorina que faz parte da forma latente desta proteína.

Johnston et al. (2007)³⁴ traçam um perfil completo da expressão tecidual das MMPs, suas inibidoras TIMPs, e ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motif*). Os autores comparam a fásia de 20 pacientes com MD operados e retiram amostras dos nódulos e cordas, criando um grupo para cada tipo de amostra e um terceiro grupo com fásia normal (controle) de 20 pacientes operados para liberação do túnel do carpo. Os autores encontram um aumento da expressão das MMP-1, -2, -13 e -14, assim como da TIMP-1 no nódulo comparativamente à fásia normal. Destacam que, à semelhança da fibrose hepática, o processo de deposição de colágeno na MD ocorre apesar do aumento na expressão de algumas MMPs e correlacionam esse fato ao aumento proporcionalmente maior na expressão da TIMP-1, que inibe a atividade colagenolítica e resulta na perda da homeostase da MEC.

Johnston et al. (2008)⁶⁹ seguem os pacientes operados no trabalho acima por 14 meses e correlacionam o nível de expressão de várias MMPs (entre elas as MMP-2 e -13) com o desfecho clínico (contratura fixa de dedo). Os autores concluem que níveis maiores de expressão estão relacionados com contraturas mais acentuadas e sugerem que esta

informação poderia ser útil no aconselhamento de pacientes quanto ao planejamento cirúrgico e prognóstico pós-operatório.

Townley et al. (2008)⁷⁰ realizam um estudo experimental, obtendo 5 pares (nódulo e corda) de amostras de fâscias de pacientes com MD submetidos a tratamento cirúrgico de fasciectomia e, como controle, 5 amostras de fâscias de pacientes operados para liberação do túnel do carpo, formando de 3 grupos. Os autores coletam fibroblastos de todas as peças e cultivam individualmente numa rede 3D de colágeno, para reproduzir a interação entre células e MEC, e observam que, após 48h, nos três grupos houve uma contração desta estrutura, estatisticamente maior no grupo dos fibroblastos oriundos dos nódulos. Numa segunda etapa, repetindo esse mesmo processo, porém com a aplicação de um inibidor sintético e não seletivo de MMPs, o ilomastat, os autores observam uma redução na contração nos três grupos, sem diferença estatística. Nesse mesmo trabalho, os autores quantificam a produção e a atividade de MMP-1, -2 e -14 e encontram que com o inibidor, a produção destas enzimas não se altera. Entretanto, ocorre uma diminuição na atividade das MMP-1 e -2 e um aumento na MMP-14. Os autores concluem que estas enzimas podem regular a contração celular e que a inibição poderia reduzir a contração observada clinicamente na MD.

Wilkinson et al. (2012)³⁶ analisam, através de cultura de fibroblastos extraídos de fâscias palmares ressecadas no tratamento cirúrgico de pacientes com MD, que apenas com a inibição das MMP-2 e -14 conseguimos evitar a contração dos fibroblastos nesse modelo. Os autores concluem que as MMP-2 e -14 são enzimas chaves nesse processo e sugerem que a inibição seletiva dessas enzimas pode representar uma opção no tratamento não cirúrgico ou na prevenção de recidivas pós-operatórias.

3.4 *Single nucleotide polymorphism (SNP)*

Crow (2000)⁷¹ cita que a sequência do DNA (*deoxyribonucleic acid*) é aproximadamente 99,9% idêntica entre dois indivíduos. A outra pequena parte variável é responsável pelas diferenças genéticas entre os indivíduos. Algumas sequências do DNA não têm praticamente nenhum efeito no fenótipo, enquanto outras são responsáveis diretamente na causa de doenças. Portanto, dentre as alterações genéticas, transitamos de um extremo com as doenças ditas genéticas, passando por alterações que podem levar à suscetibilidade a determinadas doenças e chegando ao outro extremo com alterações de relevância desconhecida. As variações genéticas são divididas em genômica (com alteração do número de cromossomos), cromossômica (com alteração da estrutura de um determinado cromossomo) e genética (com alterações individuais de genes).

Rutter et al. (1998)⁷² descrevem o polimorfismo na região promotora do gene da MMP-1, na posição -1607 e relatam que a inclusão de uma base de guanina cria um local para a ligação da enzima de transcrição ETS-1. Os autores concluem que o polimorfismo com a inclusão (2G) contribui para uma maior transcrição do gene e, conseqüentemente, para uma maior expressão tecidual e atividade da MMP-1, com envolvimento em lesões irreversíveis de cartilagem, tendão e osso em artrites e degradação do colágeno I e III nos processos de invasão tumoral e metástase.

Price et al. (2001)⁷³ descrevem o polimorfismo na região promotora do gene da MMP-2 na posição -1306, com a substituição da base citosina pela timina, criando os alelos C e T e observa que o alelo T possui uma atividade promotora menor, com a abolição de um sítio para ligação do fator de transcrição Sp1 (*stimulating protein 1*), acarretando uma menor expressão desta enzima. Os autores sugerem a enzima como uma candidata importante na associação com processos patogênicos, como aterosclerose e

invasão tumoral e metástases.

Yoon et al. (2002)⁽⁷⁴⁾ descrevem o polimorfismo na região promotora do gene da MMP-13 na posição- 77, com substituição da base adenina (A) pela base guanina (G). Os autores estudam a associação da aterosclerose da aorta abdominal em jovens subdivididos em quatro grupos (homens e mulheres pretos e homens e mulheres brancos) e encontram correlação apenas no grupo dos homens pretos. Neste mesmo estudo, os autores demonstram que a atividade transcricional com o alelo A é duas vezes maior do que com o alelo G.

3.5 *Single nucleotide polymorphism* (SNP) e moléstia de Dupuytren

Bayat et al. (2002)⁽⁷⁵⁾ fazem o primeiro relato de SNP na MD. Este se encontra no fator de transcrição Zf9 do gene TGF- β_1 , uma citocina fibrogênica que estimula a proliferação de fibroblastos e a deposição de MEC.

Bayat et al. (2003)⁽⁷⁶⁾ estudando o SNP nos receptores do tipos I, II e III do TGF- β_1 , encontram diferença estatística apenas no receptor do tipo I, com uma razão de risco de 2,11 e IC95% (0,94 - 4,97), com p 0,048. Os autores concluem também que esse achado não exclui, direta ou indiretamente, outros polimorfismos genéticos relevantes na MD.

Ojwang et al. (2010)⁽⁷⁷⁾ analisam o DNA obtido através da saliva de 40 pacientes com a MD e de 40 controles. Utilizando um programa de computador que permite a leitura de milhares de SNPs concomitantes, após regressão logarítmica, os autores constatam que os cromossomos 6, 11 e 16 podem ser chaves nas variações genéticas na MD e que estudos futuros poderiam focar nesses 3 cromossomos.

Dolmans et al. (2011)⁷⁸ conduzem um estudo de associação de genoma amplo (*GWAS – Genome-wide Association Study*) para MD em duas etapas: inicialmente analisam 234.939 SNPs de 960 pacientes e 3117 controles, todos holandeses e descendentes de europeus. Selecionam os 35 SNPs mais relacionados com a MD. Numa segunda etapa, reunindo 1365 pacientes e 8445 controles de centros da Holanda, Alemanha e Reino Unido, os autores testam os mais relacionados e encontram 11 SNPs de 9 diferentes *loci*, sendo 4 relacionados com a via sinalizadora Wnt (WNT2, WNT4, WNT7B e RSPO2). Os autores concluem que essa via pode desempenhar um papel importante no estímulo para a proliferação dos fibroblastos da fáscia palmar e que fatores genéticos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da MD.

Dolmans et al. (2012)³ usam os SNPs encontrados no estudo prévio e criam um *score* de risco genético para a MD, separando os pacientes em dois grupos: alto e baixo risco. Os autores encontram correlação estatística entre os pacientes de alto risco e os seguintes fatores de diátese: pacientes com menos de 50 anos, história familiar positiva e a presença de nódulos dorsais nas articulações interfalângicas proximais.

Shih et al. (2012)⁷⁹ conduzem um estudo comparando o DNA obtido do nódulo da fáscia de 25 pacientes operados com o sangue desses mesmos pacientes (controle interno) e com o sangue de 30 controles (controle externo). Os autores analisam um padrão de variação genética conhecido como variação do número de cópias (*CNV – Copy Number Variations*) e encontram diferenças em dois *loci* dos cromossomos 7p14.1 e 14q11.2. No mesmo estudo, através da técnica de síntese de DNA complementar, os autores comparam o nódulo acometido com a fáscia palmar transversa normal do mesmo paciente e encontra uma maior expressão do gene da MMP-14 e do gene SFRP4 – *secreted frizzled-related protein 4* (esse último relacionado com a via Wnt) no nódulo. Concluem que pela proximidade dos genes da MMP-14 e da SFRP4 respectivamente aos *loci* 14q11.2 e

7p14.1, essas duas proteínas têm um papel importante na MD.

Delbniak et al. (2013)⁸⁰ encontram dois SNPs no gene EPDR1 (*ependymin-related protein 1*) com associação à MD. Esse gene é responsável pela produção de uma proteína de membrana celular que parece ser moduladora da via sinalizadora Wnt. Os autores sugerem adicionar esse dado à crescente lista de variações genéticas (incluindo os SNPs) associadas à MD.

Anderson et al. (2014)⁸¹ selecionam de um bio-banco de dados, com DNA de mais de 20.000 pacientes do *Marschfield Clinic Personalized Medicine Research Project*, o material genético de 296 pacientes com MD e 919 controles pareados por sexo e idade. Os autores analisam, numa população americana, os SNPs previamente encontrados por Dolmans (2011) numa população europeia. Conseguem replicar 5 deles e reforçam o papel da via sinalizadora Wnt na MD.

Ng et al. (2017)⁸² em outro estudo multicêntrico de associação de genoma amplo, de um grupo de 3871 casos e 4686 controles, adicionam mais 17 SNPs aos 9 previamente estabelecidos por **Dolmans et al., em 2011**³. Dentre os três serviços participantes, em um deles a obtenção do DNA se deu através da saliva. Os autores acentuam a participação da via sinalizadora Wnt como importante no processo de fibrose, aumentando a expressão das fibras α -SMA (*smooth muscle actin*). Também destacam a remodelação da MEC, com mais 5 SNPs envolvidos, com destaque para os genes DDR2 (*discoidin domain receptor 2*), uma enzima de membrana com afinidade para os colágenos I, III e X. Essa enzima também é modulada pela MMP-13, que faz os autores destacarem a possibilidade de interação da DDR2 com toda via das MMPs. Outro gene destacado é o da MMP-14, evidenciando sua possível interação com a MMP-2.

Riesmeijer et al. (2019)⁸³ calculam um risco genético ponderado, utilizando os SNPs encontrados pelo trabalho acima de **Ng et al. (2017)**⁸². Através de regressão

logarítmica, os autores constatam que o risco de recorrência correlaciona-se com um *score* de risco genético maior, independentemente da associação com o quadro clínico mais agressivo (diátese).

4. MÉTODOS

4 MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT–HC–FMUSP) sob o número 1.136 (**ANEXO A**) e pelo Comitê de Ética da FMUSP sob o número do parecer 2.071.185 (**ANEXO B**).

Após a explicação do trabalho e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO C**), os pacientes (grupo-teste) foram recrutados no Grupo de Mão e Microcirurgia do IOT-HCFMUSP dentre os que estão matriculados no ambulatório de Moléstia de Dupuytren, desde que apresentassem sinais clínicos (nódulos, cordas) ou estivessem em pós-operatório. O grupo-controle foi formado por pacientes em atendimento no Hospital e sem sinais clínicos de fibromatose palmar, plantar (Moléstia de Ledderhose) ou peniana (Moléstia de Peyronie) e sem história familiar da MD.

Este estudo teve parceria com o Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, que realizou a análise do polimorfismo genético (**ANEXO D**). O grupo de pesquisadores envolvidos nesta etapa não teve conhecimento a qual grupo pertencia cada amostra analisada.

No grupo-teste os pacientes foram incluídos e analisados segundo idade, sexo, cor, descendência europeia e associação com as Moléstias de Peyronie e Ledderhose. No grupo-controle os pacientes foram incluídos por conveniência e pareados por sexo, idade e cor ao grupo-teste, na proporção de 2:1.

Foram considerados critérios de não inclusão as presenças de doenças reumatológicas, imunológicas, hepáticas, renais e diabetes.

4.1 Obtenção do 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 e Line (2000)**⁸⁴. 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. Na amostra obtida, foi adicionado 1 ml de solução *TNE* (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 2 mM *EDTA*) e 1 ml de etanol. As amostras foram congeladas a -20°C até o momento de extração do DNA.

4.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada na Universidade Federal do Paraná conforme protocolo de **Aidar e Line (2007)**⁸⁵. Após o descongelamento, as amostras foram centrifugadas 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%). As amostras foram incubadas por 16 horas com 20ng/ml de proteinase K (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA) a 56°C. Foram adicionados 500 µl de solução de acetato de amônio 10 mM com *EDTA* 1mM e vortexado por 5 segundos. Após centrifugação a 17000g por 10 minutos, foi coletado o sobrenadante e foram adicionados 540 µl de isopropanol para cada 900 µl da solução contendo DNA. Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido à lavagem com etanol a 70% e seco por 15 minutos a 37 °C. Foi realizada suspensão do DNA em 100 µl de tampão TE (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), *EDTA* a 1 mM) à temperatura ambiente por 3 horas. A concentração

do DNA genômico de cada amostra foi quantificada com o auxílio de um quantificador de DNA Nanodrop® (ThermoFisher Scientific Incorporation, Waltham, Massachusetts, EUA) e sua pureza estimada pela razão de densidade óptica (OD) 260/280 maior que 1,9.

4.3 Técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

A técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi utilizada para amplificação dos fragmentos das regiões reguladoras dos genes da MMP-1, MMP-2 e MMP-13. A reação de PCR foi realizada no termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) com volume final de 15 µl, sendo: 1 µl de solução contendo aproximadamente 200 ng de DNA, 8 µl de Go Taq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA) e 200 nmol de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada fragmento (*primers*) e quantidade suficiente de água ultrapura. A mistura com todos os reagentes foi submetida a uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C, anelamento a uma temperatura adequada para cada fragmento e extensão a 72 °C, 30 segundos ou 1 minuto em cada temperatura, dependendo do fragmento estudado e, por fim, 72 °C por 10 minutos.

Os oligonucleotídeos iniciadores, a temperatura e o tempo de anelamento (amplificação) estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Informações sobre as condições da técnica de PCR

SNP	Oligonucleotídeos iniciadores (5' – 3')	Tempo de anelamento	Temperatura de anelamento
MMP-1 (-1607) (rs1799750)	F*: TCGTGAGAATGTCTTCCCATT R** :TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC	30 s	55°C
MMP-2 (-1306) (rs243865)	F*: CTCCTAGGCTGGTCCTTACT R** : CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAG	1 m	62 °C
MMP-13 (-77) (rs2252070)	F*: GATACGTTCTTACAGAAGGC R** : ACAAATCATCTTCATCACC	1 m	50 °C

*Primer Forward

** Primer Reverse

4.4 Determinação do genótipo

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores, pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A digestão foi realizada com volume final de 10 µl, sendo: 5 µl produto da PCR, 1µl da enzima acrescido de 2 µl de seu respectivo tampão, 2 µl de água ultrapura e 10 µl óleo mineral (para evitar evaporação) por 16 horas à temperatura adequada para cada enzima de restrição em termociclador (marca: Techgene®).

O polimorfismo MMP-1 (rs 1799750) é caracterizado pela inserção/deleção de uma base guanina (G) na região promotora do gene na posição - 1607, criando dois alelos diferentes (1G ou 2 G). A enzima de restrição *XmnI* reconhece o alelo 1G, clivando em duas partes, uma com 89 e outra com 29 pares de bases (pb). O alelo 2G não é digerido,

permanecendo com 118 pb.

O polimorfismo MMP-2 (rs 243865) é caracterizado pela substituição de uma base citosina (C) por uma base timina (T) na região promotora do gene na posição - 1306, criando dois alelos diferentes (C ou T). A enzima de restrição *FspBI* reconhece a base timina (alelo T), clivando em duas partes, uma com 162 pb e outra com 26 pb. O alelo C permanece íntegro com 188 pb.

O polimorfismo MMP-13 (rs 2252070) é caracterizado pela substituição de uma base adenina (A) por uma guanina (G) na região promotora - 77, criando dois alelos diferentes (A ou G). A enzima de restrição *BsrI* reconhece a base guanina e cliva o alelo G em dois fragmentos, um com 197 pb e outro com 248 pb. O alelo A permanece íntegro com 445 pb.

As enzimas de restrição e temperatura, além do tamanho dos fragmentos gerados em pares de base (pb), estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Informações sobre as enzimas de restrições e os alelos obtidos

SNP	RFLP	Alelo pb
MMP-1 (-1607) (rs1799750)	<i>XmnI</i> 37°C	118 (Alelo 1G) 89 + 29 (Alelo 2G)
MMP-2 (-1306) (rs243865)	<i>FspBI</i> 37°C	188 (Alelo C) 162 + 26 (Alelo T)
MMP-13 (-77) (rs2252070)	<i>BsrI</i> 65°C	445 (Alelo A) 197 + 248 (Alelo G)

RFLP *Restriction Fragment Length Polymorphism*
pb pares de bases

4.5 Eletroforese

As sequências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em gel horizontal de agarose 5% e tampão TBE (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). A preparação do gel de agarose 5% foi feita com 0,6 g de agarose (Pronadisa), 30 ml de TBE acrescida de 30 ml de água destilada, a mistura foi aquecida em micro-ondas em potência alta por 1 minuto com pausas para misturar.

Para confirmação da amplificação (PCR) foi utilizado 4 µl da reação de PCR e 1 µl do reagente Gel Red® (Biotium Incorporation, Fremont, Califórnia EUA). Para a análise da digestão (RFLP) foi utilizado 10 µl da reação de RFLP e 2 µl do mesmo reagente.

A mistura foi aplicada no gel previamente preparado em uma cuba de eletroforese horizontal (Marca Uniscience – 10x10 cm), e submetida a uma corrente elétrica de 100V; 120mA e 60W durante aproximadamente 30 minutos para confirmação de amplificação (PCR) e de 50 minutos para a corrida da reação da RFLP para os fragmentos das MMP-1 e -2 e 100 minutos para o fragmento da MMP-13. A visualização foi feita em transluminador e a imagem capturada utilizando software Digi Doc GED® (DigiDoc Soluções, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil). Os padrões obtidos estão ilustrados conforme as **Figuras 1, 2 e 3**.

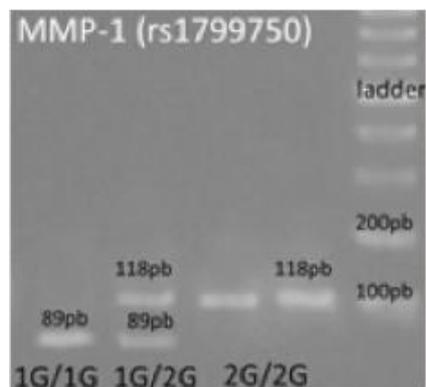


Figura 1 – Genótipos da MMP-1 (-1607)

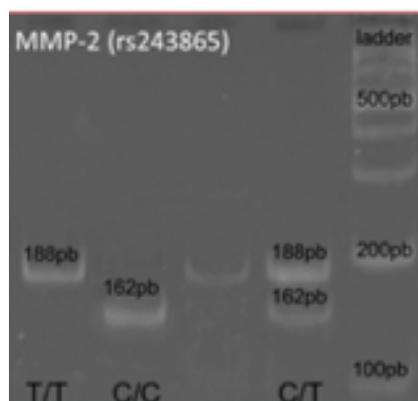


Figura 2 – Genótipos da MMP-2 (-1306)

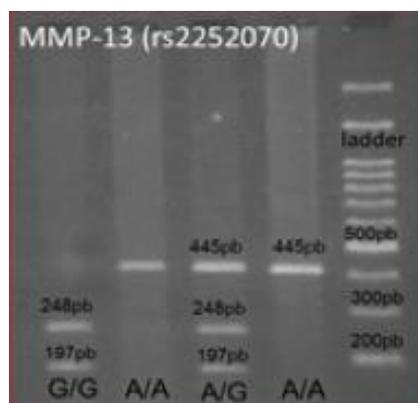


Figura 3 – Genótipos da MMP-13 (-77)

4.6 Análise estatística dos resultados

A análise dos dados epidemiológicos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney para variáveis quantitativas e pelo teste de Qui-Quadrado para as qualitativas.

A associação entre os polimorfismos genéticos estudados e a Moléstia de Dupuytren foi avaliada pelo teste Qui-Quadrado, ao nível de significância de 5%, pelo programa BioEstat versão 5.0.

A análise estatística do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada utilizando os softwares SNPstats de livre acesso no endereço eletrônico: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>.

5. *RESULTADOS*

5 RESULTADOS

Analisamos 150 pacientes, 50 com MD e 100 controles. A média de idade foi de $61,1 \pm 10,3$ no grupo-teste e $61,5 \pm 9,1$ no grupo controle. Entre os casos, encontramos uma associação com a Doença de Ledderhose em 7/50 pacientes (13,7%), com a Doença de Peyronie em 4/35 homens (11,4%) e história familiar em 15/50 pacientes (30%).

Os demais dados epidemiológicos podem ser observados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Dados epidemiológicos

	Grupo-teste (n = 50)	Grupo-controle (n = 100)	<i>p</i>
Idade (média ± dp)	61,1 ± 10,3	61,5 ± 9,0	0,492
Sexo, n (%)			
Masculino	34 (68)	67 (67)	0,902
Feminino	16 (32)	33 (33)	
Raça, n (%)			
Branca	46 (92)	90 (90)	0,691
Preta	4 (8)	10 (10)	
Descendência europeia			
Sim	35 (68)	52 (52)	0,074
Não	16 (31)	48 (48)	

Conforme a própria epidemiologia da MD, percebemos uma tendência na descendência europeia (principalmente ibéricos e italianos) maior nos pacientes acometidos pela doença, porém sem diferença estatística. Os pacientes diabéticos e epiléticos foram excluídos em ambos os grupos.

Não houve recusa na participação do estudo e não houve perda durante processamento do DNA, com todas as amostras atingindo uma concentração adequada, através da densidade óptica. Todas as distribuições dos genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.1 MMP-1

A análise do SNP rs 1799750 na posição - 1607 teve uma frequência do alelo 1G de 69,5% no grupo controle e 54% no grupo teste ($p = 0,011$). Em relação aos genótipos, no grupo controle o 1G/1G teve uma frequência de 47%, o 1G/2G de 45% e o 2G/2G de 8%. Respectivamente, no grupo teste, tivemos 26%, 56% e 18% ($p = 0,024$).

5.2 MMP-2

A análise do SNP rs 243865 na posição - 1306 teve uma frequência do alelo C de 73% no grupo controle e 75% no grupo teste ($p = 0,81$). Em relação aos genótipos, no grupo controle o C/C teve uma frequência de 48%, o C/T de 50% e o T/T de 2%. Respectivamente, no grupo teste, tivemos 52%, 46% e 2% ($p = 0,89$).

5.3 MMP-13

A análise do SNP rs 225070 na posição - 77 teve uma frequência do alelo A de

63,5% no grupo controle e 76% no grupo teste ($p = 0,040$). Em relação aos genótipos, no grupo controle o A/A teve uma frequência de 33%, o A/G de 61% e o G/G de 6%. Respectivamente, no grupo teste, tivemos 58%, 36% e 6% ($p = 0,011$).

A **Tabela 4** abaixo mostra todos os números dos alelos e genótipos específicos a cada polimorfismo estudado.

Tabela 4 – Frequência dos SNPs dos genes MMP-1 (rs1799750), MMP-2 (rs243865) e MMP-13 (rs2252070) nos grupos controle e teste

Gene	SNPs	Grupo-controle	Grupo-teste	<i>p</i>
MMP-1	Alelo	<i>n</i> = 200	<i>n</i> = 100	p = 0.011
	1G	70% (139)	54% (54)	
	2G	30% (61)	46% (46)	
	Genótipo	<i>n</i> = 100	<i>n</i> = 50	p = 0.024
	1G/1G	47% (47)	26% (13)	
	1G/2G	45% (45)	56% (28)	
	2G/2G	08% (08)	18% (9)	
MMP-2	Alelo	<i>n</i> = 200	<i>n</i> = 100	p = 0.81
	C	73% (146)	75% (75)	
	T	27% (54)	25% (25)	
	Genótipo	<i>n</i> = 100	<i>n</i> = 50	p = 0.89
	C/C	48% (48)	52% (26)	
	C/T	50% (50)	46% (23)	
MMP-13	Alelo	<i>n</i> = 200	<i>n</i> = 100	p = 0.040
	A	63% (127)	76% (76)	
	G	37% (73)	24% (24)	
	Genótipo	<i>n</i> = 100	<i>n</i> = 50	p = 0.011
	A/A	33.0% (33)	58% (29)	
	A/G	61.0% (61)	36% (18)	
	G/G	06.0% (06)	06% (03)	

Valores em porcentagem, com número de participantes (n) em parênteses.

6. *DISCUSSÃO*

6 DISCUSSÃO

O presente estudo segue uma linha de pesquisa criada em parceria com o Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. O tamanho da nossa amostra se baseou em estudos realizados previamente em nosso serviço com a mesma metodologia^{27,33}.

Obtivemos um banco de DNA de 150 pacientes, numa proporção 1 teste: 2 controles, pareados por sexo, idade e cor. A seleção dos participantes e as coletas de saliva para ambos os grupos (teste e controle) foram realizadas diretamente pelo autor. A realização apenas da avaliação clínica para a inclusão dos indivíduos nos respectivos grupos se mostrou eficaz e sem necessidade de realização de exames complementares, fato esse confirmado por outros autores^{86,87}.

Optamos pela exclusão dos pacientes diabéticos, mesmo não encontrando critérios bem estabelecidos de exclusão/inclusão nos vários trabalhos que associam expressão tecidual ou SNPs de MMPs à MD^{34–36,68–70,78,88,89}. Um ponto importante para validar a associação entre SNPs e processos patológicos é um estudo com metodologia e desenho restritos^{90,91}. No presente estudo, observamos um número de voluntários com poder estatístico estimado confiável e distribuição genotípica em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Além disso, com o pareamento de idade e sexo e exclusão (segundo anamnese apenas) de saúde sistêmica comprometida, tornamos os nossos resultados mais robustos e confiáveis. Eles foram estatisticamente significativos, sendo possível identificar marcadores moleculares para pacientes de risco à MD.

A descendência europeia encontrada, dada a composição histórica da nossa população, se restringiu praticamente a portugueses, espanhóis e italianos. Por outra

característica da nossa população, a miscigenação, provavelmente não obtivemos diferença estatística entre os dois grupos. A associação com a Moléstia de Ledderhose (13,7%) e com a Moléstia de Peyronie (11,4%) encontradas, foi próxima de séries epidemiológicas previamente publicadas^{92,93}.

A proporção de pacientes com história familiar, que em nossa casuística foi de 30%, tem o viés de muitas vezes utilizarmos apenas a entrevista para a obtenção desse dado, subestimando-o. **Ling**²¹ demonstrou isso em seu levantamento de pacientes com familiares acometidos, obtendo uma proporção de 16% com a entrevista e de 68% quando realizou a busca ativa.

A obtenção e extração de DNA da saliva foram adequadas para a análise de PCR e RFLP, sendo essa metodologia eficiente para a definição dos genótipos, reprodutível, não invasiva e de baixo custo.

Os alelos dos SNPs estudados nos genes das MMPs-1, -2 e -13 apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg⁹⁴. Esse equilíbrio garante que a distribuição genotípica ocorreu ao acaso e define que as frequências alélicas, em condições normais, permanecerão constantes ao longo das gerações.

Este estudo mostra que o SNP na região promotora do gene da MMP-1 (posição -1607) está associado à Moléstia de Dupuytren. O alelo 2G parece aumentar a atividade de transcrição do gene e, conseqüentemente, o nível da expressão tecidual dessa enzima⁷². Esse resultado confirma os achados de **Johnston et al.**³⁴, que encontraram um aumento na expressão gênica no nódulo das MMP-1, MMP-13 e MMP-14, bem como da TIMP-1, comparativamente à fáscia normal. Tal aumento concomitante das MMPs e de uma das enzimas inibidoras teciduais demonstram que o processo de remodelação da MEC é intenso e a relação entre essas enzimas tem papel fundamental na fisiopatologia da MD. Esse fato é demonstrado em trabalhos clínicos que usaram inibidores de amplo espectro

de MMPs, com ocorrência da fibromatose palmar como efeito colateral^{28,95}.

Este estudo não mostrou diferença estatística entre os grupos em relação ao SNP do gene da MMP-2 na posição - 1306. A ação das MMPs pode ser regulada, além do nível transcricional, pela taxa de conversão da forma latente para a ativa ou através dos inibidores específicos (TIMPs) e da α_2 -macroglobulina. Está comprovado que a atividade desta metaloproteinase está alterada na MD, seja com aumento em sua expressão tecidual^{34,35,69}, aumento na forma ativa⁶⁸ ou em estudos *in vitro* demonstrando sua mediação na contração de fibroblastos^{36,70}. Estudamos apenas um dos polimorfismos do gene da MMP-2. Somente na região promotora desse gene temos outros cinco SNPs descritos^{73,96}, o que também pode influenciar na transcrição e conseqüentemente na atividade dessa enzima e não foram objetos de estudo deste trabalho.

O alelo A e, principalmente, o genótipo A/A do SNP da MMP-13 na posição -77 está relacionado com a MD. Essa configuração está associada com uma atividade de transcrição quase duas vezes maior que a com o alelo G⁷⁴. A expressão tecidual aumentada também é demonstrada no perfil completo da MD descrito por **Johnston et al.**³⁴.

A associação dos SNPs estudados neste trabalho com os mais diversos tipos de neoplasias malignas está bem documentada em vasta literatura⁹⁷⁻¹⁰⁶. A MD apresenta algumas características comuns às neoplasias, como proliferação celular, remodelação acentuada da MEC e tendência de recorrência após o tratamento. Portanto, a associação de SNPs de MMPs pode ser um fator comum em ambas afecções. Corroborando com essa hipótese, um estudo populacional islandês¹⁰⁷ constatou que pacientes com a contração de Dupuytren tiveram uma maior porcentagem de óbitos após 15 anos de seguimento, com um risco para mortes por causas neoplásicas duas vezes maior em relação ao grupo sem o diagnóstico clínico de MD. Considerando o papel já conhecido das MMPs tanto na

fisiopatologia da MD como na carcinogênese, invasão tecidual e produção de metástases, essa associação é possível mas precisa de maiores estudos para confirmação.

Reforçando a influência das MMPs na MD, trabalhos experimentais com culturas de fibroblastos demonstraram que a capacidade de contração dessas células foi diminuída após a administração de inibidores sintéticos das MMPs^{70,88}. Entretanto, trata-se de um resultado *in vitro* que é contrário ao que se observou em situações clínicas com o uso de inibidores sintéticos. O conhecimento da influência de cada MMP na MD, pode tornar a busca por inibições seletivas dessas proteinases num futuro promissor, com diminuição dos efeitos colaterais e maior eficiência de um eventual tratamento conservador.

Pelo grande número de alterações genéticas já apontadas na MD, incluindo inúmeros SNPs, podemos caracteriza-la como uma doença de trato complexo, como observado nos estudos de genoma amplo^{78,82}. Uma aplicação prática desses estudos, dependendo do número de SNPs apresentado pelo paciente, é a possibilidade de cálculo de *scores* de risco de recidiva⁸³ e correlação com a diátase³, criando-se parâmetros genéticos para prognóstico e gravidade, respectivamente. Os SNPs aqui apontados poderiam ser adicionados nessa crescente lista.

Nosso estudo possui algumas limitações, como uma amostra relativamente pequena comparada aos estudos de genoma amplo, que fazem análises concomitantes de milhares de SNPs potencialmente envolvidos na MD^{78,89}. Entretanto, mesmo com as dificuldades em nosso país para a realização de estudos desse porte, obtivemos resultados conclusivos.

Além disso, trata-se de um trabalho inédito na pesquisa de associação de SNPs de MMPs com a MD numa população fora do eixo Europa – EUA. Uma vez que os resultados podem ser diferentes quando analisadas populações etnicamente distintas¹⁰⁸, por variações das frequências alélicas, este trabalho ganha maior relevância pela população analisada.

O estudo de SNPs em genes de MMPs associados à MD mostrou-se promissor para descoberta de marcadores genéticos em pacientes de risco, o que pode contribuir na busca de estratégias para garantir um tratamento adequado e individualizado.

7. CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O polimorfismo das regiões promotoras dos genes das metaloproteinases MMP-1 (-1607) (rs1799750) e MMP-13 (-77) (rs2252070) estão relacionados à Moléstia de Dupuytren.

O polimorfismo da região promotora do gene da metaloproteinase MMP-2 (-1306) (rs243865) não está relacionado com a Moléstia de Dupuytren.

8. ANEXOS

8 ANEXOS

**Anexo A – Aprovação da Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia
HC-FMUSP****DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo****COMISSÃO CIENTÍFICA****IDENTIFICAÇÃO**

Protocolo IOT nº 1136

Pesquisador Responsável: Prof. Rames Mattar Júnior
Pesquisador Executante: Dr. Maurício Pinto Rodrigues
Título: Influência do polimorfismo genético na expressão de metaloproteases na Moléstia de Dupuytren.
Grau de Pesquisa: Mestrado

APRECIÇÃO GERAL DA PROPOSTA**1º PARECER**

Proposta bem estruturada.

Metodologia semelhante a outros trabalhos realizados na Instituição.

Introdução explica muito bem a reação das enzimas com a fibromatose. Para um entendimento mais complexo da metodologia, faltou uma explicação sobre como esse estudo genético permite obtenção de dados clinicamente relevantes.

Aprovado

Relator
Comissão Científica
23/06/2015

DECISÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA EM 24.06.2015: Projeto aprovado

O pesquisador executante deverá entrar em contato com a Pós-Graduação do DOT/FMUSP para efetuar sua inscrição no programa de Ortopedia e Traumatologia. De acordo com o fluxo estabelecido pela Comissão Científica do DOT/FMUSP, deverá aguardar a inscrição do aluno na pós-graduação e o parecer da Comissão de Pós-Graduação DOT, para enviar o projeto de pesquisa ao CEP/FMUSP (Comitê de Ética da FMUSP), para avaliação.

Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética da FMUSP – Plataforma Brasil



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do Polimorfismo na Moléstia de Dupuytren

Pesquisador: MAURICIO PINTO RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 56890216.0.1001.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.071.185

Apresentação do Projeto:

Adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a influência dos polimorfismos funcionais das regiões promotoras dos genes de metaloproteases na fisiopatogenia da fibromatose palmar – Moléstia de Dupuytren.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não riscos nem benefícios diretos para o paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos estão adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.071.185

conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_667584.pdf	11/05/2017 10:25:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimentoNOVissimo.docx	11/05/2017 10:25:05	MAURICIO PINTO RODRIGUES	Aceito
Outros	ANUENCIA.pdf	05/10/2016 08:00:14	RAMES MATTAR JÚNIOR	Aceito
Outros	CadastronlineIOT1136.pdf	19/04/2016 09:19:45	MAURICIO PINTO RODRIGUES	Aceito
Folha de Rosto	FolharostolIOT1136.pdf	19/04/2016 09:19:28	MAURICIO PINTO RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Protocolo1136.pdf	23/02/2016 12:09:56	MAURICIO PINTO RODRIGUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa.docx	23/02/2016 11:54:48	MAURICIO PINTO RODRIGUES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 18 de Maio de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 02 de 02

Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DA PESQUISA**

Título da pesquisa - *Influência do polimorfismo genético na expressão de metaloproteases na moléstia de Dupuytren.*

Pesquisador principal – Maurício Pinto Rodrigues.

Departamento/Instituto – Ortopedia e Traumatologia.

Convidamos o(a) Sr(a). _____

a participar desta pesquisa com o objetivo de melhorarmos o conhecimento sobre a doença de Dupuytren, se existe alguma alteração genética na sua causa.

Conhecemos alguns fatores que podem aumentar a chance do aparecimento da doença de Dupuytren, como associação com diabetes ou uso de alguns medicamentos, bem como as alterações que ocorrem na anatomia do tecido acometido (fáscia da mão). Entretanto, a causa exata para o aparecimento desta doença até hoje não tem uma definição. Por esse motivo, a possibilidade de causas genéticas para essas lesões precisa ser estudada e o objetivo desse estudo é investigar a frequência dos genes em pacientes com diagnóstico da doença de Dupuytren, para verificar a possível relação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento dessa doença.

Esse estudo será feito com um único exame através de 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 um 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 no aparecimento da doença

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 Rames Mattar Júnior e o Dr. Maurício Pinto Rodrigues, 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, SP, Brasil, pelo telefone 3081 7882.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3081 8882 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3081 7882 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 paciente.

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. Também não há 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.

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL****1.**

NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

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

ENDEREÇO Nº

APTO:

BAIRRO:

CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD

(.....)

2. RESPONSÁVEL

LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador
etc.)DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

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

ENDEREÇO: Nº

APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

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

Anexo D – Anuência do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular



Curitiba, 18 de junho de 2015.

Ao Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ortopedia e Traumatologia
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Declaro para os devidos fins que o Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná esta de acordo com as etapas previstas para serem realizadas junto ao Depto. Biologia Celular, sob coordenação da Profa. Dra Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, relativas ao Projeto de Pesquisa intitulado "Influência do Polimorfismo genético na expressão de Metaloproteases na Moléstia de Dupuytren" proposto pelo pesquisador Dr. Rames Mattar Junior e que os respectivos procedimentos são factíveis nos prazos exigidos desde que respeitado o cronograma proposto.

O Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná também oferecerá como recursos de contrapartida para o desenvolvimento do projeto o espaço físico bem como os equipamentos necessários para a execução da proposta.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Diretor do Setor de Ciências Biológicas
Matrícula 201511

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Diretor do Setor de Ciências Biológicas - UFPR

De acordo: _____
Prof. Dra. Maria Cristina Leme G dos Santos
Depto. Biologia Celular - UFPR

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1682 – Fax (41) 3266-2042 – biocel@ufpr.br
www.ufpr.br



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que estou ciente e concordo com as etapas previstas para serem realizadas junto a Universidade Federal do Paraná – Depto. Biologia Celular, relativas ao Projeto de Pesquisa intitulado " **Influência do Polimorfismo genético na expressão de Metaloproteases na Moléstia de Dupuytren**" proposto pelos pesquisador **Dr. Rames Mattar Junior** e que os respectivos procedimentos são factíveis nos prazos exigidos desde que respeitando o cronograma proposto.

Curitiba, 18 de junho de 2015.

Prof. Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos
Universidade Federal do Paraná –UFPR – Depto. Biologia Celular

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1682 – Fax (41) 3266-2042 – biocel@ufpr.br
www.ufpr.br

9. REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Rayan GM. Palmar fascial complex anatomy and pathology in Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999;15(1):73–86.
2. Shaw RB, Chong AKS, Zhang A, Hentz VR, Chang J. Dupuytren's disease: history, diagnosis, and treatment. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120(3):44e-54e.
3. Dolmans GH, De Bock GH, Werker PM. Dupuytren diathesis and genetic risk. *J Hand Surg Am.* 2012;37(10):2106-11.
4. Rayan GM. Clinical presentation and types of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999;15(1):87–96.
5. Hueston JT. *The Dupuytren's diathesis.* London: Churchill-Livingstone; 1963.
6. Hindocha S, Stanley JK, Watson S, Bayat A. Dupuytren's diathesis revisited: Evaluation of prognostic indicators for risk of disease recurrence. *J Hand Surg Am.* 2006;31(10):1626–34.
7. Ross DC. Epidemiology of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999;15(1):53–62.
8. Zemel NP. Dupuytren's contracture in women. *Hand Clin.* 1991;7(4):707–11.
9. Noble J, Heathcote JG, Cohen H. Diabetes mellitus in the aetiology of Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br.* 1984;66(3):322–5.
10. Pal B, Griffiths ID, Anderson J, Dick WC. Association of limited joint mobility with Dupuytren's contracture in diabetes mellitus. *J Rheumatol.* 1987;14(3):582–5.
11. Attali P, Ink O, Pelletier G, Vernier C, Jean F, Moulton L, Etienne JP. Dupuytren's contracture, alcohol consumption, and chronic liver disease. *Arch Intern Med.* 1987;147(6):1065–7.
12. Noble J, Arafa M, Royle SG, McGeorge G, Crank S. The association between

- alcohol, hepatic pathology and Dupuytren's disease. *J Hand Surg Br.* 1992;17(1):71–4.
13. Arafa M, Noble J, Royle SG, Trail IA, Allen J. Dupuytren's and epilepsy revisited. *J Hand Surg Br.* 1992;17(2):221–4.
 14. Skoog T. The pathogenesis and etiology of Dupuytren's contracture. *Plast Reconstr Surg.* 1963;31:258–67.
 15. An HS, Southworth SR, Jackson WT, Russ B. Cigarette smoking and Dupuytren's contracture of the hand. *J Hand Surg Am.* 1988;13(6):872–4.
 16. Burge P, Hoy G, Regan P, Milne R. Smoking, alcohol and the risk of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79(2):206–10.
 17. Fraser-Moodie A. Dupuytren's contracture and cigarette smoking. *Br J Plast Surg.* 1976;29(3):214–5.
 18. Hindocha S, John S, Stanley JK, Watson SJ, Bayat A. The heritability of Dupuytren's disease: familial aggregation and its clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2006;31(2):204–10.
 19. McFarlane RM. Dupuytren's disease: relation to work and injury. *J Hand Surg Am.* 1991;16(5):775–9.
 20. Couch H. Identical Dupuytren's contracture in identical twins. *Can Med Assoc J.* 1938;39(3):225–6.
 21. Ling RS. The genetic factor in Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br.* 1963;45(4):709–18.
 22. Gabbiani G, Majno G. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol.* 1972;66(1):131–46.
 23. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.*

- 2001;12(9):2730–41.
24. Tomasek JJ, Vaughan MB, Haaksma CJ. Cellular structure and biology of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999;15(1):21–34.
 25. Pasternak B, Aspenberg P. Metalloproteinases and their inhibitors-diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics. *Acta Orthop.* 2009;80(6):693–703.
 26. Baroneza JE, Godoy-Santos A, Ferreira Massa B, Boçon de Araujo Munhoz F, Diniz Fernandes T, Leme Godoy dos Santos MC. MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tendinopathy. *Gene.* 2014;547(2):334–7.
 27. Assunção JH, Godoy-Santos AL, dos Santos MCLG, Malavolta EA, Gracitelli MEC, Ferreira Neto AA. Matrix metalloproteinases 1 and 3 promoter gene polymorphism is associated with rotator cuff tear. *Clin Orthop Relat Res.* 2017;475(7):1904-1910.
 28. Hutchinson JW, Tierney GM, Parsons SL, Davis TRC. Dupuytren's disease and frozen shoulder induced by treatment with a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80(5):907-8.
 29. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860–921.
 30. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431(7011):931–45.
 31. Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet.* 2002;47(11):561–6.
 32. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998;280(5366):1077–82.
 33. Godoy-Santos A, Cunha MV, Ortiz RT, Fernandes TD, Mattar R Jr, dos Santos MC.

- MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. *J Orthop Res.* 2013;31(7):1103–7.
34. Johnston P, Chojnowski AJ, Davidson RK, Riley GP, Donell ST, Clark IM. A complete expression profile of matrix-degrading metalloproteinases in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am.* 2007;32(3):343–51.
 35. Ulrich D, Ulrich F, Piatkowski A, Pallua N. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in cords and nodules of patients with Dupuytren's disease. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009;129(11):1453–9.
 36. Wilkinson JM, Davidson RK, Swingler TE, Jones ER, Corps AN, Johnston P, et al. MMP-14 and MMP-2 are key metalloproteinases in Dupuytren's disease fibroblast-mediated contraction. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(6):897-905.
 37. Elliot D. Pre-1900 literature on Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999;15(1):175–81.
 38. Elliot D. The early history of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999;15(1):1–19, v.
 39. Dupuytren B. Clinical lectures on surgery. *Lancet.* 1833;22(558):222–5.
 40. Luck JV. Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management. *J Bone Joint Surg Am.* 1959;41(4):635–64.
 41. Tomasek JJ, Schultz RJ, Episalla CW, Newman SA. The cytoskeleton and extracellular matrix of the Dupuytren's disease "myofibroblast": an immunofluorescence study of a nonmuscle cell type. *J Hand Surg Am.* 1986;11(3):365–71.
 42. Schultz RJ, Tomasek JJ. Cellular structure and interconnections. In: Mcfarlane RM, McGrouther DA, Flint MH, editors. *Dupuytren's disease: biology and treatment.* New York: Churchill-Livingstone; 1990. p. 86–98.
 43. Brickley-Parsons D, Glimcher MJ, Smith RJ, Albin R, Adams JP. Biochemical

- changes in the collagen of the palmar fascia in patients with Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Am.* 1981;63(5):787-97.
44. Hueston JT. Current state of treatment of Dupuytren's disease. *Ann Chir Main.* 1984;3(1):81-92.
45. Tubiana R. Evaluation of deformities in Dupuytren's disease. *Ann Chir Main.* 1986;5(1):5-11.
46. Burge P. Genetics of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999;15(1):63-71.
47. Lam WL, Rawlins JM, Karoo RO, Naylor I, Sharpe DT. Re-visiting Luck's classification: a histological analysis of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Eur Vol.* 2010;35(4):312-7.
48. Shih BB, Tassabehji M, Watson JS, McGrouther AD, Bayat A. Genome-wide high-resolution screening in Dupuytren's disease reveals common regions of DNA copy number alterations. *J Hand Surg Am.* 2010;35(7):1172-83.
49. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962;48:1014-22.
50. Eisen AZ, Jeffrey JJ, Gross J. Human skin collagenase, isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. *Biochim Biophys Acta.* 1968;151(3):637-45.
51. Bauer EA, Eisen AZ, Jeffrey JJ. Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochim Biophys Acta.* 1970;206(1):152-60.
52. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem.* 1986;261(14):6600-5.
53. Spurr NK, Gough AC, Gosden J, Rout D, Porteous DJ, van Heyningen V, Docherty AJ. Restriction fragment length polymorphism analysis and assignment of the

- metalloproteinases stromelysin and collagenase to the long arm of chromosome 11. *Genomics*. 1988;2(2):119–27.
54. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmor BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem*. 1988;263(14):6579–87.
55. Collier IE, Bruns GA, Goldberg GI, Gerhard DS. On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics*. 1991;9(3):429–34.
56. Freije JM, Díez-Itza I, Balbín M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem*. 1994;269(24):16766–73.
57. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*. 1995;270(11):5872–6.
58. Pendás AM, Balbín M, Llano E, Jiménez MG, López-Otín C. Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics*. 1997;40(2):222–33.
59. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491–4.
60. Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1–2):267–83.
61. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion,

- angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):S37-43.
62. Ulrich D, Noah E-M, von Heimburg D, Pallua N. TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIIINP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111(4):1423–31.
63. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827–39.
64. Tardif G, Reboul P, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J. Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol.* 2004;14(3):197–204.
65. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol.* 2007;48(4):323–34.
66. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg J-O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J.* 2011;278(1):28–45.
67. Ulrich D, Hrynyschyn K, Pallua N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in sera and tissue of patients with Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg.* 2003;112(5):1279–86.
68. Augoff K, Ratajczak K, Gosk J, Tabola R, Rutowski R. Gelatinase A activity in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am.* 2006;31(10):1635–9.
69. Johnston P, Larson D, Clark IM, Chojnowski AJ. Metalloproteinase gene expression correlates with clinical outcome in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am.* 2008;33(7):1160–7.
70. Townley WA, Cambrey AD, Khaw PT, Grobbelaar AO. Matrix metalloproteinase inhibition reduces contraction by Dupuytren fibroblasts. *J Hand Surg Am.*

- 2008;33(9):1608–16.
71. Crow JF. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet.* 2000;1(1):40–7.
72. 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(23):5321–5.
73. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7549–58.
74. Yoon S, Kuivaniemi H, Gatalica Z, Olson JM, Buttice G, Ye S, Norris BA, Malcom GT, Strong JP, Tromp G. MMP13 promoter polymorphism is associated with atherosclerosis in the abdominal aorta of young black males. *Matrix Biol.* 2002;21(6):487–98.
75. Bayat A, Watson JS, Stanley JK, Alansari A, Shah M, Ferguson MWJ, Ollier WE. Genetic susceptibility in Dupuytren's disease TGF- β 1 Polymorfisms and Dupuytren's Disease. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84(2):211-5.
76. Bayat A, Stanley JK, Watson JS, Ferguson MWJ, Ollier WER. Genetic susceptibility to Dupuytren's disease: transforming growth factor beta receptor (TGF β R) gene polymorphisms and Dupuytren's disease. *Br J Plast Surg.* 2003;56(4):328–33.
77. Ojwang JO, Adrianto I, Gray-Mcguire C, Nath SK, Sun C, Kaufman KM, Harley JB, Rayan GM. Genome-wide association scan of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am.* 2010;35(12):2039–45.
78. Dolmans GH, Werker PM, Hennies HC, Furniss D, Festen EA, Franke L, et al. Wnt

- Signaling and Dupuytren's Disease. *N Engl J Med.* 2011;365(4):307–17.
79. Shih B, Tassabehji M, Watson JS, Bayat A. DNA copy number variations at chromosome 7p14.1 and chromosome 14q11.2 are associated with Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(4):921–32.
80. Debniak T, Zyluk A, Puchalski P, Serrano-Fernandez P. Common variants of the EPDR1 gene and the risk of Dupuytren's disease. *Handchirurgie Mikrochirurgie Plast Chir.* 2013;45(5):253–7.
81. Anderson ER, Burmester JK, Caldwell MD. Evaluation of a mitochondrial DNA mutation in maternally inherited and sporadic cases of Dupuytren disease. *Clin Med Res.* 2012;10(3):122–6.
82. Ng M, Thakkar D, Southam L, Werker P, Ophoff R, Becker K, Nothnagel M, Franke A, Nürnberg P, Espirito-Santo AI, Izadi D, Hennies HC, Nanchahal J, Zeggini E, Furniss D. A Genome-wide association study of Dupuytren disease reveals 17 additional variants implicated in fibrosis. *Am J Hum Genet.* 2017;101(3):417–27.
83. Riesmeijer SA, Manley OWG, Ng M, Nolte IM, Broekstra DC, Werker PMN, et al. A weighted genetic risk score predicts surgical recurrence independent of high-risk clinical features in Dupuytren's Disease. *Plast Reconstr Surg.* 2019;143(2):512–8.
84. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for pcr amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000;18(1):6–9.
85. Aidar M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007;18(2):148–52.
86. Lennox IA, Murali SR, Porter R. A study of the repeatability of the diagnosis of Dupuytren's contracture and its prevalence in the grampian region. *J Hand Surg Br.* 1993;18(2):258–61.

87. Wolfe SW, Hotchkiss RN, Pederson WC, Kosin SH. *Green's operative hand surgery*. 6ed. Philadelphia, PA: Churchill-Livingstone; 2011.
88. Townley WA, Cambrey AD, Khaw PT, Grobbelaar AO. The role of an MMP inhibitor in the regulation of mechanical tension by Dupuytren's disease fibroblasts. *J Hand Surg Eur Vol*. 2009;34(6):783–7.
89. Anderson ER, Ye Z, Caldwell MD, Burmester JK. SNPs previously associated with Dupuytren's disease replicated in a North American cohort. *Clin Med Res*. 2014;12(3–4):133–7.
90. Dereka X, Mardas N, Chin S, Petrie A, Donos N. A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(7):775–88.
91. Liao C, Kong L, Zhou P, Yang X, Huang J, Zhang H, Lu N. miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs. *J Transl Med*. 2014;12(1):234.
92. Shindel AW, Sweet G, Thieu W, Durbin-Johnson B, Rothschild J, Szabo R. Prevalence of Peyronie's disease-like symptoms in men presenting with dupuytren contractures. *Sex Med*. 2017;5(3):e135–41.
93. Gudmundsson KG, Jónsson T, Arngrímsson R. Association of Morbus Ledderhose With Dupuytren's Contracture. *Foot Ankle Int*. 2013;34(6):841–5.
94. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908;28(706):49-50.
95. Krzeski P, Buckland-Wright C, Bálint G, Cline GA, Stoner K, Lyon R, Beary J, Aronstein WS, Spector TD. Development of musculoskeletal toxicity without clear benefit after administration of PG-116800, a matrix metalloproteinase inhibitor, to

- patients with knee osteoarthritis: a randomized, 12-month, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R109.
96. Vašků A, Goldbergová M, Hollá LI, Šišková L, Groch L, Beránek M, Tschöplová S, Znojil V, Vácha J. A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol.* 2004;22(7):585–91.
97. Tower GB, Coon CC, Benbow U, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Erk 1/2 differentially regulates the expression from the 1G/2G single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1586(3):265–74.
98. Dickey ID, Scully SP. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter in chondrosarcoma. *J Surg Oncol.* 2004;87(3):130–3.
99. Cao ZG, Li CZ. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances oral squamous cell carcinoma susceptibility in a Chinese population. *Oral Oncol.* 2006;42(1):31–7.
100. 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(3):381–9.
101. 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.
102. Devulapalli K, Bhayal AC, Porike SK, Macherla R, Akka J, Nallari P, Ananthapur V. Role of interstitial collagenase gene promoter polymorphism in the etiology of gastric cancer. *Saudi J Gastroenterol.* 2014;20(5):309-14.

103. Padala C, Tupurani MA, Puranam K, Gantala S, Shyamala N, Kondapalli MS, Gundapaneni KK, Mudigonda S, Galimudi RK, Kupsal K, Nanchari SR, Chavan U, Chinta SK, Mukta S, Satti V, Hanumanth SR. Synergistic effect of collagenase-1 (MMP1), stromelysin-1 (MMP3) and gelatinase-B (MMP9) gene polymorphisms in breast cancer. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184448.
104. Li H, Liang X, Qin X, Cai S, Yu S. Association of matrix metalloproteinase family gene polymorphisms with lung cancer risk: logistic regression and generalized odds of published data. *Sci Rep*. 2015;5(1):10056.
105. Liu L, Wu C, Wang Y, Zhong R, Wang F, Zhang X, Duan S, Lou J, Yu D, Tan W, Yuan J, Wu T, Nie S, Miao X, Lin D. Association of candidate genetic variations with gastric cardia adenocarcinoma in Chinese population: a multiple interaction analysis. *Carcinogenesis*. 2011;32(3):336–42.
106. Wu Z, Jiang P, Zulqarnain H, Gao H, Zhang W. Relationship between single-nucleotide polymorphism of matrix metalloproteinase-2 gene and colorectal cancer and gastric cancer susceptibility: A meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2015;8:861–9.
107. Gudmundsson KG, Arngrímsson R, Sigfússon N, Jónsson T. Increased total mortality and cancer mortality in men with Dupuytren’s disease. *J Clin Epidemiol*. 2002;55(1):5–10.
108. Lacchini R, Metzger IF, Luizon M, Ishizawa M, Tanus-Santos JE. Interethnic differences in the distribution of matrix metalloproteinases genetic polymorphisms are consistent with interethnic differences in disease prevalence. *DNA Cell Biol*. 2010;29(11):649–55.