

Jorge Henrique Assunção

**Associação entre o polimorfismo genético das
metaloproteinases da matriz 1 e 3 e a rotura completa
do manguito rotador**

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Dr. Arnaldo Amado Ferreira Neto

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

Assunção, Jorge Henrique

Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteinases da matriz 1 e 3 e a rotura completa do manguito rotador / Jorge Henrique Assunção. -- São Paulo, 2019.

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

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientador: Arnaldo Amado Ferreira Neto.

Descritores: 1.Manguito rotador 2.Ombro
3.Metaloproteinases 4.Polimorfismo genético

USP/FM/DBD-024/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, Jorge (in memoriam) e Marisa, pela dedicação e esforços realizados para proporcionar a minha educação e formação pessoal. Agradeço pelo apoio contínuo na busca dos meus objetivos.

A minha esposa Maria Carolina, pela amizade, amor incondicional e compreensão. Seu incentivo e apoio nos momentos difíceis foram fundamentais para celebrarmos cada conquista.

Ao meu filho Eduardo, simplesmente você é a maior felicidade das nossas vidas.

Agradecimentos

Ao Dr. Alexandre Leme Godoy-Santos e Prof. Maria Cristina Godoy dos Santos, pela importante contribuição na execução do projeto.

Aos Drs. Eduardo Malavolta e Mauro Gracitelli, pela amizade, inúmeras discussões e revisões desta tese.

Ao Dr. Arnaldo Amado Ferreira Neto, pelos ensinamentos, apoio e orientação.

Ao Dr. Cesar de Cesar Neto, pelo auxílio na concepção deste projeto.

Aos Profs. Drs. Gilberto Luis Camanho, Olavo Pires de Camargo e Tarcísio E. P. de Barros Filho, pela oportunidade de realizar este trabalho no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao meu irmão Giulliano Assunção e meu sogro Luiz Antônio Queiroz pela amizade e suporte.

A todos estagiários, residentes e colaboradores do Grupo de Ombro e Cotovelo, pela participação nas diferentes etapas deste projeto.

Às secretarias Tânia Borges e Rosana Moreno da Costa pelo auxílio na pós-graduação.

A todos os pacientes que participaram desse estudo e colaboraram com o avanço da ciência.

Normalizações

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de “International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver)”.

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

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

Nomes 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.

“Todo o conhecimento humano começou com intuições,
passou daí aos conceitos e terminou com ideias.”

Immanuel Kant

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Epidemiologia da rotura do manguito rotador.....	4
2.2 Patogênese da rotura do manguito rotador.....	5
2.2.1 Fatores extrínsecos.....	5
2.2.2 Fatores intrínsecos.....	7
2.2.3 Histopatologia da rotura do manguito rotador.....	9
2.3 Metaloproteínases da matriz (MMPs).....	11
2.3.1 Metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1).....	12
2.3.2 Metaloproteinase da matriz-3 (MMP-3).....	13
2.3.3 Metaloproteínases da matriz e a rotura do manguito rotador.....	13
2.4 Polimorfismo genético.....	16
2.4.1 Polimorfismo genético e as metaloproteínases da matriz.....	17
2.4.1.1 Polimorfismo genético e a metaloproteinase da matriz-1.....	17
2.4.1.2 Polimorfismo genético e a metaloproteinase da matriz-3.....	18
2.5 Genética e a rotura do manguito rotador.....	19
2.5.1 Estudos epidemiológicos.....	19
2.5.2 Polimorfismo genético e a rotura do manguito rotador.....	21

3 MÉTODOS.....	24
3.1 Desenho do estudo, participantes e elegibilidade.....	24
3.2 Aprovação na comissão de ética e termo de consentimento.....	25
3.3 Custo.....	25
3.4 Variáveis avaliadas.....	26
3.5 Avaliação por imagem.....	27
3.5.1 Ressonância magnética.....	27
3.5.2 Ultrassonografia.....	27
3.6 Obtenção do ácido desoxirribonucleico (DNA)	28
3.7 Extração do ácido desoxirribonucleico.....	28
3.8 Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	29
3.9 Determinação do genótipo.....	29
3.10 Eletroforese dos fragmentos de ácido desoxirribonucleico.....	31
3.11 Cálculo da amostra.....	33
3.12 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Metaloproteinase da matriz-1.....	37
4.2 Metaloproteinase da matriz-3.....	37
4.3 Haplótipo 2G/5A.....	37
4.4 Antecedentes familiares para tratamento da rotura do manguito rotador.....	39
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÕES.....	47
7 ANEXOS.....	48
Anexo A.....	49
Anexo B.....	50
Anexo C.....	52
Anexo D.....	55
Anexo E.....	56

Anexo F.....	57
8 REFERÊNCIAS.....	64

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A	Adenina
DEFB1	Defensina beta 1
DENND2	"Differentially expressed in normal and neoplastic cells D2"
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERSBB	Receptor β relacionado ao estrogênio
EUA	Estados Unidos da América
FGF3	Fator de crescimento do fibroblasto-3
FGF10	Fator de crescimento do fibroblasto-10
FGFR1	Receptor do fator de crescimento do fibroblasto-1
<i>g</i>	Gravidade
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
HIF	Fator indutor de hipóxia
IC	Intervalo de confiança
mA	Miliampere
ml	Mililitro
μ l	Microlitro

mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MMP-1	Metaloproteinase da matriz-1
MMP-3	Metaloproteinase da matriz-3
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nmol	Nanomol
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RC	Razão de chances
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Risco relativo
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TNC	Tenascina C
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
V	Volt
W	Watt

Lista de figuras

- Figura 1** - Fragmentos amplificados e digeridos da metaloproteinase da matriz-1 mostrando os diferentes genótipos..... 32
- Figura 2** - Fragmentos amplificados e digeridos da metaloproteinase da matriz-3 mostrando os diferentes genótipos..... 32

Lista de tabelas

Tabela 1 - Informações sobre as condições da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase.....	30
Tabela 2 - Características gerais da amostra.....	36
Tabela 3 - Frequência alélica dos polimorfismos dos genes das metaloproteinases da matriz.....	38
Tabela 4 - Frequência genotípica dos polimorfismos dos genes das metaloproteinases da matriz e do haplótipo 2G/5A.....	38
Tabela 5 – Presença de familiares consanguíneos que realizaram tratamento para rotura do manguito rotador	39

Resumo

Assunção JH. *Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteinases da matriz 1 e 3 e a rotura completa do manguito rotador* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: Na patogênese da rotura do manguito rotador, diminuição da síntese e aumento da degradação das fibras colágenas são encontradas, associadas ao aumento da atividade das metaloproteinases da matriz 1 e 3 (MMP-1 e MMP-3). Há evidências que fatores genéticos estão envolvidos na produção das metaloproteinases e na etiologia da rotura do manguito rotador. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo genético das MMP-1 e MMP-3 com a rotura de espessura completa do manguito rotador. Como objetivos secundários, tivemos avaliar a correlação dos haplótipos da MMP-1 e MMP-3 com a rotura de espessura completa do manguito rotador e comparar se indivíduos com rotura transfixante do manguito rotador têm maior proporção de familiares com a mesma doença, em relação aos indivíduos controles. MÉTODOS: Avaliamos 64 pacientes com rotura transfixante do manguito rotador e 64 controles assintomáticos. Foram incluídos apenas pacientes com idade inferior a 65 anos e rotura de espessura completa não traumática. A rotura ou integridade do manguito rotador foi avaliada por ressonância magnética ou ultrassonografia em todos indivíduos. Os pacientes e os controles foram pareados por idade. O ácido desoxirribonucleico (DNA) dos voluntários foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal. Os genótipos das MMP-1 e MMP-3 foram determinados utilizando as técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e

Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP).
RESULTADOS: Observamos uma presença de 77% do alelo 1G e 64% do genótipo 1G/1G no grupo controle. Os pacientes com rotura transfixante do manguito rotador apresentaram uma taxa de 48% do alelo 2G e 73% de genótipos 1G/2G ou 2G/2G ($p < 0,001$). Indivíduos com genótipo 1G/2G e 2G/2G tiveram maior chance de ter uma rotura do manguito rotador: razão de chances (RC) igual a 4,8 (Intervalo de confiança de 95% [IC 95%] 2,1 a 11,0) e 5,2 (IC 95% 1,8 a 14,9), respectivamente. Também observamos uma distribuição significativamente diferente nos alelos e genótipos da MMP-3 ($p = 0,045$, $p = 0,021$, respectivamente) entre os casos e controles. Indivíduos com genótipo 5A/5A tiveram maior chance de apresentarem uma rotura do manguito rotador (RC 5,5; IC 95% 1,4 a 20,9). Indivíduos com haplótipo 2G/5A tiveram maior possibilidade de ter uma rotura do manguito rotador, este haplótipo foi encontrado em 42 de 64 pacientes (66%) e em 17 de 64 controles (27%), com razão de chances de 5,3 (IC 95% 2,5 a 11,3). Pacientes com rotura do manguito rotador relataram, em maior número (19 de 64 pacientes, 30%), a existência de familiares que realizaram tratamento para rotura do manguito rotador em relação aos pacientes controles (quatro de 64 pacientes, 6%; $p = 0,001$). CONCLUSÃO: O polimorfismo genético das MMP-1 e MMP-3 foi associado à rotura do manguito rotador.

Descritores: manguito rotador; ombro; metaloproteinases; polimorfismo genético.

Abstract

Assunção JH. *Association between genetic polymorphism of matrix metalloproteinases 1 and 3 and the full-thickness rotator cuff tear* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUCTION: In the pathogenesis of rotator cuff tear, decreased synthesis and increased degradation of collagen fibers are found, associated with an increase in activity of matrix metalloproteinases 1 and 3 (MMP-1 and MMP-3).

There is evidence that genetic factors may be involved in metalloproteinase production and the etiology of rotator cuff tear. The aim of this study was to evaluate the association between the genetic polymorphism of MMP-1 and MMP-3 and full-thickness rotator cuff tear. As secondary aims, we measured the correlation of MMP-1 and MMP-3 haplotypes with full-thickness rotator cuff tears and compared if individuals with full-thickness rotator cuff tears have a higher proportion of relatives with the same disease than the control subjects.

METHODS: We evaluated 64 patients with full-thickness rotator cuff tear and 64 asymptomatic controls. Patients aged below 65 years, with non-traumatic full thickness tears, were included. The rotator cuff tear or integrity was evaluated by magnetic resonance or ultrasound in all individuals. The patients and controls were paired by age. The deoxyribonucleic acid (DNA) of the volunteers was obtained from oral mucosa epithelial cells. MMP-1 and MMP-3 genotypes were determined using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) assays. **RESULTS:** We observed a 77% presence of allele 1G and 64% of genotypes 1G/1G in the control group. The patients with full-thickness rotator cuff tear presented 48% of allele 2G and

73% of genotypes 1G/2G or 2G/2G ($p < 0.001$). Individuals with genotypes 1G/2G and 2G/2G were more likely to have a rotator cuff tear: odds ratio equal to 4.8 (95% confidence interval [95% CI] 2.1 to 11.0) and 5.2 (95% CI 1.8 to 14.9), respectively. We also observed a significantly different distribution in the alleles and genotypes of MMP-3 ($p = 0.045$, $p = 0.021$, respectively) among the cases and controls. Individuals with the 5A/5A genotype were more likely to have a rotator cuff tear (OR 5.5; 95% CI 1.4 to 20.9). Individuals with the haplotype 2G/5A were more likely to have rotator cuff tears develop, this haplotype was found in 42 of 64 patients (66%) and in 17 of 64 controls (27%) with odds ratio 5.3 (95% CI 2.5 to 11.3). Patients with rotator cuff tears reported, in higher number (19 of 64 patients, 30%), the existence of relatives who previously had treatment for rotator cuff tears compared to control patients (four of 64 patients, 6%; $p = 0,001$). CONCLUSION: The genetic polymorphism of MMP-1 and MMP-3 was associated with rotator cuff tear.

Descriptors: rotator cuff; shoulder; metalloproteinase; genetic polymorphism.

1 INTRODUÇÃO

A tendinopatia do manguito rotador é a principal causa de dor no ombro¹ e a rotura destes tendões incidem em 20% da população². A etiologia da rotura do manguito rotador é multifatorial e para explicá-la são propostos diversos fatores extrínsecos e intrínsecos ao tendão³. Entre os fatores extrínsecos temos a síndrome do impacto e as variações morfológicas do arco coracoacromial, como acrômios curvos, ganchosos e o os *acromiale*⁴. Os fatores intrínsecos estão relacionados à degeneração tendínea, hipovascularização tecidual e processos inflamatórios locais^{4,5}. Na patogênese da rotura do manguito rotador não há consenso sobre quais são os principais fatores etiológicos e parece haver uma interação entre eles^{4,6}.

A degeneração tendínea é mediada por metaloproteinases da matriz (MMPs), citocinas e radicais livres que agem na matriz extracelular, alterando sua composição e suas propriedades biomecânicas⁴. As MMPs são enzimas capazes de degradar as fibras colágenas e outros elementos da matriz extracelular⁷. A metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1) é uma protease que degrada as fibras de colágeno tipo I⁸. A metaloproteinase da matriz-3 (MMP-3) está envolvida na regulação da ativação das MMPs. Além desta atividade, a MMP-3 é capaz de degradar as fibras colágenas tipos II, IV, V, IX, X, proteoglicanos, fibronectina e elastina⁹. Na patogênese da tendinopatia e rotura do manguito rotador encontramos uma diminuição da síntese e aumento da degradação do colágeno, associados ao aumento da atividade das MMP-1 e

3¹⁰⁻¹³. A produção e ativação das MMPs é induzida por citocinas, fatores de crescimento e interações célula-célula e célula-matriz⁷.

Polimorfismos genéticos são variações presentes na sequência do DNA nas quais um ou mais alelos têm frequência gênica maior que 1% na população¹⁴. Cerca de 90% destas variações são polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), onde ocorrem deleções ou substituições de um nucleotídeo na estrutura do DNA¹⁵. Alguns SNPs na região promotora dos genes das MMPs estão correlacionados a um aumento da atividade e produção destas enzimas^{16,17}.

Há evidências que fatores genéticos estão envolvidos na etiologia das roturas do manguito rotador^{18,19}. Alguns SNPs estão associados com a tendinopatia ou rotura do manguito rotador²⁰⁻²³. As variações genéticas correlacionadas a estas lesões estão localizadas nos genes associados a apoptose ou morte celular, *SASH1* e *SAP30PB*²⁰, e que expressam a enzima tenascina C (TNC)²³ e o receptor β relacionado ao estrogênio (ERSBB)^{21,22}.

Polimorfismos de nucleotídeo único das MMP-1 e MMP-3 estão correlacionados com a tendinopatia do tendão tibial posterior e do tendão calcâneo. Godoy-Santos et al.²⁴ encontram uma associação entre o polimorfismo genético da MMP-1 e a tendinopatia do tendão tibial posterior. Raleigh et al.²⁵, por sua vez, descrevem que variações dentro do gene da MMP-3 estão associados a tendinopatia do tendão calcâneo.

O conhecimento de marcadores genéticos relacionados à rotura do manguito rotador pode possibilitar a identificação de indivíduos suscetíveis e aumentar o entendimento da fisiopatogenia da degeneração tendínea, bem como o futuro desenvolvimento de mecanismos de prevenção desta doença.

1.1 Objetivos

O objetivo primário desse estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo genético da MMP-1 e MMP-3 e a rotura de espessura completa do manguito rotador.

Os objetivos secundários foram:

- Avaliar a correlação de haplótipos da MMP-1 e MMP-3 com a rotura transfixante do manguito rotador;
- Comparar se indivíduos com rotura de espessura completa do manguito rotador têm maior proporção de familiares consanguíneos com a mesma doença, em relação aos indivíduos controles.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia da rotura do manguito rotador

Petersson e Gentz²⁶, em 1983, observam, em 170 dissecções, a presença de rotura parcial do supraespal em 32 ombros (19%) e rotura de espessura completa em 22 (13%).

Lehman et al.²⁷, em 1995, estudam a incidência da rotura transfixante do manguito rotador em 235 cadáveres, totalizando 456 ombros examinados. Em 78 ombros (17%) são encontradas roturas de espessura completa do manguito rotador. A média da idade dos cadáveres com rotura transfixante do manguito rotador é de 77,8 anos e de 64,7 anos no grupo com manguito rotador intacto. A incidência de rotura de espessura total também cresceu com o aumento da idade. Em cadáveres com menos de 60 anos de idade, a incidência de rotura do manguito rotador foi de 6% em oposição a 30% naqueles com mais de 60 anos de idade.

Yamaguchi et al.²⁸, em 2006, avaliam 588 pacientes com dor no ombro utilizando ultrassonografia bilateral. Observam, em 199 pacientes (33,8%), rotura parcial ou transfixante do manguito rotador unilateralmente e em 177 (30,1%) rotura bilateral. A presença da rotura é positivamente correlacionada com a idade. Pacientes com manguito rotador íntegro, rotura unilateral e rotura bilateral do manguito rotador têm média da idade de 49, 59 e 68 anos, respectivamente.

Yamamoto et al.², em 2010, em um estudo transversal realizado em uma cidade japonesa, observam que a prevalência da rotura completa do manguito rotador numa amostra de 683 habitantes (1366 ombros) é de 20,7%. A frequência da lesão apresenta tendência crescente com a idade, chegando a 50% nos habitantes acima de 80 anos.

2.2 Patogênese da rotura do manguito rotador

Neviaser e Neviaser²⁹, em um artigo de revisão de 1990, descrevem que a rotura do manguito rotador é ocasionada por uma combinação de quatro elementos: hipovascularização tendínea, alterações degenerativas dos tendões relacionadas à idade, macro ou microtraumatismos e fatores anatômicos ou mecânicos. Estes elementos estão inter-relacionados e contribuem para a diminuição da resistência tendínea.

Maffulli et al.⁴, em 2011, afirmam que a patogênese da rotura do manguito rotador é multifatorial. O atrito ou impacto das estruturas extrínsecas ao tendão em associação com alterações degenerativas intrínsecas são responsáveis pela rotura tendínea.

2.2.1 Fatores extrínsecos

Neer³⁰, em 1972, observa que a área crítica para rotura e tendinopatia do supraespinal está em íntimo contato com a face anterior do acrômio, ligamento coracoacromial e terço distal da clavícula durante o movimento de elevação do ombro.

Bigliani et al.³¹, em 1986, estudam a associação entre a morfologia do acrômio e a rotura de espessura completa do manguito rotador. Utilizam 140 ombros de cadáveres. A incidência total de rotura transfixante é de 34%. Três tipos de acrômios são identificados: tipo I ou plano, que foi encontrado em 17%; tipo II ou curvo, presente em 43% e tipo III ou ganchoso, em 39%. O tipo ganchoso está presente em 70% dos ombros com rotura do manguito rotador, enquanto apenas 3% dos acrômios planos têm uma rotura do manguito rotador associada.

Fukuda et al.³², em 1991, afirmam que as alterações histológicas presentes na rotura do manguito rotador são decorrentes do atrito entre estes tendões e a face inferior do acrômio.

Bigliani et al.³³, em um artigo de revisão de 1991, concluem que variações na arquitetura do arco coracoacromial são responsáveis pelo desenvolvimento da rotura sintomática do manguito rotador.

Banas et al.³⁴, em 1995, encontram uma associação da rotura do manguito rotador com acrômios mais inclinados inferiormente na sua porção lateral.

Miyazaki et al.³⁵, em 2010, avaliam a associação da forma do acrômio, especificamente sua projeção lateral, com a rotura do manguito rotador. Os autores mensuram o índice acromial, que consiste na razão entre as distâncias da cavidade glenoidal a superfície lateral do acrômio e da cavidade glenoidal a superfície lateral do tubérculo maior do úmero. São avaliados 83 indivíduos com rotura do manguito rotador e 28 controles. Os pacientes com rotura do manguito rotador possuem índice acromial estatisticamente maior ($p < 0,001$), o

que confirma a associação de uma maior projeção lateral do acrômio com as roturas do manguito rotador.

2.2 Fatores intrínsecos

Wilson e Duff³⁶, em 1943, observam após a dissecação de 125 ombros, que a rotura do manguito rotador tem uma frequência crescente com a idade. Exame histológico é realizado em todos espécimes e os autores concluem que alterações degenerativas como a desorganização e a diminuição do número de fibras colágenas têm maior prevalência nos indivíduos idosos.

Rothman e Park³⁷, em 1965, estudam a anatomia vascular do manguito rotador. Em 63% de 72 dissecações realizadas é observada uma área hipovascular no tendão supraespinal próximo a sua inserção, localização mais comum da rotura deste tendão.

Ratbun e Macnab³⁸, em 1970, realizam um estudo anatômico e confirmam as observações de Rothman e Park³⁷. Encontram uma zona hipovascular na região insercional do tendão supraespinal. Relatam também que a porção superior do tendão infraespinal e a intra-articular da cabeça longa do bíceps são irrigadas por poucos vasos sanguíneos.

Osaki et al.³⁹, em 1988, avaliam 200 ombros de 100 cadáveres. O manguito rotador é normal em 52% dos espécimes. Rotura parcial e completa são encontradas em 35% e 13% dos ombros, respectivamente. Os espécimes são avaliados radiograficamente e histologicamente. Nos ombros com rotura parcial na face articular do manguito rotador, nenhuma alteração histológica no acrômio é identificada. Entretanto nos ombros com rotura completa ou parcial

na face subacromial, alterações como hipertrofia do osso trabecular e desarranjo das fibras colágenas são encontradas na superfície inferior do acrômio. Os autores afirmam que a rotura do manguito rotador provavelmente é decorrente a um processo degenerativo tendíneo e as alterações encontradas no acrômio são secundárias a esta rotura.

Lohr e Uhthoff⁴⁰, em 1990, estudam a vascularização do tendão supraespinal em 18 espécimes. Eles confirmam a presença de uma zona hipovascular no tendão supraespinal próxima a sua inserção no tubérculo maior do úmero. Após exame histológico, observam que a irrigação é mais deficiente na face articular, área que mais frequentemente está acometida por alterações degenerativas ou rotura tendínea.

Sano et al.⁴¹, em 1999, dissecam 76 ombros e avaliam histologicamente o manguito rotador. Observam rotura parcial em 22%. Alterações degenerativas dos tendões como diminuição da espessura ou rotura incompleta das fibras colágenas e presença de tecido de granulação são mais frequentes nos ombros com rotura parcial. Estas alterações são mais pronunciadas na face articular dos tendões, o que favorece a hipótese que as alterações tendíneas intrínsecas são as principais causas da rotura de espessura completa do manguito rotador.

Hashimoto et al.⁴², em 2003, avaliam fragmentos da borda de roturas do manguito rotador de 80 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico. Encontram uma alta prevalência de alterações degenerativas nos espécimes coletados, incluindo diminuição da espessura e desorientação das fibras colágenas, degeneração mixoide e hialina, metaplasia condroide, calcificações e infiltração gordurosa. Estas alterações são mais pronunciadas nas camadas

média e profunda dos tendões. Os autores concluem que as alterações degenerativas nas camadas média e profunda dos tendões em associação com microtraumatismos de repetição parecem ser as principais causas da rotura do manguito rotador.

Ikemoto et al.⁴³, em 2007, estudam a microcirculação da borda do tendão supraespinal na rotura do manguito rotador. Amostras de 31 pacientes com rotura de espessura completa são colhidas durante o tratamento cirúrgico e enviadas para estudo anatomopatológico, onde é realizada a contagem das fendas vasculares por mm². Amostras de tendões normais de cadáveres frescos são utilizadas como grupo controle. Diferentemente dos achados de Lohr e Uthoff⁴⁰, os autores encontram uma área hipervascular nas bordas das roturas do manguito rotador. Entretanto, os autores descrevem que alterações degenerativas do tendão como o afinamento e a irregularidade das fibras de colágeno, degeneração mixoide e hialina, entre outras, estão presentes na borda da rotura e justificam o desbridamento artroscópico dessa área, que possivelmente viabiliza a cicatrização do tendão após o tratamento cirúrgico.

2.2.3 Histopatologia da rotura do manguito rotador

Riley et al.⁴⁴, em 1994, estudam a composição de água e colágeno dos tendões do manguito rotador. Os tendões são constituídos principalmente por água, representando 75% a 85% da sua massa total. Tendões doentes têm um aumento significativo na quantidade de água. Outros elementos dos tendões são as fibras colágenas, células e a matriz extracelular. O colágeno tipo I corresponde a 95% do colágeno presente nos tendões normais, o restante

sendo constituído pelos tipos III, IV e V. Na tendinopatia do supraespinal, os autores encontram um aumento significativo na proporção de colágeno do tipo III, que é menos organizado e possui menor resistência à força de tração.

Kumagai et al.⁴⁵, em 1994, avaliam, através de imuno-histoquímica, a composição das fibras colágenas na inserção tendínea do manguito rotador em cadáveres. Observaram que os idosos possuem maior percentagem de fibras de colágeno tipo III e menor quantidade de colágeno tipo I em relação a controles mais jovens. Estas alterações na distribuição das fibras colágenas também foram acompanhadas de outras alterações degenerativas como proliferação fibrovascular, calcificações e microrroturas.

Kirkendall e Garrett⁴⁶, em 1997, afirmam que as fibras colágenas correspondem a 85% da massa seca dos tendões e que os tenócitos são responsáveis pela produção das fibras colágenas, bem como de outros elementos da matriz extracelular como elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas.

Longo et al.³, em 2011, em um artigo de revisão, descrevem que a matriz extracelular promove suporte para as fibras colágenas e regula a transformação de pró-colágeno nas formas maduras de colágeno. Ela é constituída por proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e outras pequenas moléculas. Tendões normais estão submetidos a uma remodelação tecidual contínua (degradação e reparo) mediada pelas MMPs.

De Giorgi et al.⁶, em 2014, em uma revisão, afirmam que as alterações histopatológicas encontradas nos tendões de pacientes com rotura do manguito rotador são: diminuição da espessura e desorganização das fibras de colágeno, presença de tecido de granulação, aumento dos níveis de

glicosaminoglicanos, metaplasia fibrocartilaginosa e infiltração gordurosa. E estes achados histológicos estão associados a um aumento da produção das MMPs e uma diminuição dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs).

2.3 Metaloproteinases da matriz (MMPs)

Gross e Lapierre⁴⁷, em 1962, relatam a presença de uma enzima capaz de digerir as fibras colágenas da cauda de um anfíbio.

Bauer et al.⁴⁸, em 1970, descrevem a presença de uma colagenase na pele humana, capaz de degradar as fibras colágenas sob condições fisiológicas de pH, osmolaridade e temperatura.

Goldberg et al.⁴⁹, em 1986, identificam a estrutura molecular da enzima descrita por Bauer et al.⁴⁸ Esta proteína é obtida de fibroblastos adultos da pele humana e é nomeada como MMP-1.

Nagase e Woessner Jr.⁵⁰, em 1999, afirmam que as MMPs são um grupo de enzimas capazes de digerir os elementos da matriz extracelular. São essenciais no desenvolvimento embrionário, reprodução, cicatrização de feridas, reabsorção e remodelamento tecidual. A produção das MMPs é regulada por citocinas, fatores de crescimento e hormônios.

Brew et al.⁵¹, em 2000, relatam que as MMPs têm sua forte ação proteolítica bloqueada pelas TIMPs, que constituem uma família de 4 proteínas: TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4.

Amalinei et al.⁵², em 2007, em uma revisão não sistemática, descrevem a existência de 26 MMPs que apresentam similaridade estrutural e funcional.

Para ser classificada como uma metaloproteinase, a proteína deve ter, pelo menos, um domínio catalítico ligado a um sítio de zinco. As MMPs são secretadas sob uma forma inativada e várias enzimas, como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase participam da transformação para seu estado ativo. Dos genes das MMPs humanas, dez estão no cromossomo 11, entre elas, as MMP-1 e 3.

2.3.1 Metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1)

Birkedal-Hausen et al.⁵³, em 1993, afirmam que a MMP-1, também chamada de colagenase-1, apresenta uma importante função na digestão do colágeno tipo I, o maior componente da matriz extracelular. Esta enzima também é capaz de degradar outros tipos de colágeno, como os tipos II e III. É produzida pelos fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos.

Dalton et al.⁵⁴, em 1995, avaliam a produção da MMP-1 em amostras de tendões do manguito rotador coletadas durante o tratamento cirúrgico de 18 pacientes. A MMP-1 e fibras colágenas digeridas são encontradas em todas as amostras, o que demonstra a presença e atividade da MMP-1 na degradação tecidual dos tendões do manguito rotador.

Brinckehoff e Matrisian⁵⁵, em 2002, relatam que em condições fisiológicas habituais, o nível de produção da MMP-1 é baixo. Entretanto, sua expressão pode aumentar substancialmente em situações que alteram a homeostase tecidual, como na cicatrização de feridas e na reparação ou remodelação tecidual que ocorre em diversas doenças.

Pardo e Selman⁸, em 2005, afirmam que a colagenase-1 tem sua produção regulada por fatores de crescimento, hormônios e citocinas e sua atividade proteolítica é controlada através de ativadores e inibidores como as alfa-macroglobulinas e os TIMPs.

2.3.2 Metaloproteinase da matriz-3 (MMP-3)

Birkedal-Hausen et al.⁵³, em 1993, relatam que a MMP-3, também chamada de estromelina-1, é produzida por fibroblastos, condrócitos e células do tecido sinovial. Esta enzima é capaz de digerir o colágeno tipo II, IV, V, IX e a elastina, presentes na matriz extracelular.

Munhoz et al.¹⁶, em 2010, afirmam que a MMP-3 participa da ativação de outras MMPs como as MMP-1, MMP-2 e MMP-9, além de degradar importantes componentes da matriz extracelular. Sua transcrição é regulada por hormônios, citocinas e fatores de crescimento. Sua expressão também pode ser induzida por alterações nas condições teciduais, como sobrecarga mecânica e inflamação.

2.3.3 Metaloproteinases da matriz e a rotura do manguito rotador

Gotoh et al.¹¹, em 1997, estudam a presença da MMP-1 em amostras do osso subcondral na região insercional do tendão supraespinal utilizando imunohistoquímica. Os autores comparam os resultados obtidos em 16 pacientes submetidos ao reparo do manguito rotador com 6 cadáveres com tendões íntegros. Forte imunorreatividade é detectada em todos pacientes,

demonstrando grande produção da MMP-1. Nos controles é encontrada pequena atividade da MMP-1.

Osawa et al.¹⁰, em 2004, comparam quantitativamente os níveis de MMPs, citocinas e TIMPs no líquido sinovial, pelo método de ensaio imunoenzimático, entre pacientes com roturas completas do manguito rotador e controles com tendões íntegros. Os autores encontram níveis significativamente maiores das MMP-1 e MMP-3 nos pacientes com rotura do manguito rotador.

Voloshin et al.¹², 2005, estudam a produção de citocinas, MMPs e ciclo-oxigenases na bolsa subacromial em pacientes com rotura do manguito rotador. Os autores observam uma concentração significativamente maior das MMP-1, MMP-9 e citocinas nos pacientes com rotura do manguito rotador em relação aos pacientes controles.

Lakemeier et al.⁵⁶, em 2011, avaliam fragmentos de tendões coletados durante o procedimento cirúrgico de 36 pacientes com rotura do manguito rotador e encontram uma concentração significativamente maior das MMP-1 e MMP-9 em relação a 6 pacientes controles com manguito rotador íntegro.

Gotoh et al.⁵⁷, em 2012, observam que pacientes com rerrotura do manguito rotador apresentam níveis de MMP-3 significativamente superiores aos pacientes com reparos íntegros. As amostras dos tendões lesionados são coletadas durante o procedimento cirúrgico e os níveis de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro da MMP-3 são medidos pela técnica de PCR. Os autores sugerem que esta MMP pode estar implicada na falha de cicatrização dos reparos tendíneos.

Robertson et al.⁵⁸, em 2012, estudam 30 pacientes submetidos ao reparo de roturas do manguito rotador e observam que em 23% destes houve falha da cicatrização tendínea. As avaliações da integridade tendínea são realizadas por ultrassonografia com 6 e 12 meses após o tratamento cirúrgico. Durante o tratamento cirúrgico, amostras do tendão supraespinal são obtidas e por intermédio da técnica de PCR quantitativo são medidos os níveis da produção das MMP-1 e MMP-9. Os pacientes com rerrotura do manguito rotador apresentam maior expressão das MMP-1 e MMP-9 ($p = 0,006$ e $0,02$, respectivamente) em relação aos pacientes com manguito rotador cicatrizado.

Abrams et al.⁵⁹, em 2016, avaliam pacientes com rotura do manguito rotador e indivíduos com manguito rotador íntegro, confirmados por ressonância magnética e artroscopia. No estudo são realizadas biópsias do tecido sinovial no intervalo dos rotadores de todos pacientes. Níveis de RNA mensageiro da MMP-3 e interleucina-6 foram maiores nos pacientes com rotura do manguito rotador, demonstrando maior expressão gênica destas proteínas.

Chaudhury et al.⁶⁰, em 2016, analisam a expressão gênica de amostras obtidas dos tendões do manguito rotador de 28 pacientes submetidos ao reparo das lesões destes tendões e comparam os resultados com 12 controles assintomáticos. Os autores observam que tendões do manguito rotador rotos têm maior expressão gênica das MMPs 3, 10, 12, 13, 15, 21, e 25 em relação aos controles.

Leal et al.⁶¹, em 2017, estudam amostras de tendões de 40 pacientes submetidos ao tratamento artroscópico de roturas do manguito rotador e de 11 controles com fraturas da extremidade proximal do úmero tratadas cirurgicamente e com o manguito rotador íntegro. Os autores avaliam a

expressão gênica de diferentes metaloproteínas e o estado de metilação próximo aos sítios de transcrição dos genes responsáveis pela produção destas enzimas. A metilação consiste na adição de grupamentos metila a base citosina (C), que ocasiona uma diminuição da transcrição dos genes. Os autores concluem que alterações na expressão gênica das metaloproteínas e na metilação desses genes ocorrem nas amostras dos tendões rotos do manguito rotador e podem desempenhar um papel no desenvolvimento destas lesões.

2.4 Polimorfismo genético

Sherry et al.¹⁴, em 1999, descrevem que os polimorfismos genéticos são variações que ocorrem naturalmente na estrutura primária da molécula do DNA e estão presentes aproximadamente a cada 500 a 1000 pares de bases (pb).

Brookes¹⁵, em 1999, durante artigo de revisão, afirma que 90% dos polimorfismos encontrados no DNA são SNPs, onde ocorrem deleções ou substituições de um único nucleotídeo. Alelos são as formas alternativas destas variações e têm uma frequência maior que 1% na população humana.

Ye⁶², em 2000, relata que embora os polimorfismos genéticos, em sua maioria, sejam funcionalmente neutros, uma parte deles exerce alguma atividade na regulação da expressão gênica ou na função das proteínas codificadas. O que faz um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada doença.

Stoneking⁶³, em 2001, afirma que o genoma humano é formado por 3,2 bilhões de nucleotídeos e um SNP é encontrado, na estrutura da molécula do

DNA, a cada 1000 a 2000 nucleotídeos. Portanto, o número de SNPs presentes no genoma humano é igual a 1,6 a 3,2 milhões.

2.4.1 Polimorfismo genético e as metaloproteínases da matriz

2.4.1.1 Polimorfismo genético e a metaloproteínase da matriz-1

Rutter et al.¹⁷, em 1998, descrevem um polimorfismo genético na posição -1607 da região promotora do gene da MMP-1 (rs1799750), localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q22.3). A presença de uma ou duas guaninas resulta em dois alelos, chamados 1G e 2G. O alelo 2G está associado a um aumento da atividade de transcrição deste gene. Os autores afirmam que os pacientes com alelo 2G têm maior degradação da matriz extracelular.

Song et al.⁶⁴, em 2008, descrevem a correlação do polimorfismo -1607 da MMP-1 com transtornos do disco intervertebral na população chinesa. São os primeiros autores a relatar uma associação entre variações genéticas na região promotora do gene da MMP-1 com doenças ortopédicas.

Godoy-Santos et al.⁶⁵, em 2009, realizam um estudo caso-controle e observam que indivíduos com sinais radiográficos de soltura asséptica da artroplastia total do quadril têm maior chance de ter o alelo 2G (83%) em relação aos indivíduos com artroplastia sem sinais de soltura (21%). A maior produção da MMP-1 explica a maior degradação da matriz extracelular óssea, o que torna menos provável a osteointegração da prótese nos pacientes com alelo 2G.

Godoy-Santos et al.²⁴, em 2013, estudam a associação do polimorfismo -1607 (rs1799750) da MMP-1 com a tendinopatia do tendão tibial posterior. Pacientes sem sinais de doença no tendão tibial posterior têm uma prevalência de 75% do alelo 1G e 62% do genótipo 1G/1G, enquanto os pacientes com tendinopatia mostram uma prevalência de 78% do alelo 2G e 72% do genótipo 2G/2G ($p < 0,001$). O polimorfismo -1607 da MMP-1 está associado com a tendinopatia do tendão tibial posterior.

Baroneza et al.⁶⁶, em 2014, relatam que outro polimorfismo do gene da MMP-1 localizado na posição -519 está associado a tendinopatia do tendão tibial posterior ($p = 0,01$). Este polimorfismo se caracteriza pela substituição de uma base nucléica adenina por uma guanina. Indivíduos com alelo G têm menor chance de ter a doença (RC 0,48; IC 95% 0,29 a 0,78).

2.4.1.2 Polimorfismo genético e a metaloproteinase da matriz-3

Ye et al.⁶⁷, em 1995, são os primeiros autores a relatar um polimorfismo na posição -1612 do gene da MMP-3 (rs3025058), localizado no cromossomo 11 (11q22.3). O sítio inicial de transcrição do gene na região promotora pode apresentar uma sequência de cinco ou seis adeninas, resultando nos alelos 5A e 6A.

Ye et al.⁶⁸, em 1996, realizam um estudo experimental utilizando culturas de células de fibroblastos e células musculares lisas vasculares e observam que o alelo 5A do polimorfismo na posição -1612 da MMP-3 tem maior atividade transcricional. Portanto, células com o alelo 5A possuem maior produção da MMP-3.

Lu et al.⁶⁹, em 2007, descrevem que o polimorfismo -1612 da MMP-3 têm um desequilíbrio de ligação com o polimorfismo -1607 da MMP-1, indicando uma alta porcentagem de associação não aleatória de determinados alelos dos dois SNPs.

Raleigh et al.²⁵, em 2009, avaliam 114 pacientes com tendinopatia ou rotura do tendão do calcâneo e 98 controles assintomáticos. São estudados 3 polimorfismos genéticos localizados no gene da MMP-3 (rs679620, rs591058 e rs650108). Os genótipos GG do polimorfismo rs679620 ($p = 0,010$), CC do rs591058 ($p = 0,023$) e o AA do rs650108 ($p = 0,043$) estão significativamente associados com a tendinopatia do tendão calcâneo. Embora não tenham estudado diretamente o polimorfismo -1612 da MMP-3, os autores afirmam que este polimorfismo pode estar em alto desequilíbrio de ligação com o polimorfismo rs679620.

Rahin et al.⁷⁰, em 2016, descrevem em uma revisão não sistemática que o polimorfismo -1612 da MMP-3 está associado à rotura do ligamento cruzado anterior⁷¹ e aos transtornos do disco intervertebral^{72,73}.

2.5 Genética e a rotura do manguito rotador

2.5.1 Estudos epidemiológicos

Harvie et al.¹⁸, em 2004, avaliam 129 irmãos de pacientes com diagnóstico de rotura completa do manguito rotador e utilizam os cônjuges dos pacientes como grupo controle. São realizados exames clínico e de ultrassonografia para avaliação da integridade tendínea. Os irmãos dos

pacientes têm um risco relativo (RR) de 2,42 (IC 95% 1,77 a 3,31; $p < 0,001$) de apresentarem uma rotura completa do manguito rotador e quase cinco vezes mais risco (IC 95% 2,42 a 8,63; $p < 0,001$) de terem sintomas em relação ao grupo controle. Este achado, segundo os autores, infere que fatores genéticos têm papel no desenvolvimento das roturas do manguito rotador.

Tashjian et al.¹⁹, em 2009, avaliam a predisposição genética para rotura do manguito rotador usando o banco de dados populacional de Utah nos Estados Unidos da América (EUA). Os autores observam que familiares de segundo (RR 3,66; IC 95% 1,47 a 9,11; $p = 0,008$) e terceiro grau (RR 1,81; IC 95% 1,05 a 3,11; $p = 0,048$) dos pacientes com rotura do manguito rotador têm maior possibilidade de desenvolver a mesma lesão. Concluem que uma melhor compreensão dos riscos familiares pode levar à identificação de genes que predispõem os indivíduos a esta doença.

Gwilym et al.⁷⁴, em 2009, reavaliam, após 5 anos, a mesma casuística do artigo de Harvie et al.¹⁸ e observam que os irmãos dos pacientes submetidos ao reparo do manguito rotador têm maior risco para aumento do tamanho da lesão tendínea (RR 2,08; IC 95% 1,58 a 2,7; $p = 0,007$) em relação ao grupo controle. Inferem que fatores genéticos não estão apenas relacionados ao desenvolvimento, mas também têm participação na progressão destas lesões.

Tashjian et al.⁷⁵, em 2014, estudam 92 pacientes com rotura completa do manguito rotador e 92 indivíduos controles com o manguito rotador íntegro. Os autores demonstram que pacientes com rotura do manguito rotador têm maior chance de terem familiares com história de diagnóstico e/ou tratamento para a mesma doença (32,3%) em relação aos indivíduos controles (18,3%). A

presença de tendinopatias ou cirurgias tendíneas em outras articulações é também mais frequente nos indivíduos com rotura do manguito rotador (38,7%) em relação aqueles com manguito rotador íntegro (19,3%). Concluem que fatores genéticos e familiares estão relacionados ao desenvolvimento da rotura do manguito rotador e das tendinopatias em outras articulações.

2.5.2 Polimorfismo genético e a rotura do manguito rotador

September et al.⁷⁶, em 2007, afirmam em uma revisão não sistemática que diversos genes podem estar envolvidos no desenvolvimento das roturas do manguito rotador, tendo cada um deles uma pequena contribuição. Interações complexas ocorrem entre as proteínas, codificadas pelos múltiplos genes, e o ambiente no desenvolvimento destas lesões.

Motta et al.²², em 2014, são os primeiros autores a correlacionar o polimorfismo genético com as roturas do manguito rotador. A casuística do artigo é composta por 410 pacientes, 203 casos com diagnóstico de síndrome do manguito rotador (tendinopatia, rotura parcial ou completa) e 207 controles assintomáticos. São avaliados 23 SNPs em 6 genes envolvidos no processo de degeneração e reparação tecidual: defensina beta 1 (DEFB1), "Differentially expressed in normal and neoplastic cells D2" (DENND2C), receptor β relacionado ao estrogênio (ESRBB), fator de crescimento fibroblasto-3 (FGF3), fator de crescimento fibroblasto-10 (FGF10) e receptor do fator de crescimento fibroblasto-1 (FGFR1). Os autores após regressão logística multivariada encontram uma associação de 2 SNPs com a rotura do manguito rotador, um

localizado próximo ao gene do ESRBB (RC 0,22; IC 95% 0,08 a 0,61; $p = 0,004$) e outro no gene do FGF3 (RC 0,33; IC 95% 0,12 a 0,91; $p = 0,03$).

Teerlink et al.²¹, em 2015, pesquisam 69 SNPs nos mesmos 6 genes avaliados previamente por Motta et al.²² e observam que apenas um SNP localizado próximo ao gene da ESRBB está relacionado à rotura do manguito rotador (RC 1,41; IC 1,11 a 1,79; $p < 0,001$). Apesar da associação evidente, os autores afirmam que o papel deste receptor nuclear na fisiopatologia do manguito rotador é incerto. Uma explicação possível é que o ESRBB pode ativar a transcrição do fator indutor de hipóxia (HIF) que modula a apoptose em ambientes hipóxicos. A inserção do manguito rotador tem um ambiente relativamente hipóxico e a desregulação da resposta ESRBB / HIF pode resultar em apoptose, aumentando a predisposição para o desenvolvimento da tendinopatia e rotura do manguito rotador.

Tashjian et al.²⁰, em 2016, estudam a correlação de 257.588 SNPs presentes em todo genoma com as roturas do manguito rotador. São avaliados 311 pacientes e 2641 controles. Dois SNPs localizados em genes relacionados a apoptose ou morte celular, *SASH1* (RC = 0,4; IC 95% = 0,3 a 0,5) e *SAP30PB* (RC 2,4; IC 95% 1,7 a 3,4), estão associados à rotura do manguito rotador.

Kluger et al.²³, em 2016, estudam a associação de 79 SNPs dos genes da TNC, Colágeno tipo V alfa1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-13 com as roturas do manguito rotador. Os autores relatam que 6 SNPs localizados no gene da TNC estão significativamente associados a estas lesões.

Tashjian et al.⁷⁷, em 2016, avaliam a integridade do reparo tendíneo em 72 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico de roturas posterossuperiores do manguito rotador. Os pacientes são avaliados por exame de ressonância magnética com intervalo mínimo de 1 ano entre o exame e a cirurgia. Em 42% dos pacientes é encontrada rerotura do manguito rotador. História familiar de rotura do manguito rotador ($p = 0,036$) e um SNP localizado no gene da ESRBB ($p = 0,006$) estão associadas à rerotura do manguito rotador. Concluem que as variações de determinados genes não têm apenas participação no desenvolvimento das roturas do manguito rotador, elas também podem influenciar a cicatrização dos reparos tendíneos.

Kluger et al.⁷⁸, em 2017, avaliam 302 pacientes submetidos ao reparo do manguito rotador e 1 ano após o tratamento cirúrgico realizam ultrassonografia para confirmar a integridade tendínea. Os autores pesquisam 15 SNPs no gene da TNC e verificam se há associação entre estes SNPs e a falha da cicatrização do reparo do manguito rotador. Eles encontram uma correlação de 8 SNPs da TNC com a presença de reroturas do manguito rotador. Este dado colabora para hipótese que o gene da TNC tem função no desenvolvimento das roturas do manguito rotador, bem como na cicatrização dos reparos realizados.

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo, participantes e elegibilidade

Realizamos um estudo caso-controle em uma proporção 1:1. Avaliamos pacientes com idade inferior a 65 anos submetidos ao reparo de rotura completa do manguito rotador no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HCFMUSP). O grupo controle foi constituído por pacientes atendidos no mesmo hospital por afecções traumáticas não envolvendo a cintura escapular, sem queixa de dor nos ombros e, ao exame físico, sem a presença de sinais de rotura do manguito rotador (Anexo A). Todos os pacientes e controles foram submetidos à exame de imagem (ressonância magnética ou ultrassonografia) para confirmar a rotura ou a integridade do manguito rotador. Os pacientes e os controles foram pareados por idade com diferença máxima de ± 2 anos.

Os critérios de não inclusão foram: doenças reumatológicas, diabetes, cirurgias prévias no ombro e processos infecciosos prévios ou atuais nesta articulação. Também não foram incluídos os pacientes com rotura do manguito rotador traumática, bem como aqueles com rotura parcial.

As avaliações foram realizadas entre junho de 2014 e dezembro de 2015.

3.2 Aprovação na comissão de ética e termo de consentimento

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 11 de abril de 2014, como protocolo de pesquisa 11186 (Anexo B).

A todos os pacientes selecionados foi explicado do que se tratava a pesquisa e foi oferecida a opção de participação ou não. Todos os participantes ou seus responsáveis legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O termo assegurava ao paciente a prerrogativa de participar ou não da pesquisa, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento (Anexo C).

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

3.3 Custo

O estudo não contou com auxílio financeiro de nenhum órgão de fomento à pesquisa. O tratamento dos pacientes foi custeado com verba própria do hospital, proveniente do SUS. O material necessário para obtenção do DNA e determinação dos genótipos da população estudada foi pago com verba regular do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. Os pesquisadores não apresentam conflito de interesses.

3.4 Variáveis avaliadas

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, por meio de entrevista com questionário padronizado (Anexo E) foram coletados os seguintes dados dos pacientes:

- idade;
- sexo;
- raça conforme a orientação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística¹;
- tratamento atual ou prévio de tendinopatias e lesões tendíneas em outras articulações;
- presença de familiares consanguíneos com tratamento prévio para rotura do manguito rotador;
- tabagismo atual;
- presença de hipertensão arterial sistêmica;
- presença de hipotireoidismo;
- realização de esportes com uso dos membros superiores;
- atividade profissional com esforços repetitivos em abdução dos ombros (tempo maior ou igual a 2 horas por dia)⁷⁹.

1 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores sociais mínimos. Conceitos. [Internet] Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/população/condicaodevida/indicadoresminimos/conceitos.shtm>

3.5 Avaliação por imagem

3.5.1 Ressonância magnética

Os pacientes e os controles realizaram exame de ressonância magnética no aparelho GE HDxt[®] de 1,5 Tesla (GE Healthcare[®], Waukesha, Wisconsin, EUA) e as imagens foram avaliadas por um radiologista do Departamento de Radiologia do IOT-HCFMUSP. Foram incluídos como casos apenas os pacientes com roturas completas do manguito rotador e como controles apenas aqueles com todos tendões do manguito rotador íntegros, ou seja, sem qualquer sinal de rotura de espessura parcial ou completa do manguito rotador.

3.5.2 Ultrassonografia

Alternativamente à realização do exame de ressonância magnética, pacientes do grupo controle realizaram exame de ultrassonografia para avaliação da integridade do manguito rotador. Os exames foram realizados no Departamento de Radiologia do IOT-HCFMUSP. Foi utilizado o aparelho Logiq E9 (GE Healthcare[®], Waukesha, Wisconsin, EUA), com transdutor linear ML6-15 (GE Healthcare[®], Waukesha, Wisconsin, EUA).

3.6 Obtenção do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da camada mucosa da cavidade oral, por meio de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3%, concentração isomolar com a saliva, durante 2 minutos. Na amostra obtida dos indivíduos foi adicionado 3 ml de solução TNE [17 mM de Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM de NaCl e 7 mM de EDTA] diluída em 66% de etanol⁸⁰. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -20 °C até o momento de extração do DNA.

3.7 Extração do ácido desoxirribonucleico

A extração do DNA foi realizada na Universidade Federal do Paraná conforme protocolo de Aidar e Line⁸⁰. As amostras foram incubadas por 16 horas com 20 ng/ml de proteinase K (Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EUA) a 56 °C. Posteriormente, foram adicionados 500 µl de solução de 10 mM de acetato de amônio com 1mM de EDTA e vortexado por 5 segundos. Após centrifugação a 17000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e foram adicionados 540 µl de isopropanol para cada 900 µl da solução contendo DNA. Após nova centrifugação a 17000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi submetido à lavagem com etanol a 70% e seco por 15 minutos a 37 °C. O DNA foi obtido com a realização de suspensão em 100 µl de tampão TE [Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM] a temperatura ambiente por três horas. A concentração do DNA genômico de cada amostra foi mensurada com o auxílio de um quantificador de DNA Nanodrop®

(ThermoFisher Scientific Incorporation, Waltham, Massachusetts, EUA) e sua pureza estimada pela razão de densidade óptica 260/280.

3.8 Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificação dos fragmentos das regiões reguladoras dos genes da MMP-1 e MMP-3. Os SNPs estudados foram MMP-1 -1607 (rs1799750) e MMP-3 -1612 (rs3025058). A reação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient[®] (Eppendorf[®], Hamburgo, Alemanha) e obteve um volume final de 15 μ l. Cada 1 μ l da solução final apresentava aproximadamente 100 ng de DNA, 8 μ l de Go Taq[®] Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA), 200 nmol de oligonucleotídeos iniciadores ("primers") específicos para cada fragmento (Invitrogen[®], Carlsbad, Califórnia, EUA) e quantidade suficiente de água ultrapura. A mistura com os reagentes foi submetida à desnaturação inicial por 3 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C, anelamento à temperatura adequada para cada fragmento e extensão a 72 °C, 1 minuto em cada temperatura. Os oligonucleotídeos iniciadores, a temperatura e o tempo de anelamento (amplificação) estão descritos na Tabela 1.

3.9 Determinação do genótipo

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores pela técnica de Polimorfismo no

Comprimento de Fragmentos de Restrição. A digestão foi realizada com o volume final de 15 µl, por 16 horas a 37 °C.

O polimorfismo do gene da MMP-1 -1607 (rs1799750) é caracterizado pela inserção de uma base guanina (G), criando dois alelos diferentes (1G ou 2G). A enzima de restrição *XmnI* reconhece o alelo 1G, digerindo o fragmento de DNA de 118 pares de bases em duas partes: 89 e 29 pares de bases. O alelo 2G não é digerido por esta enzima de restrição, permanecendo como uma banda de DNA de 118 pares de bases. O polimorfismo da MMP-3 -1612 (rs3025058) se caracteriza por apresentar uma variação na sequência de adeninas, resultando nos alelos 5A ou 6A. A enzima de restrição *Tth1111* reconhece o alelo 5A, digerindo o fragmento de DNA de 129 pares de bases em duas partes de 97 e 32 pares de bases. O alelo 6A não é digerido por esta enzima de restrição.

Tabela 1 - Informações sobre as condições da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase

SNP	Oligonucleotídeos iniciadores	Tempo de anelamento	Temperatura de anelamento
MMP-1 (rs1799750)	F: TCGTGAGAATGTCTTCCCATT R: TCTTGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC	30 segundos	55 °C
MMP-3 (rs3025058)	F: GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAGA R: CTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT	1 minuto	53 °C

°C: graus Celsius; F: oligonucleotídeo iniciador direto; MMP-1: metaloproteinase da matriz-1; MMP-3: metaloproteinase da matriz-3; R: oligonucleotídeo iniciador reverso; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único.

3.10 Eletroforese dos fragmentos de ácido desoxirribonucleico

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), colocadas no interior de uma cuba de 10 X 10 cm (Uniscience Corporation, Miami, Flórida, EUA) e submetidas a uma corrente elétrica de 100 V; 120 mA e 60 W durante aproximadamente 30 minutos para confirmação da amplificação (PCR) e de 50 minutos para a corrida dos produtos da digestão (RFLP). Foram utilizados respectivamente o volume total de 5 µl da reação de PCR e 8 µl da reação de RFLP com 1,5 µl do reagente GelRed® (Biotium Incorporation, Fremont, Califórnia, EUA). A visualização foi feita em transluminador e a imagem foi capturada utilizando o programa DigiDoc GED® (DigiDoc Soluções, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil).

Na eletroforese, o alelo 2G da MMP-1 foi representado por uma banda de DNA de 118 pares de bases, o alelo 1G por uma banda de DNA de 89 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (118 e 89 pares de bases). Durante a eletroforese, a banda com 29 pares de bases do alelo 1G saía do gel (Figura 1). Por sua vez, o alelo 6A da MMP-3 foi representado por uma banda de DNA de 129 pares de bases, o alelo 5A por uma banda de DNA de 97 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (129 e 97 pares de bases). Durante a eletroforese a banda com 32 pares de bases do alelo 5A escapava do gel (Figura 2).

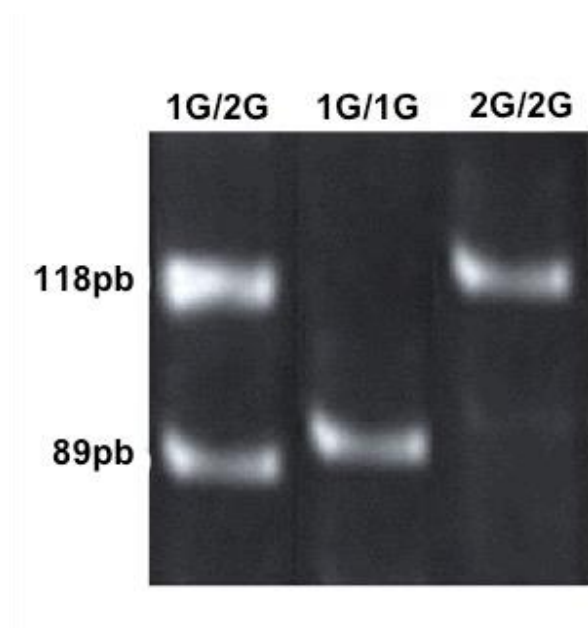


Figura 1 - Fragmentos amplificados e digeridos da metaloproteinase da matriz-1 mostrando os diferentes genótipos.



Figura 2 - Fragmentos amplificados e digeridos da metaloproteinase da matriz-3 mostrando os diferentes genótipos.

3.11 Cálculo da amostra

O cálculo da amostra utilizou um nível de significância de 5% e um poder de 80%. No momento da elaboração do protocolo de pesquisa não haviam estudos sobre a relação entre o polimorfismo genético das MMPs e a rotura do manguito rotador. Utilizando a taxa de 25% do alelo 2G da MMP-1 no grupo controle²⁴, uma diferença esperada de 25% entre os grupos e 10% de perda das amostras na extração e genotipagem do DNA, foram necessários 64 indivíduos em cada grupo.

3.12 Análise estatística

Submetemos as variáveis contínuas à avaliação da normalidade, através do teste de Kolmogorov-Smirnov, e da homogeneidade, através do teste de Levene. As variáveis contínuas foram apresentadas por médias e desvio padrão, enquanto as categóricas em valor absoluto e percentual.

A comparação entre os casos e controles, no que diz respeito às diferentes variáveis, foi realizada pelos testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher nas variáveis categóricas. Este último foi utilizado apenas quando alguma das células da tabela 2 x 2 apresentasse frequência menor do que cinco indivíduos. Nas variáveis contínuas, pelo teste *t* de Student se distribuição paramétrica dos dados ou Wilcoxon se não paramétrica.

Foi avaliada a diferença da frequência dos alelos e genótipos das MMP-1 e MMP-3 nos indivíduos com rotura do manguito rotador e controles pelo teste Qui-quadrado. Foram calculados para os diferentes genótipos a

probabilidade de associação com a rotura do manguito rotador como razão de chances com intervalo de confiança de 95%.

Utilizamos para análise dos dados o programa SPSS versão 21.0 (SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, EUA) e nível de significância de 5%.

O programa ARLEQUIN versão 2.0⁸¹ foi utilizado para a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada.

4 RESULTADOS

Avaliamos 128 pacientes, 64 com rotura completa do manguito rotador e 64 controles. Não tivemos perdas de amostras durante a extração e genotipagem do DNA. Os casos e controles tinham média da idade de $53,9 \pm 5,9$ e $53,3 \pm 6,1$, respectivamente ($p = 0,586$). Entre os pacientes submetidos ao reparo do manguito rotador, 44 (69%) eram do sexo feminino versus 40 (63%) no grupo controle ($p = 0,577$).

Os grupos não diferiram estatisticamente em relação a raça, tabagismo e a presença de hipertensão arterial ($p = 0,819$, $p > 0,999$, $p = 0,831$, respectivamente). As tendinopatias em outras localidades foram mais prevalentes entre os pacientes com rotura do manguito rotador ($p = 0,016$). As características gerais da amostra podem ser observadas na Tabela 2.

A distribuição dos genótipos dos participantes do estudo estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2 - Características gerais da amostra

	Casos (n = 64)	Controles (n = 64)	p
Idade, anos (média ± dp)	53,9 ± 5,9	53,3 ± 6,1	0,586
Sexo, n (%)			
Masculino	20 (31)	24 (37)	0,577
Feminino	44 (69)	40 (63)	
Raça, n (%)			
Branca	48 (75)	45 (70)	0,819
Parda	9 (14)	10 (16)	
Preta	7 (11)	9 (14)	
Outras tendinopatias, n (%)			
Sim	10 (16)	2 (3)	0,016
Não	54 (84)	62 (97)	
Tabagismo, n (%)			
Sim	9 (14)	9 (14)	>0,999
Não	55 (86)	55 (86)	
Hipertensão arterial sistêmica, n (%)			
Sim	13 (20)	15 (23)	0,831
Não	51 (80)	49 (77)	
Hipotireoidismo, n (%)			
Sim	1 (2)	2 (3)	>0,999
Não	63 (98)	62 (97)	
Profissão com esforços repetitivos em abdução dos ombros, n (%)			
Sim	26 (41)	23 (36)	0,716
Não	38 (59)	41 (64)	
Esporte com utilização dos membros superiores, n (%)			
Sim	5 (8)	8 (12)	0,560
Não	59 (92)	56 (88)	

dp: desvio padrão; n: número de pacientes; p: nível de significância.

4.1 MMP-1

Encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre os casos e controles na distribuição dos alelos e genótipos da MMP-1 ($p < 0,001$). No grupo controle, observamos uma taxa de 77% do alelo 1G e 64% do genótipo 1G/1G. Nos pacientes com rotura do manguito rotador, encontramos uma frequência de 48% do alelo 2G e 73% dos pacientes com genótipos 1G/2G ou 2G/2G (Tabelas 3 e 4). O cálculo da razão de chances revelou que indivíduos com genótipo 1G/2G ou 2G/2G apresentaram maior chance de apresentar uma rotura do manguito rotador (RC 4,8 [IC 95% 2,1 a 11,0] e 5,2 [IC 95% 1,8 a 14,9], respectivamente).

4.2 MMP-3

Também observamos uma diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos e genótipos da MMP-3 ($p = 0,045$, $p = 0,021$, respectivamente) entre os casos e controles (Tabelas 3 e 4). No grupo controle, observamos uma taxa de 41% do alelo 5A e nos casos esta frequência foi de 53%. Indivíduos com genótipo 5A/5A tiveram maior possibilidade de terem uma rotura do manguito rotador com razão de chances de 5,5 (IC 95% 1,4 a 20,9; $p = 0,021$).

4.3 Haplótipo 2G/5A

O haplótipo 2G/5A estava presente nas amostras de 42 (66%) casos

em 17 (27%) controles ($p < 0,001$). Indivíduos com este haplótipo apresentaram 4,3 mais chance de ter uma rotura do manguito rotador (RC 5,3; IC 95% 2,5 a 11,3; $p < 0,001$).

Tabela 3 - Frequência alélica dos polimorfismos dos genes das metaloproteinases da matriz

	Casos (n = 128)	Controles (n = 128)	p
MMP-1, n (%)			
1G	66 (52)	98 (77)	<0,001
2G	62 (48)	30 (23)	
MMP-3, n (%)			
5A	68 (53)	52 (41)	0,045
6A	60 (47)	76 (59)	

MMP-1: metaloproteinase da matriz-1; MMP-3: metaloproteinase da matriz-3; n: número de alelos; p: nível de significância.

Tabela 4 - Frequência genotípica dos polimorfismos dos genes das metaloproteinases da matriz e do haplótipo 2G/5A

	Casos (n = 64)	Controles (n = 64)	p	Razão de chances (IC 95%)
MMP-1, n (%)				
1G/1G	17 (27)	41 (64)	<0,001	
1G/2G	32 (50)	16 (25)		4,8 (2,1-11,0)
2G/2G	15 (23)	7 (11)		5,2 (1,8-14,9)
MMP-3, n (%)				
6A/6A	11 (17)	16 (25)	0,021	
5A/6A	38 (59)	44 (69)		1,3 (0,5-3,0)
5A/5A	15 (23)	4 (6)		5,5 (1,4-20,9)
Haplótipo 2G/5A				
Não	22 (34)	47 (73)	<0,001	
Sim	42 (66)	17 (27)		5,3 (2,5-11,3)

IC: intervalo de confiança; MMP-1: metaloproteinase da matriz-1; MMP-3: metaloproteinase da matriz-3; n: número de pacientes; p: nível de significância.

4.4 Antecedentes familiares para tratamento da rotura do manguito rotador

Os pacientes com rotura do manguito rotador relataram, em maior número, a presença de familiares consanguíneos que realizaram tratamento para a mesma doença em relação aos indivíduos controles ($p = 0,001$). Indivíduos com antecedentes familiares de tratamento para rotura do manguito rotador tiveram maior possibilidade de ter a mesma doença com razão de chances de 6,3 (IC 95% 2,0 a 19,9) (Tabela 5).

Tabela 5 – Presença de familiares consanguíneos que realizaram tratamento para rotura do manguito rotador

	Casos (n = 64)	Controles (n = 64)	p	Razão de chances (IC 95%)
Familiares que realizaram tratamento para RMR				
Sim	19 (30)	4 (6)	0,001	6,3 (2,0-19,9)
Não	45 (70)	60 (94)		

IC: intervalo de confiança; n: número de pacientes; p: nível de significância; RMR: rotura do manguito rotador.

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que os polimorfismos genéticos da MMP-1 (rs1799750) e da MMP-3 (rs3025058) estiveram associados à rotura do manguito rotador. Os genótipos 1G/2G ou 2G/2G na posição -1607 do gene da MMP-1 foram fatores de risco para a presença da rotura do manguito rotador, com uma razão de chances de 4,8 e 5,2, respectivamente, em relação aos indivíduos com genótipo 1G/1G. Os indivíduos com genótipo 5A/5A na posição -1612 do gene da MMP-3 foram mais suscetíveis à rotura do manguito rotador, com uma razão de chances de 5,5 em relação aos indivíduos com genótipo 6A/6A.

O alelo 2G do polimorfismo da MMP-1 na posição -1607 (rs1799750) aumenta a atividade transcricional do gene¹⁷ e encontramos uma taxa de 73% dos indivíduos com rotura do manguito rotador com genótipos 1G/2G ou 2G/2G. Este achado fornece uma base molecular para degradação das fibras colágenas e aumento da atividade da MMP-1 encontrados em estudos histopatológicos prévios em pacientes com rotura do manguito rotador^{10-13,56}. O alelo 5A da MMP-3 (rs3025058), encontrado em 82% dos pacientes com roturas do manguito rotador, caracteriza-se por aumentar a transcrição deste gene⁶⁸. Este achado pode explicar uma maior produção da MMP-3 em pacientes com rotura do manguito rotador em relação a pacientes assintomáticos encontrada em estudos prévios^{10,13,59}. Entretanto, a atividade transcricional dos genes das MMPs não está apenas associada aos polimorfismos de nucleotídeo único na região promotora. A síntese das MMPs

é induzida por citocinas, como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral, fatores de crescimento, interações célula-célula e célula-matriz⁷. O estado de metilação próximo aos sítios de transcrição das metaloproteinases pode também alterar a produção destas enzimas. A metilação consiste na adição de grupamentos metila a base citosina (C), que ocasiona uma diminuição da transcrição dos genes. Embora seja reversível, as alterações na metilação do DNA podem ter um efeito sobre a estrutura e homeostase dos tendões do manguito rotador⁶¹.

A regulação da homeostase da matriz extracelular e fibras colágenas dos tendões é complexa e não é surpreendente que diversos mecanismos fisiológicos são descritos para explicá-la⁷⁰. Contudo, a análise dos polimorfismos das MMPs têm provável valor clínico, aumentando o entendimento da fisiopatogenia da rotura do manguito rotador.

Alguns grupos de polimorfismos genéticos localizados em *loci* adjacentes no mesmo cromossomo podem ser herdados em combinação, são os chamados haplótipos¹⁶. Os polimorfismos genéticos podem agir sinergicamente, aumentando o risco para desenvolvimento das alterações tendíneas⁷⁰. De fato, os SNPs MMP-1 1G/2G e MMP-3 5A/6A estão localizados no cromossomo 11q22.3 e existe um alto desequilíbrio de ligação entre ambos⁶⁹. Nos pacientes submetidos ao reparo do manguito rotador, 42 (66%) tinham o haplótipo 2G/5A e nos controles encontramos o mesmo em apenas 17 (27%) ($p < 0,001$). Pacientes com haplótipo 2G/5A que está associado a um aumento da síntese das MMP-1 e MMP-3 tiveram uma razão de chances de 5,3 (IC 95%, 2,5 a 11,3) de apresentarem uma rotura do manguito rotador.

Diferentemente de Kluger et al.²³, nosso estudo encontrou diferença na distribuição dos alelos e dos genótipos das MMP-1 e MMP-3 entre os casos e os controles. O polimorfismo da MMP-1 estudado por estes autores²³ é o *rs17884110*, diferente do avaliado por nós, o que pode explicar os resultados conflitantes. Em relação a MMP-3, entretanto, o polimorfismo avaliado é o mesmo (*rs3025058*). O número menor de indivíduos avaliados, o não pareamento entre os casos e os controles para a idade e fatores de risco conhecidos como a hipertensão arterial, bem como características genéticas, raciais e populacionais^{82,83}, podem explicar a discordância entre os resultados.

Estudos iniciais descrevem que os familiares de indivíduos com rotura do manguito rotador têm maior risco de desenvolver a mesma doença^{18,19}. Harvie et al.¹⁸ afirmam que irmãos dos pacientes com rotura do manguito rotador têm um risco relativo (RR) de 2,42 de apresentarem a mesma lesão e quase cinco vezes mais risco de terem sintomas em relação ao grupo controle. No nosso estudo, encontramos que 19 pacientes com rotura do manguito rotador (30%) relataram a presença de familiares que realizaram tratamento para mesma doença. Entre os controles, apenas 4 (6%) relataram o mesmo, número significativamente inferior ($p < 0,001$). Este achado sugere uma predisposição familiar e genética para as roturas do manguito rotador.

Provavelmente um certo número de genes podem estar envolvidos no desenvolvimento das roturas do manguito rotador, apresentando cada um deles uma pequena contribuição. As proteínas codificadas pelos múltiplos genes e o ambiente participam concomitantemente no desenvolvimento destas lesões⁷⁶. Polimorfismos no gene do receptor β relacionado ao estrogênio^{21,22} e dois SNPs localizados em genes relacionados a apoptose ou morte celular,

SASH1 e *SAP30PB*²⁰, estão associados a rotura do manguito rotador. Entretanto, as funções destes genes ou de suas proteínas codificadas, na fisiopatologia da rotura do manguito rotador, não são bem conhecidas²¹. Por sua vez, o papel das MMPs na tendinopatia e rotura do manguito rotador é bem estabelecido, elas podem digerir os elementos da matriz extracelular e as fibras de colágeno⁷.

Os nossos resultados demonstram que o método de extração de DNA utilizado foi adequado para obtenção de quantidades suficientes de material genético. As técnicas de PCR e RFLP foram eficientes para identificação dos genótipos da MMP-1 e MMP-3. A amplificação dos fragmentos por técnica de PCR obteve resultado suficiente e a escolha das enzimas de restrições para a técnica de RFLP foi adequada para a análise dos polimorfismos estudados.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é a base da genética de populações e define que, em uma determinada amostra, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. A teoria de que alelos raros se tornam cada vez menos frequentes e que alelos dominantes aumentem cada vez mais sua frequência, simplesmente por já serem raros ou comuns, respectivamente, é matematicamente refutada pelo princípio de Hardy-Weinberg⁸⁴. Os polimorfismos nos genes da MMP-1 e MMP-3 apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg, garantindo que a distribuição genotípica ocorreu ao acaso.

Para os fatores de risco já conhecidos para as roturas do manguito rotador, como idade⁸⁵, sexo^{2,22}, tabagismo^{86,87}, raça branca²², presença de hipertensão arterial sistêmica⁸⁸, hipotireoidismo⁸⁹, atividade profissional com esforços repetitivos com os ombros^{2,79}, realização de esportes com utilização

dos membros superiores⁹⁰, não encontramos diferença estatística entre os dois grupos estudados. A ausência de diferença estatística para estas variáveis, entre os dois grupos estudados, diminui a influência de fatores sistêmicos ou de confusão que podem mascarar ou acentuar o real papel dos polimorfismos genéticos na fisiopatogenia das roturas do manguito rotador.

Os pacientes com rotura do manguito rotador têm maior chance de apresentarem tendinopatias ou lesões tendíneas em outras articulações^{75,91}. Encontramos 10 pacientes com rotura do manguito rotador (16%) que referiram tendinopatias em outras articulações e somente 2 (3%) dos pacientes controles relataram o mesmo ($p = 0,030$). Fatores genéticos e familiares provavelmente estão envolvidos no desenvolvimento de lesões tendíneas em múltiplos sítios^{75,92}.

Nosso estudo possui algumas limitações. Para um estudo genético, a amostra com 128 indivíduos avaliados pode ser considerada pequena. Estudos com amostras maiores ou em outras populações podem ser realizados para confirmar a associação destes polimorfismos com a rotura do manguito rotador. Os exames de imagem para confirmar a integridade do manguito rotador nos indivíduos assintomáticos não foram padronizados, sendo que os controles realizaram ressonância magnética ou ultrassonografia na avaliação. A ultrassonografia foi utilizada em 30 de 64 (47%) controles. Este exame foi utilizado por maior disponibilidade, rapidez e menor custo. Mas cabe ressaltar que nos estudos que avaliam a associação de polimorfismos genéticos com a rotura do manguito rotador, apenas Kluger et al.²³ realizam exames de imagem para confirmar a integridade tendínea nos controles assintomáticos e até 60% dos pacientes com rotura do manguito rotador podem ser assintomáticos^{93,94}.

Podemos afirmar também que a ultrassonografia possui sensibilidade e especificidade semelhante a ressonância magnética em diversos estudos⁹⁵⁻⁹⁷. Não avaliamos todos os fatores de risco conhecidos para a rotura do manguito rotador, como por exemplo o índice de massa corpórea⁹⁸ e o membro superior dominante do paciente². Esses fatores que não foram avaliados na nossa amostra, podem atuar como fatores de confusão nos resultados encontrados. Realizamos uma entrevista para coletar os dados sobre a presença de familiares consanguíneos com tratamento prévio para rotura do manguito rotador e sobre o tratamento atual ou prévio de tendinopatias e lesões tendíneas em outras articulações. Pacientes com rotura do manguito rotador poderiam ter uma melhor informação sobre as doenças ortopédicas pessoais e de seus familiares, levando a uma viés de memória. Como a informação foi relatada pelo paciente, os diagnósticos também podem ser imprecisos e ter aumentado a associação entre esses fatores de risco e a rotura do manguito rotador.

O conhecimento de marcadores genéticos relacionados à rotura do manguito rotador possibilita a identificação de indivíduos suscetíveis e o nosso estudo aumenta o conhecimento dos polimorfismos genéticos relacionados a esta doença. O interesse do nosso grupo é estudar outros polimorfismos genéticos, especialmente aqueles localizados nos genes das metaloproteinases, o que pode melhorar a compreensão sobre os mecanismos moleculares associados à rotura do manguito rotador. A identificação de polimorfismos genéticos também relacionados a falha de cicatrização dos reparos tendíneos também é um campo bastante promissor^{77,78}. Estudos experimentais têm demonstrado que o uso de moduladores ou inibidores da

atividade das MMPs podem influenciar a cicatrização e reparação tecidual do manguito rotador^{99,100}. No futuro, a investigação de outros marcadores genéticos poderá definir e padronizar todos os genes de risco para esta doença e, assim, criar condições adequadas para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas individualizadas, como, por exemplo, o uso dos inibidores de MMPs em pacientes suscetíveis à rotura do manguito rotador ou naqueles submetidos ao tratamento cirúrgico destas lesões para aumentar a probabilidade de cicatrização e resistência do reparo tendíneo.

6 CONCLUSÕES

O polimorfismo genético das MMP-1 e MMP-3 esteve associado à rotura do manguito rotador. Indivíduos com genótipos 1G/2G ou 2G/2G para MMP-1 e 5A/5A para MMP-3 tiveram maior chance de ter uma rotura do manguito rotador.

Indivíduos com haplótipo 2G/5A foram mais suscetíveis à rotura do manguito rotador na população estudada e pacientes com rotura do manguito rotador têm uma maior proporção de familiares com a mesma doença em comparação aos indivíduos controles.

7 ANEXOS

Anexo A - Exame físico realizado nos pacientes e controles incluídos no estudo

Testes realizados	Descrição do teste
Amplitude de movimento ativa e passiva dos ombros	Flexão, elevação, rotação medial e lateral
Teste do impacto de Neer ¹⁰¹	O membro superior do paciente foi elevado passivamente, pelo examinador, no plano da escápula (na posição entre a flexão e abdução), provocando o impacto da tuberosidade maior contra o acrômio. O teste foi considerado positivo quando provocou dor.
Teste do supraespinal de Jobe ¹⁰²	Com o paciente em pé e o ombro com 90° de abdução, 30° de adução horizontal e completamente rodado internamente, foi realizada elevação do membro superior contra a resistência. A resposta positiva foi dor na região ântero-lateral do ombro ou diminuição de força.
Teste do infraespinal ¹⁰³	Foi realizado com o membro superior ao lado do tórax e o cotovelo em 90° de flexão, solicitou-se para o paciente fazer ativamente a rotação lateral do braço contra a resistência oposta pelo examinador. A resposta positiva foi considerada como no teste anterior.
Teste "Bear Hug" ¹⁰⁴	A região ventral da mão do lado a ser testado foi colocada sobre o ombro oposto com os dedos estendidos e o cotovelo posicionado anteriormente ao corpo. O paciente tentou manter a posição inicial, rodando medialmente o braço contra a resistência oposta pelo examinador. O resultado do teste foi positivo quando o paciente não conseguiu segurar a mão contra o ombro.
Teste "lift-off" de Gerber ¹⁰⁵	O paciente colocou o dorso da mão na região lombar e tentou afastá-la desta região rodando medialmente o braço. A incapacidade de realizar este movimento indica o teste positivo para rotura do tendão subsesapular.

Anexo B - Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GENÉTICO DAS METALOPROTEINASES 1 E 3 E AS LESÕES DO MANGUITO ROTADOR

Pesquisador Responsável: Arnaldo Amado Ferreira Neto

Versão: 1

Pesquisador Executante: Jorge Henrique Assunção

CAAE: 20318214.5.0000.0068

Co-autores: Alexandre Leme Godoy dos Santos, Eduardo Angeli Malavolta, Mauro Emilio Conforto Gracitelli, Gilberto Luis Camanho

Instituição: HCFMUSP

Departamento: ORTOPEdia E TRAUMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11186

Número do Parecer: 611.645

Data da Relatoria: 09/04/2014

Apresentação do Projeto: Estudo prospectivo envolvendo 50 indivíduos com diagnóstico de lesões do manguito rotador. Será realizada a coleta de dados de prontuário, exames de imagem e história do paciente, além da coleta de fluido salivar para análise do DNA. Serão incluídos 50 indivíduos controle, que não apresentarem as lesões de manguito, porém fazem tratamento de outra patologia.

Objetivo da Pesquisa: Investigar a influência dos polimorfismos na região promotora dos genes das MMPs 1 e 3 em indivíduos com lesão de lesões do rotador.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O indivíduo não será submetido a risco adicional por ser apenas feita uma coleta de fluido salivar pós bochecho numa mesma consulta para atendimento do problema ortopédico apresentado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Estudo pertinente, interessante e apresenta metodologia adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foram apresentados os termos necessários.

Recomendações: Recomenda-se aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não.



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto 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.

São Paulo, 11 de Abril de 2014

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido

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

1

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
- DATA 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 (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteínas 1 e 3 e as lesões do manguito rotador.
- PESQUISADOR : Arnaldo Amado Ferreira Neto
- CARGO/FUNÇÃO: Chefe do Grupo de Ombro e Cotovelo. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 52956
- UNIDADE DO HCFMUSP: IOT
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

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

As lesões dos tendões do ombro têm explicações ligadas a traumatismos, a problemas de circulação sanguínea, reumatismos, mas muitas doenças que levam a degeneração dos tendões ainda permanecem sem uma explicação médica adequada. Por esse motivo, a possibilidade de causas genéticas para essas lesões precisam ser estudadas e o objetivo desse estudo é investigar a frequência dos genes em pacientes com diagnóstico de lesão do manguito rotador, 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 exame de alta tecnologia não rotineiro no nosso meio. Não haverá outros exames ou procedimentos invasivos.

Não haverá desconfortos ou riscos na coleta e execução desse exame.

Em relação aos benefícios para os participantes. Não há benefício direto para o participante, trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que fatores genéticos interfiram na degeneração dos tendões do ombro.

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 aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Os responsáveis pelo estudo são o Dr. Arnaldo Amado Ferreira Neto e o Dr. Jorge Henrique Assunção, 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 30696888.

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: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteínases 1 e 3 e as lesões do manguito rotador."

Eu discuti com o Dr. Arnaldo Amado Ferreira Neto sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

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

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo

Data 09/08/13

DR. ARNALDO AMADO FERREIRA NETO
Chefe do Grupo de Ombro e Cotovelo
IOT - HCFMUSP
Matrícula 34.943- CRM 52.956

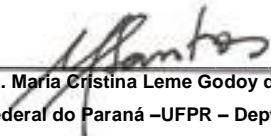
Anexo D – Carta de anuência da instituição externa participante do estudo

1

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 " **Associação entre o polimorfismo genético das metaloproteinases 1 e 3 e as lesões do manguito rotador**" proposto pelos pesquisador **Dr. Arnaldo Amado Ferreira Neto** e que os respectivos procedimentos são factíveis nos prazos exigidos desde que respeitando o cronograma proposto.

São Paulo, 03 de maio de 2013



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

Anexo E – Questionário para coleta das diferentes variáveis dos pacientes

1. Qual é a sua idade (em anos)?
2. Qual é seu sexo (masculino ou feminino)?
3. Qual é sua raça (branca, parda, preta ou amarela)?
4. Você realiza ou já realizou tratamento para tendinite ou roturas de tendões em outras articulações?
5. Você tem algum familiar “de sangue” que já realizou tratamento para lesões do manguito rotador do ombro?
6. Você fuma?
7. Você tem pressão alta ou toma medicamentos para tratamento da pressão alta?
8. Você tem hipotireoidismo ou toma medicamentos para a tireóide?
9. Você realiza esportes que utilizam os membros superiores?
10. No seu trabalho, você fica com os braços acima do nível dos ombros mais de 2 horas por dia?

Anexo F – Artigo publicado no periódico *Clinical Orthopaedics and Related Research* originário da tese apresentada

Clin Orthop Relat Res
DOI 10.1007/s11999-017-5271-3

Clinical Orthopaedics
and Related Research®
A Publication of The Association of Bone and Joint Surgeons®



CLINICAL RESEARCH

Matrix Metalloproteases 1 and 3 Promoter Gene Polymorphism Is Associated With Rotator Cuff Tear

Jorge H. Assunção MD, Alexandre L. Godoy-Santos PhD,
Maria Cristina L. G. dos Santos PhD, Eduardo A. Malavolta PhD,
Mauro E. C. Gracitelli PhD, Arnaldo A. Ferreira Neto PhD

Received: 17 October 2016 / Accepted: 26 January 2017
© The Association of Bone and Joint Surgeons® 2017

Abstract

Background Studies suggest that the collagen degeneration and disordered arrangement of collagen fibers in rotator cuff tears are associated with an increase in activity of matrix metalloproteases 1 and 3 (MMP-1 and MMP-3), and that MMP activity may be in part genetically mediated. The degree to which this might be clinically relevant in patients with rotator cuff tears has not been well characterized.

Each author certifies that neither he or she, nor any member of his or her immediate family, have funding or commercial associations (consultancies, stock ownership, equity interest, patent/licensing arrangements, etc) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article.

All ICMJE Conflict of Interest Forms for authors and *Clinical Orthopaedics and Related Research*® editors and board members are on file with the publication and can be viewed on request.

Clinical Orthopaedics and Related Research® neither advocates nor endorses the use of any treatment, drug, or device. Readers are encouraged to always seek additional information, including FDA-approval status, of any drug or device prior to clinical use.

Each author certifies that his or her institution approved the human protocol for this investigation, that all investigations were conducted in conformity with ethical principles of research, and that informed consent for participation in the study was obtained.

This work was performed at the Department of Orthopedics and Traumatology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

J. H. Assunção (✉), A. L. Godoy-Santos, E. A. Malavolta,
M. E. C. Gracitelli, A. A. Ferreira Neto
Department of Orthopedics and Traumatology, School of
Medicine, University of São Paulo, Rua Dr. Ovídio Pires de
Campos 333, 3rd Floor, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP 05403-
010, Brazil
e-mail: drjorgeassuncao@gmail.com

M. C. L. G. dos Santos
Department of Cell Biology, University Federal of Paraná,
Curitiba, Paraná, Brazil

Questions/purposes (1) Is genetic polymorphism of MMP-1 and MMP-3 associated with rotator cuff tears? (2) Are there haplotypes of MMP-1 and MMP-3 correlated with rotator cuff tears? (3) Compared with control subjects, do patients with rotator cuff tears have a higher proportion of relatives with the same disease?

Methods We evaluated 64 patients with full-thickness rotator cuff tears and 64 asymptomatic control subjects. Patients younger 65 years, with nontraumatic tears, were included. The tear or integrity of the rotator cuff tear was evaluated by MRI or ultrasonography in all individuals. The patients and control subjects were paired by age. MMP-1 and MMP-3 genotypes were determined using the PCR-restriction fragment length polymorphism assays.

Results Genetic polymorphisms in MMP-1 and MMP-3 are associated with rotator cuff tear, in which individuals with rotator cuff tears have associated genotypes 1G/2G (patients, 32 of 64 [50%], control subjects, 16 of 64 [25%]; odds ratio [OR], 4.8; 95% CI, 2.1–11.0; $p < 0.001$) and 2G/2G were at great risk (patients, 15 of 64 [23%], control subjects, seven of 64 [11%]; OR, 5.2; 95% CI, 1.8–14.9; $p < 0.001$), and patients with rotator cuff tears were associated with a higher proportion of 2G allele distribution (62 of 128 [48%] versus 30 of 128 [23%]; $p < 0.001$). Patients with the 5A/5A genotype are at greater risk of rotator cuff tear (patients, 15 of 64 [23%]; control subjects, four of 64 [6%]; OR, 5.5; 95% CI, 1.4–20.9; $p = 0.021$), and there was higher 5A allele distribution in patients with rotator cuff tears (patients, 68 of 128 [53%]; control subjects, 52 of 128 [41%]; $p = 0.045$). Individuals with the haplotype 2G/5A were more likely to have rotator cuff tears develop (patients, 42 of 64 [66%]; control subjects, 17 of 64 [27%]; OR, 5.3; 95% CI, 2.5–11.3; $p < 0.001$). Patients with rotator cuff tears reported, in higher number, the existence of relatives who previously had treatment for

rotator cuff tears (19 of 64 [30%] versus four of 64 [6%]; OR, 6.3; 95% CI, 2.0-19.9; $p = 0.001$).

Conclusions The genetic polymorphism of MMP-1 and MMP-3 is associated with rotator cuff tear. Individuals with haplotype 2G/5A were more susceptible to rotator cuff tears in the population studied.

Clinical Relevance Knowledge of the genetic markers related to rotator cuff tears can enable identification of susceptible individuals and increase understanding of the pathogenesis of tendon degeneration.

Introduction

Tendon degeneration is mediated by matrix metalloproteinases (MMPs), cytokines, and free radicals that act on the extracellular matrix, altering its composition and biomechanical properties [22]. MMPs are enzymes capable of degrading collagen fibers and other elements of the extracellular matrix [9]. MMP-1 is a protease that breaks down type I collagen fibers [28]. MMP-3 is involved in regulation and activation of the MMPs. In addition to this activity, MMP-3 is capable of degrading Types II, IV, V, IX, and X collagen, proteoglycans, fibronectin, and elastin [11]. The production and activation of the MMPs are induced by cytokines, growth factors, and cell-cell and cell-matrix interactions [9]. Some single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the MMP gene promoter region are correlated with an increase in activity and production of these enzymes [25, 33]. SNPs of MMP-1 and MMP-3 were previously correlated with tendinopathy of the posterior tibial tendon and the Achilles tendon [12, 31].

The etiology of a rotator cuff tear is a multifactorial process, and various extrinsic and intrinsic tendon factors have been proposed to explain it [20]. There is no consensus regarding the main factors, and there appears to be an interaction among them [7, 22]. Extrinsic factors include bony impingement and morphologic variations in the coracoacromial arch such as a curved or hooked acromion and os acromiale [22]. Intrinsic factors include tendon degeneration, tissue hypovascularization, and local inflammatory responses [22, 41]. In the pathogenesis of a rotator cuff tear, we found a decrease in synthesis and an increase in degradation of collagen fibers associated with an increase in activity of MMP-1 and MMP-3 [6, 13, 27, 40]. There is evidence that genetic factors may be involved in the etiology of rotator cuff tears [16, 36]. Recently, some SNPs were associated with tendinopathy or rotator cuff tear [17, 24, 37, 38]. However, we have not found any studies that exclusively evaluate the association of the genetic polymorphism of the MMPs and rotator cuff

tears, despite the relevance of these enzymes in their pathophysiology.

Therefore, we asked: (1) Is genetic polymorphism of MMP-1 and MMP-3 associated with rotator cuff tears? (2) Are there haplotypes of MMP-1 and MMP-3 correlated with rotator cuff tears? (3) Compared with control subjects, do patients with rotator cuff tears have a higher proportion of relatives with the same disease?

Materials and Methods

We performed a case-control study with a ratio of one to one. We evaluated patients younger than 65 years who underwent repair of full-thickness rotator cuff tears at our institution between June 2014 and December 2015. Patients with rheumatologic disease, diabetes, previous shoulder surgeries, or previous or current infectious processes in this shoulder were excluded. Patients with traumatic rotator cuff tears also were excluded as were those with partial tears. The control group consisted of patients who were treated at the same hospital for traumatic disorders without symptoms of shoulder pain and clinical signs of rotator cuff disease. The patients and control subjects were paired by age with a maximum difference of ± 2 years.

The patients and control subjects underwent rotator cuff imaging (MRI or ultrasonography). All control subjects had intact rotator cuff tendons. Patients with rotator cuff tears were evaluated by MRI. Among the controls subjects, 30 of 64 (47%) underwent ultrasonography to assess the integrity of the rotator cuff, and MRI was the imaging method used in 34 of 64 (53%). The tests were performed at our institution's radiology department by the same group of musculoskeletal radiologists (APB, COK, MBR). The study was approved by the local ethics committee. Informed consent was obtained from all patients and subsequently through interview the following data were collected from the patients: age, sex, ethnicity, smoking, presence of high blood pressure, hypothyroidism, tendinopathies in other joints, existence of relatives who previously had treatment for rotator cuff tears, sports with shoulder involvement, and work with repeated and sustained arm abduction.

We evaluated 128 patients, 64 with rotator cuff tears and 64 control subjects (Table 1). We had no loss of samples during the DNA extraction and genotyping. The patients with rotator cuff tears and the control subjects had a mean age of 54 ± 6 years and 53 ± 6 years, respectively ($p = 0.586$). Of the patients who underwent rotator cuff repair, 44 (69%) were females, and of the control subjects, 40 (61%) were females ($p = 0.577$).

Table 1. Baseline demographic and clinical characteristics

Characteristic	Patients	Control subjects	p Value
Age (years)	54 ± 6	53 ± 6	0.586
Sex			
Male	20 (31%)	24 (37%)	0.577
Female	44 (69%)	40 (63%)	
Ethnicity			
White	48 (75%)	45 (70%)	0.692
Nonwhite	16 (25%)	19 (30%)	
Other tendinopathies			
Yes	10 (16%)	2 (3%)	0.016
No	54 (84%)	62 (97%)	
Smoking			
Yes	9 (14%)	9 (14%)	> 0.999
No	55 (86%)	55 (86%)	
Hypertension			
Yes	13 (20%)	15 (23%)	0.831
No	51 (80%)	49 (77%)	
Hypothyroidism			
Yes	1 (2%)	2 (3%)	> 0.999
No	63 (98%)	62 (97%)	
Work with repeated and sustained arm abduction			
Yes	26 (41%)	23 (36%)	0.716
No	38 (59%)	41 (64%)	
Sports with shoulder involvement			
Yes	5 (8%)	8 (12%)	0.560
No	59 (92%)	56 (88%)	

Continuous data = means ± SD; categorical data = number (%).

The groups did not differ regarding race, smoking, or the presence of high blood pressure ($p = 0.692$, $p > 0.999$, and $p = 0.831$, respectively). Tendinopathies in other joints were more prevalent among patients with rotator cuff tears ($p = 0.016$).

DNA from epithelial buccal cells was extracted using the procedure described by Aidar and Line [2]. DNA concentration (ng/ μ L) was estimated by measurements of optical density 260/280 nm at a ratio greater than 1.9.

The SNPs were identified previously and included in the database of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) with minor allele frequencies greater than 0.2. The MMP genotypes were determined using the PCR-random fragment length polymorphism assays (Table 2).

PCR primers were done in a total volume of 15 μ L containing 100 ng of genomic DNA, 8 μ L Taq Green (Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden), and 200 nmol of each primer. An 8- μ L aliquot of PCR products then was digested with 1 unit of specific enzyme overnight.

The total amount of aliquot of the digest was electrophoresed on 5% agarose at 20 mA. The gel was stained by GelRedTM (Biotium Inc, Fremont, CA, USA).

The MMP-1 polymorphism at position -1607 (rs1799750) is characterized by the insertion a base guanine (G), which results in two alleles: 1G and 2G. The allele 2G is represented by the DNA of 118 base pairs and the allele 1G is represented by the DNA of 89 base pairs. The heterozygous genotype has a combination of both alleles.

The MMP-3 polymorphism (rs3025058) is characterized by the presence of five or six adenines in position -1612, resulting in alleles 5A and 6A. Allele 6A is represented by a band of DNA with 129 base pairs and the allele 5A by 97 base pairs. The heterozygous genotype has a combination of both alleles.

The sample size calculation used a level of significance of 5% and power of 80%. At the time this research protocol was elaborated, there were no studies, to our knowledge, regarding the association between the genetic polymorphism of MMPs and rotator cuff tears. Using a rate of 25% of the allele 2G of MMP-1 in the control group [12], an expected difference of 25% between groups, and 10% loss of samples in the extraction and genotyping of the DNA, 64 individuals were required for each group.

Statistical Analysis

The normality of the data was tested using the Shapiro-Wilk test. All continuous variables were normally distributed. The continuous variables were presented as means and SD and the categorical variables as absolute value and percentage.

The comparison between the patients and control subjects, in relation to the different variables, was performed using chi-square or Fisher's exact tests in the categorical variables and Student's t test in the continuous variables.

The difference in frequency of the alleles and genotypes of MMP-1 and -3 was evaluated in patients with rotator cuff tears and control subjects by the chi-square test. The probability of an association with rotator cuff tear was calculated as the odds ratio (OR) for the different genotypes with a 95% confidence interval.

The program ARLEQUIN Version 2.0 (Laurent Excoffier CMPG, Institute of Ecology and Evolution, University of Bern, Bern, Switzerland) [34] was used for the analysis of Hardy-Weinberg equilibrium in the population studied. The distribution of genotypes of the study subjects was in the Hardy-Weinberg equilibrium. For the data analysis, we used SPSS[®] Version 21.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) with a level of significance of 5%.

Table 2. PCR-RFLP conditions for MMP-1 (rs1799750) and MMP-3 (rs3025058) polymorphisms

SNP	Primers (5'-3')	Annealing	RFLP	bp PCR-RFLP
MMP-1 (rs1799750)	F: TCGTGAGAATGTCTCCATT	55° C	XmnI	118 (allele 2G)
	R: TCTTGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC	30 seconds	37° C	89 + 29 (allele 1G)
MMP-3 (rs3025058)	F: GGTTCCTCATTCTTTGATGGGGGAAAGA	53° C	Tth11II	129 (allele 6A)
	R: CTTCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT	1 minute	37° C	97 + 32 (allele 5A)

PCR-RFLP = polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; MMP = matrix metalloprotease; SNP = single nucleotide polymorphism; F = primer forward; R = primer reverse; bp = base pairs.

Table 3. Distribution of the MMP-1 and MMP-3 genotypes and 2G/5A haplotype

Genotype	Patients	Control subjects	Odds ratio	
			(95% CI)	p Value
MMP-1				
1G/1G	17 (27%)	41 (64%)	Reference	
1G/2G	32 (50%)	16 (25%)	4.8 (2.1–11.0)	
2G/2G	15 (23%)	7 (11%)	5.2 (1.8–14.9)	< 0.001
MMP-3				
6A/6A	11 (17%)	16 (25%)	Reference	
5A/6A	38 (59%)	44 (69%)	1.3 (0.5–3.0)	
5A/5A	15 (23%)	4 (6%)	5.5 (1.4–20.9)	0.021
2G/5A haplotype				
No	22 (34%)	47 (73%)	Reference	
Yes	42 (66%)	17 (27%)	5.3 (2.5–11.3)	< 0.001

MMP = matrix metalloprotease.

Results

Genetic polymorphisms in MMP-1 and MMP-3 are associated with rotator cuff tears, in which individuals with rotator cuff tears have associated genotypes 1G/2G (patients, 32 of 64 [50%]; control subjects, 16 of 64 [25%]; OR, 4.8; 95% CI, 2.1–11.0; $p < 0.001$) and 2G/2G were at great risk (patients, 15 of 64 [23%]; control subjects seven of 64 [11%]; OR, 5.2; 95% CI, 1.8–14.9; $p < 0.001$) (Table 3), and patients with rotator cuff tears did have a higher proportion of 2G allele distribution (62 of 128 [48%] versus 30 of 128 [23%]; $p < 0.001$) (Table 4). Patients with the 5A/5A genotype are at greater risk of rotator cuff tears (patients, 15 of 64 [23%]; control subjects, four of 64 [6%]; OR, 5.5; 95% CI, 1.4, 20.9; $p = 0.021$), and there was higher 5A allele distribution in patients with rotator cuff tears (patients, 68 of 128 [53%]; control subjects, 52 of 128 [41%]; $p = 0.045$).

Individuals with the haplotype 2G/5A were more likely to have rotator cuff tears develop: (patients, 42 of 64 [66%]; control subjects, 17 of 64 [27%]; OR, 5.3; 95% CI, 2.5–11.3; $p < 0.001$) (Table 3).

Patients with rotator cuff tears reported, in a higher number, the existence of relatives who previously had

Table 4. Distribution of the MMP-1 and MMP-3 allele in rotator cuff tear and control groups

Alleles	Patients	Control subjects	p Value
MMP-1			
1G	66 (52%)	98 (77%)	< 0.001
2G	62 (48%)	30 (23%)	
MMP-3			
5A	68 (53%)	52 (41%)	0.045
6A	60 (47%)	76 (59%)	

MMP = matrix metalloprotease.

treatment for rotator cuff tears (19 of 64 [30%] versus four of 64 [6%]; OR, 6.3; 95% CI, 2.0–19.9; $p = 0.001$).

Discussion

Rotator cuff tendinopathy is the main cause of shoulder pain [23] with rupture of these tendons occurring in 20% of the population [43]. The pathophysiology of rotator cuff tear is a multifactorial process and there is evidence that genetic factors may be involved in the etiology of rotator

cuff tears [17, 24, 37, 38]. It is likely that a certain number of genes may be involved in the development of a rotator cuff tear, each one making a small contribution. Complex interactions occur between the proteins, encoded by multiple genes, and the environment in the development of these lesions [35]. Similar to the findings of studies that evaluated patients with lower limb tendinopathies [12, 31], the genetic polymorphism of MMP-1 and MMP-3 is associated with rotator cuff tears.

Our study has some limitations. For a genetic study, the sample with 128 individuals evaluated could be considered small. Studies with larger samples, or in other populations, should be conducted to confirm the association of these polymorphisms with rotator cuff tears. There is a lack of standardization in the imaging examinations used to confirm the integrity of the rotator cuff in asymptomatic individuals; either MRI or ultrasonography was used in the evaluation. However, only Kluger et al. [17] performed rotator cuff imaging to confirm the integrity of the tendon in asymptomatic control subjects, and up to 60% of patients with rotator cuff tears may be asymptomatic [42]. We also can affirm that ultrasonography had similar sensitivity and specificity to MRI in various studies [8, 19, 32]. We did not assess risk factors for rotator cuff tears such as BMI [15] and dominant arm [31]. These factors that were not evaluated could act as confounding factors in our analysis. However, known risk factors for rotator cuff tears, such as age [39], sex [32], smoking [4], white ethnicity [17], presence of systemic arterial hypertension [14], hypothyroidism [26], professional activity with repetitive efforts with the shoulders [5], and sports with use of the upper limbs [29], did not differ between the two groups we studied, which show that the criteria for obtaining the sample were satisfactory. We conducted an interview to collect data regarding existence of relatives who previously had treatment for rotator cuff tears and presence of tendinopathies in other joints. Patients with rotator cuff tears should probably have better information regarding their personal and familial orthopaedic diseases, leading to a recall bias. As the information was reported by the patient, the diagnoses also may be inaccurate. This may have increased the association between these risk factors and rotator cuff tears.

Our study showed that the genetic polymorphisms of the MMP-1 (rs1799750) and MMP-3 (rs3025058) are associated with rotator cuff tears. The genotypes 1G/2G or 2G/2G in position -1607 of the MMP-1 gene were risk factors for the development of rotator cuff tears in relation to the individuals with genotype 1G/1G. The individuals with genotype 5A/5A in position -1612 of the MMP-3 gene were more susceptible to rotator cuff tears. The allele 2G of the MMP-1 polymorphism in position -1607 (rs1799750) increases the transcriptional activity of the gene [33]. This

finding provides a molecular basis for the degradation of collagen fibers and increase in MMP-1 activity found in previous histopathology studies of patients with rotator cuff tears [6, 13, 18, 27, 40]. Allele 5A of the MMP-3 (rs3025058) increases the transcription of this gene [44], and some previous studies reported higher production of MMP-3 in patients with rotator cuff tears in relation to asymptomatic patients [1, 6, 27]. However, the transcriptional activity of the MMP genes is not only associated with polymorphisms of the single nucleotide in the promoter region. The baseline production of MMPs is low, and synthesis is induced by cytokines such as interleukin-1 and tumor necrosis factor, growth factors, and cell-cell and cell-matrix interactions [9]. Unlike our study, Kluger et al. [17], found no differences in the distribution of the MMP-1 and MMP-3 alleles and genotypes. In the case of MMP-1, the polymorphism studied was rs17884110, different from that evaluated by us. In relation to MMP-3, however, the polymorphism evaluated was the same (rs3025058). The lack of agreement between the results may be explained by the smaller number of individuals evaluated, nonpairing between patients and control subjects for age, and known risk factors such as high blood pressure, and racial and genetic characteristics of the population.

Some groups of genetic polymorphisms in adjacent loci on the same chromosome can be inherited in combination; they are called haplotypes. Genetic polymorphisms may act synergistically, increasing the risk for development of tendinous alterations [30]. MMP-1 1G/2G and MMP-3 5A/6A SNPs are located on chromosome 11q22.3 and there is a high linkage disequilibrium between these two genes [21]. Individuals with the haplotype 2G/5A were more likely to have rotator cuff tears develop.

Initial studies showed that relatives of individuals with rotator cuff tears have a higher risk of having the same disease [16, 36]. Harvie et al. [16] reported that siblings of patients with full-thickness rotator cuff tear had a relative risk of 2.42 (95% CI, 1.77-3.31) of having such tears in relation to the control group. Tashjian et al. [36] evaluated the genetic predisposition for rotator cuff tears using the Utah Population Database. They observed that second- or third-generation relatives of patients with rotator cuff tears who were younger than 40 years were more likely to experience the same lesion. We found a much higher proportion of patients with family histories of rotator cuff treatment than control subjects with that same history; these findings suggest a familial and genetic predisposition for rotator cuff tears. However, recall bias may have influenced this finding and future cohort studies might more extensively evaluate this association.

Knowledge of the genetic markers related to rotator cuff tears can enable identification of susceptible individuals and increase understanding of the pathogenesis of tendon

degeneration. Experimental studies have shown that the use of modulators or inhibitors of MMP's activity may influence tissue healing of the rotator cuff repair [3, 10]. In the future, investigation of other genetic markers could define and standardize all genes at risk for this disease, and thus create adequate conditions for the development of individualized preventive and therapeutic strategies, such as the use of MMP inhibitors in patients susceptible to rotator cuff tears or who underwent repair of these lesions to increase the probability of tendon cicatrization and resistance.

The genetic polymorphism of MMP-1 and MMP-3 is associated with rotator cuff tears. Individuals with haplotype 2G/5A were more susceptible to rotator cuff tears in the population studied, and patients with rotator cuff tears have a higher proportion of relatives with the same disease compared with controls subjects.

Acknowledgments Alberto Peters Bambirra MD, Ceci Obara Kurimori MD, and Marcelo Bordalo-Rodrigues PhD (all from the Department of Radiology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil), performed the MRI or ultrasonography examinations.

References

- Abrams GD, Luria A, Carr RA, Rhodes C, Robinson WH, Sokolove J. Association of synovial inflammation and inflammatory mediators with glenohumeral rotator cuff pathology. *J Shoulder Elbow Surg.* 2016;25:989–997.
- Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007;18:148–152.
- Bedi A, Kovacevic D, Hettrich C, Gulotta LV, Ehteshami JR, Warren RF, Rodeo SA. The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model. *J Shoulder Elbow Surg.* 2010;19:384–391.
- Bishop JY, Santiago-Torres JE, Rimmke N, Flanigan DC. Smoking predisposes to rotator cuff pathology and shoulder dysfunction: a systematic review. *Arthroscopy.* 2015;31:1598–1605.
- Bodin J, Ha C, Petit Le Manac'h A, Sérazin C, Descatha A, Leclerc A, Goldberg M, Roquelaure Y. Risk factors for incidence of rotator cuff syndrome in a large working population. *Scand J Work Environ Health.* 2012;38:436–446.
- Castagna A, Cesari E, Gigante A, Conti M, Garofalo R. Metalloproteinases and their inhibitors are altered in both torn and intact rotator cuff tendons. *Musculoskelet Surg.* 2013;97(suppl 1):39–47.
- DE Giorgi S, Saracino M, Castagna A. Degenerative disease in rotator cuff tears: what are the biochemical and histological changes? *Joints.* 2014;2:26–28.
- de Jesus JO, Parker L, Frangos AJ, Nazarian LN. Accuracy of MRI, MR arthrography, and ultrasound in the diagnosis of rotator cuff tears: a meta-analysis. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;192:1701–1707.
- Del Buono A, Oliva F, Longo UG, Rodeo SA, Orchard J, Denaro V, Maffulli N. Metalloproteinases and rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012;21:200–208.
- Fox AJ, Schär MO, Wanivenhaus F, Chen T, Attia E, Binder NB, Otero M, Gilbert SL, Nguyen JT, Chaudhury S, Warren RF, Rodeo SA. Fluoroquinolones impair tendon healing in a rat rotator cuff repair model: a preliminary study. *Am J Sports Med.* 2014;42:2851–2859.
- Garofalo R, Cesari E, Vinci E, Castagna A. Role of metalloproteinases in rotator cuff tear. *Sports Med Arthrosc.* 2011;19:207–212.
- 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;31:1103–1107.
- Gotoh M, Hamada K, Yamakawa H, Tomonaga A, Inoue A, Fukuda H. Significance of granulation tissue in torn supraspinatus insertions: an immunohistochemical study with antibodies against interleukin-1 beta, cathepsin D, and matrix metalloproteinase-1. *J Orthop Res.* 1997;15:33–39.
- Gumina S, Arceri V, Carbone S, Albino P, Passaretti D, Campagna V, Fagnani C, Postacchini F. The association between arterial hypertension and rotator cuff tear: the influence on rotator cuff tear sizes. *J Shoulder Elbow Surg.* 2013;22:229–232.
- Gumina S, Candela V, Passaretti D, Latino G, Venditto T, Mariani L, Santilli V. The association between body fat and rotator cuff tear: the influence on rotator cuff tear sizes. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014;23:1669–1674.
- Harvie P, Ostlere SJ, Teh J, McNally EG, Clipsham K, Burston BJ, Pollard TC, Carr AJ. Genetic influences in the aetiology of tears of the rotator cuff: sibling risk of a full-thickness tear. *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86:696–700.
- Kluger R, Burgstaller J, Vogl C, Brem G, Skultety M, Mueller S. A candidate gene approach identifies six SNPs in tenascin-C (TNC) associated with degenerative rotator cuff tears. *J Orthop Res.* 2016 Jun 1. [Epub ahead of print] doi: 10.1002/jor.23321
- Lakemeier S, Braun J, Efe T, Foelsch C, Archontidou-Aprin E, Fuchs-Winkelmann S, Paletta JR, Schofer MD. Expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 in differing extents of tendon retraction in the torn rotator cuff. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19:1760–1765.
- Lenza M, Buchbinder R, Takwoingi Y, Johnston RV, Hanchard NC, Faloppa F. Magnetic resonance imaging, magnetic resonance arthrography and ultrasonography for assessing rotator cuff tears in people with shoulder pain for whom surgery is being considered. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;9:CD009020. doi: 10.1002/14651858.
- Longo UG, Berton A, Khan WS, Maffulli N, Denaro V. Histopathology of rotator cuff tears. *Sports Med Arthrosc.* 2011;19:227–236.
- Lu Z, Cao Y, Wang Y, Zhang Q, Zhang X, Wang S, Li Y, Xie H, Jiao B, Zhang J. Polymorphisms in the matrix metalloproteinase-1, 3, and 9 promoters and susceptibility to adult astrocytoma in northern China. *J Neurooncol.* 2007;85:65–73.
- Maffulli N, Longo UG, Berton A, Loppini M, Denaro V. Biological factors in the pathogenesis of rotator cuff tears. *Sports Med Arthrosc.* 2011;19:194–201.
- Mitchell C, Adebajo A, Hay E, Carr A. Shoulder pain: diagnosis and management in primary care. *BMJ.* 2005;331:1124–1128.
- Motta Gda R, Amaral MV, Rezende E, Pitta R, Vieira TC, Duarte ME, Vieira AR, Casado PL. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014;23:227–235.
- Munhoz FB, Godoy-Santos AL, Santos MC. MMP-3 polymorphism: genetic marker in pathological processes. *Mol Med Rep.* 2010;3:735–740.
- Oliva F, Osti L, Padulo J, Maffulli N. Epidemiology of the rotator cuff tears: a new incidence related to thyroid disease. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4:309–314.

27. Osawa T, Shinozaki T, Takagishi K. Multivariate analysis of biochemical markers in synovial fluid from the shoulder joint for diagnosis of rotator cuff tears. *Rheumatol Int*. 2005;25:436–441.
28. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:283–287.
29. Plate JF, Haubruck P, Walters J, Mannava S, Smith BP, Smith TL, Tuohy CJ. Rotator cuff injuries in professional and recreational athletes. *J Surg Orthop Adv*. 2013;22:134–142.
30. Rahim M, Collins M, September A. Genes and musculoskeletal soft-tissue injuries. *Med Sport Sci*. 2016;61:68–91.
31. Raleigh SM, van der Merwe L, Ribbans WJ, Smith RK, Schwellnus MP, Collins M. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. *Br J Sports Med*. 2009;43:514–520.
32. Roy JS, Braën C, Leblond J, Desmeules F, Dionne CE, MacDermid JC, Bureau NJ, Frémont P. Diagnostic accuracy of ultrasonography, MRI and MR arthrography in the characterisation of rotator cuff disorders: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2015;49:1316–1328.
33. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res*. 1998;58:5321–5325.
34. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin ver 2.000: a software for population genetics data analysis. Available at: <http://www.cmpg.unibe.ch/software/arlequin/archive/website/software/2.000/manual/Arlequin.pdf>. Accessed January 26, 2017.
35. September AV, Schwellnus MP, Collins M. Tendon and ligament injuries: the genetic component. *Br J Sports Med*. 2007;41:241–246, discussion 246.
36. Tashjian RZ, Farnham JM, Albright FS, Teerlink CC, Cannon-Albright LA. Evidence for an inherited predisposition contributing to the risk for rotator cuff disease. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91:1136–1142.
37. Tashjian RZ, Granger EK, Farnham JM, Cannon-Albright LA, Teerlink CC. Genome-wide association study for rotator cuff tears identifies two significant single-nucleotide polymorphisms. *J Shoulder Elbow Surg*. 2016;25:174–179.
38. Teerlink CC, Cannon-Albright LA, Tashjian RZ. Significant association of full-thickness rotator cuff tears and estrogen-related receptor- β (ESRRB). *J Shoulder Elbow Surg*. 2015;24:e31–35.
39. Teunis T, Lubberts B, Reilly BT, Ring D. A systematic review and pooled analysis of the prevalence of rotator cuff disease with increasing age. *J Shoulder Elbow Surg*. 2014;23:1913–1921.
40. Voloshin I, Gelinas J, Maloney MD, O'Keefe RJ, Bigliani LU, Blaine TA. Proinflammatory cytokines and metalloproteinases are expressed in the subacromial bursa in patients with rotator cuff disease. *Arthroscopy*. 2005;21:1076.e1–1076.e9.
41. Yadav H, Nho S, Romeo A, MacGillivray JD. Rotator cuff tears: pathology and repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009;17:409–421.
42. Yamamoto A, Takagishi K, Kobayashi T, Shitara H, Osawa T. Factors involved in the presence of symptoms associated with rotator cuff tears: a comparison of asymptomatic and symptomatic rotator cuff tears in the general population. *J Shoulder Elbow Surg*. 2011;20:1133–1137.
43. Yamamoto A, Takagishi K, Osawa T, Yanagawa T, Nakajima D, Shitara H, Kobayashi T. Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. *J Shoulder Elbow Surg*. 2010;19:116–120.
44. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem*. 1996;271:13055–13060.

8 REFERÊNCIAS

1. Mitchell C, Adebajo A, Hay E, Carr A. Shoulder pain: diagnosis and management in primary care. *BMJ*. 2005;331(7525):1124–8.
2. Yamamoto A, Takagishi K, Osawa T, Yanagawa T, Nakajima D, Shitara H, et al. Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. *J Shoulder Elbow Surg*. 2010;19(1):116–20.
3. Longo UG, Berton A, Khan WS, Maffulli N, Denaro V. Histopathology of rotator cuff tears. *Sports Med Arthrosc*. 2011;19(3):227–36.
4. Maffulli N, Longo UG, Berton A, Loppini M, Denaro V. Biological factors in the pathogenesis of rotator cuff tears. *Sports Med Arthrosc*. 2011;19(3):194–201.
5. Yadav H, Nho S, Romeo A, MacGillivray JD. Rotator cuff tears: pathology and repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009;17(4):409–21.
6. De Giorgi S, Saracino M, Castagna A. Degenerative disease in rotator cuff tears: what are the biochemical and histological changes? *Joints*. 2014;2(1):26–8.
7. Del Buono A, Oliva F, Longo UG, Rodeo SA, Orchard J, Denaro V, et al. Metalloproteases and rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg*. 2012;21(2):200–8.

8. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(2):283-8.
9. Garofalo R, Cesari E, Vinci E, Castagna A. Role of metalloproteinases in rotator cuff tear. *Sports Med Arthrosc.* 2011;19(3):207–12.
10. Osawa T, Shinozaki T, Takagishi K. Multivariate analysis of biochemical markers in synovial fluid from the shoulder joint for diagnosis of rotator cuff tears. *Rheumatol Int.* 2005;25(6):436–41.
11. Gotoh M, Hamada K, Yamakawa H, Tomonaga A, Inoue A, Fukuda H. Significance of granulation tissue in torn supraspinatus insertions: an immunohistochemical study with antibodies against interleukin-1 beta, cathepsin D, and matrix metalloprotease-1. *J Orthop Res.* 1997;15(1):33–9.
12. Voloshin I, Gelinas J, Maloney MD, O’Keefe RJ, Bigliani LU, Blaine TA. Proinflammatory cytokines and metalloproteases are expressed in the subacromial bursa in patients with rotator cuff disease. *Arthroscopy.* 2005;21(9):1076.e1–1076.e9.
13. Castagna A, Cesari E, Gigante A, Conti M, Garofalo R. Metalloproteases and their inhibitors are altered in both torn and intact rotator cuff tendons. *Musculoskelet Surg.* 2013;97(Suppl 1):39–47.
14. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP—Database for Single Nucleotide Polymorphisms and Other Classes of Minor Genetic Variation. *Genome Res.* 1999;9(8):677–9.

15. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177–86.
16. Munhoz FB, Godoy-Santos AL, Santos MC. MMP-3 polymorphism: Genetic marker in pathological processes (Review). *Mol Med Rep*. 2010;3(5):735–40.
17. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, et al. 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.
18. Harvie P, Ostlere SJ, Teh J, McNally EG, Clipsham K, Burston BJ, et al. Genetic influences in the aetiology of tears of the rotator cuff. Sibling risk of a full-thickness tear. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(5):696–700.
19. Tashjian RZ, Farnham JM, Albright FS, Teerlink CC, Cannon-Albright LA. Evidence for an inherited predisposition contributing to the risk for rotator cuff disease. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91(5):1136–42.
20. Tashjian RZ, Granger EK, Farnham JM, Cannon-Albright LA, Teerlink CC. Genome-wide association study for rotator cuff tears identifies two significant single-nucleotide polymorphisms. *J Shoulder Elbow Surg*. 2016;25(2):174–9.
21. Teerlink CC, Cannon-Albright LA, Tashjian RZ. Significant association of full-thickness rotator cuff tears and estrogen-related receptor- β (ESRRB). *J Shoulder Elbow Surg*. 2015;24(2):e31–5.

22. Motta G da R, Amaral MV, Rezende E, Pitta R, Vieira TC, Duarte ME, et al. Evidence of genetic variations associated with rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014;23(2):227–35.
23. Kluger R, Burgstaller J, Vogl C, Brem G, Skultety M, Mueller S. A candidate gene approach identifies six SNPs in tenascin-C (TNC) associated with degenerative rotator cuff tears. *J Orthop Res.* 2017;35(4):894-901.
24. Godoy-Santos A, Cunha MV, Ortiz RT, Fernandes TD, Mattar R Jr, dos Santos MCLG. MMP-1 promoter polymorphism is associated with primary tendinopathy of the posterior tibial tendon. *J Orthop Res.* 2013;31(7):1103–7.
25. Raleigh SM, Van der Merwe L, Ribbans WJ, Smith RK, Schwellnus MP, Collins M. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. *Br J Sports Med.* 2009;43(7):514–20.
26. Petersson CJ, Gentz CF. Ruptures of the supraspinatus tendon. The significance of distally pointing acromioclavicular osteophytes. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;(174):143–8.
27. Lehman C, Cuomo F, Kummer FJ, Zuckerman JD. The incidence of full thickness rotator cuff tears in a large cadaveric population. *Bull Hosp Jt Dis.* 1995;54(1):30–1.

28. Yamaguchi K, Ditsios K, Middleton WD, Hildebolt CF, Galatz LM, Teefey SA. The demographic and morphological features of rotator cuff disease. A comparison of asymptomatic and symptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(8):1699–704.
29. Neviaser RJ, Neviaser TJ. Observations on impingement. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;(254):60–3.
30. Neer CS. Anterior Acromioplasty for the Chronic Impingement Syndrome in the Shoulder. *J Bone Joint Surg Am.* 1972;54(1):41–50.
31. Bigliani, LU. The morphology of the acromion and its relationship to rotator cuff tears. *Orthop Trans.* 1986;10:228.
32. Fukuda H, Hamada K, Yamanaka K. Pathology and pathogenesis of bursal-side rotator cuff tears viewed from en bloc histologic sections. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;(254):75–80.
33. Bigliani LU, Ticker JB, Flatow EL, Soslowsky LJ, Mow VC. The relationship of acromial architecture to rotator cuff disease. *Clin Sports Med.* 1991;10(4):823–38.
34. Banas MP, Miller RJ, Totterman S. Relationship between the lateral acromion angle and rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* 1995;4(6):454–61.

35. Miyazaki AN, Fregoneze M, Santos PD, Silva LA da, Martel EM, Debom LG, et al. Estudo radiográfico do índice acromial e sua relação com as lesões do manguito rotador. *Rev Bras Ortop.* 2010;45(2):151–4.
36. Laird Wilson C, Lyman Duff G. Pathologic study of degeneration and rupture of supraspinatus tendon. *Arch Surg.* 1943;47(2):121–35.
37. Rothman RH, Parke WW. The Vascular Anatomy of the Rotator Cuff. *Clin Orthop Relat Res.* 1965;41:176-86.
38. Rathbun JB, Macnab I. The microvascular pattern of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Br.* 1970;52(3):540–53.
39. Ozaki J, Fujimoto S, Nakagawa Y, Masuhara K, Tamai S. Tears of the rotator cuff of the shoulder associated with pathological changes in the acromion. A study in cadavera. *J Bone Joint Surg Am.* 1988;70(8):1224–30.
40. Lohr JF, Uthoff HK. The microvascular pattern of the supraspinatus tendon. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;(254):35–8.
41. Sano H, Ishii H, Trudel G, Uthoff HK. Histologic evidence of degeneration at the insertion of 3 rotator cuff tendons: a comparative study with human cadaveric shoulders. *J Shoulder Elbow Surg.* 1999;8(6):574–9.
42. Hashimoto T, Nobuhara K, Hamada T. Pathologic evidence of degeneration as a primary cause of rotator cuff tear. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;(415):111–20.

43. Ikemoto RY, Murachovsky J, Nascimento LG, Bueno RS, Ueno FH, Akita JJ. Avaliação da microcirculação das bordas do tendão do supra-espinal nas lesões do manguito rotador. *Rev Bras Ortop.* 2007;42(11-12):382–6.
44. Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis.* 1994;53(6):359–66.
45. Kumagai J, Sarkar K, Uthoff HK. The collagen types in the attachment zone of rotator cuff tendons in the elderly: an immunohistochemical study. *J Rheumatol.* 1994;21(11):2096–100.
46. Kirkendall DT, Garrett WE. Function and biomechanics of tendons. *Scand J Med Sci Sports.* 1997;7(2):62–6.
47. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962;48:1014–22.
48. Bauer EA, Eisen AZ, Jeffrey JJ. Immunologic relationship of purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochim Biophys Acta.* 1970;206(1):152–60.
49. 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.

50. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491–4.
51. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477(1-2):267–83.
52. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol.* 2007;48(4):323–34.
53. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(2):197–250.
54. Dalton S, Cawston TE, Riley GP, Bayley IJ, Hazleman BL. Human shoulder tendon biopsy samples in organ culture produce procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases. *Ann Rheum Dis.* 1995;54(7):571–7.
55. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(3):207–14.
56. Lakemeier S, Braun J, Efe T, Foelsch C, Archontidou-Aprin E, Fuchs-Winkelmann S, et al. Expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 in differing extents of tendon retraction in the torn rotator cuff. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(10):1760–5.

57. Gotoh M, Mitsui Y, Shibata H, Yamada T, Shirachi I, Nakama K, et al. Increased matrix metalloproteinase-3 gene expression in ruptured rotator cuff tendons is associated with postoperative tendon retear. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013;21(8):1807–12.
58. Robertson CM, Chen CT, Shindle MK, Cordasco FA, Rodeo SA, Warren RF. Failed healing of rotator cuff repair correlates with altered collagenase and gelatinase in supraspinatus and subscapularis tendons. *Am J Sports Med.* 2012;40(9):1993–2001.
59. Abrams GD, Luria A, Carr RA, Rhodes C, Robinson WH, Sokolove J. Association of synovial inflammation and inflammatory mediators with glenohumeral rotator cuff pathology. *J Shoulder Elbow Surg.* 2016;25(6):989–97.
60. Chaudhury S, Xia Z, Thakkar D, Hakimi O, Carr AJ. Gene expression profiles of changes underlying different-sized human rotator cuff tendon tears. *J Shoulder Elbow Surg.* 2016;25(10):1561–70.
61. Leal MF, dos Santos LC, de Oliveira AM, Belangero PS, Figueiredo EA, Cohen C, et al. Epigenetic regulation of metalloproteinases and their inhibitors in rotator cuff tears. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184141.
62. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000;19(7):623–9.
63. Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary

- past. *Nature*. 2001;409(6822):821–2.
64. Song YQ, Ho DW, Karppinen J, Kao PY, Fan BJ, Luk KD, et al. Association between promoter -1607 polymorphism of MMP1 and lumbar disc disease in Southern Chinese. *BMC Med Genet*. 2008;9:38.
 65. Godoy-Santos AL, D'Elia CO, Teixeira WJ, Cabrita HB, Camanho GL. Aseptic loosening of total hip arthroplasty: preliminary genetic investigation. *J Arthroplasty*. 2009;24(2):297–302.
 66. Baroneza JE, Godoy-Santos A, Ferreira Massa B, Boçon de Araujo Munhoz F, Diniz Fernandes T, Godoy dos Santos MCL. MMP-1 promoter genotype and haplotype association with posterior tibial tendinopathy. *Gene*. 2014;547(2):334–7.
 67. Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J*. 1995;73(3):209–15.
 68. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem*. 1996;271(22):13055–60.
 69. Lu Z, Cao Y, Wang Y, Zhang Q, Zhang X, Wang S, et al. Polymorphisms in the matrix metalloproteinase-1, 3, and 9 promoters and susceptibility to adult astrocytoma in northern China. *J Neurooncol*. 2007;85(1):65–73.

70. Rahim M, Collins M, September A. Genes and Musculoskeletal Soft-Tissue Injuries. *Med Sport Sci.* 2016;61:68–91.
71. Malila S, Yuktanandana P, Saowaprut S, Jiamjarasrangsi W, Honsawek S. Association between matrix metalloproteinase-3 polymorphism and anterior cruciate ligament ruptures. *Genet Mol Res.* 2011;10(4):4158–65.
72. Takahashi M, Haro H, Wakabayashi Y, Kawa-uchi T, Komori H, Shinomiya K. The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83(4):491–5.
73. Zawilla NH, Darweesh H, Mansour N, Helal S, Taha FM, Awadallah M, et al. Matrix metalloproteinase-3, vitamin D receptor gene polymorphisms, and occupational risk factors in lumbar disc degeneration. *J Occup Rehabil.* 2014;24(2):370–81.
74. Gwilym SE, Watkins B, Cooper CD, Harvie P, Auplish S, Pollard TCB, et al. Genetic influences in the progression of tears of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91(7):915–7.
75. Tashjian RZ, Saltzman EG, Granger EK, Hung M. Incidence of familial tendon dysfunction in patients with full-thickness rotator cuff tears. *Open Access J Sports Med.* 2014;27(5):137-41.
76. September AV, Schwellnus MP, Collins M. Tendon and ligament injuries: the genetic component. *Br J Sports Med.* 2007;41(4):241–6.

77. Tashjian RZ, Granger EK, Zhang Y, Teerlink CC, Cannon-Albright LA. Identification of a genetic variant associated with rotator cuff repair healing. *J Shoulder Elbow Surg.* 2016;25(6):865–72.
78. Kluger R, Huber KR, Seely PG, Berger CE, Frommlet F. Novel Tenascin-C haplotype modifies the risk for a failure to heal after rotator cuff repair. *Am J Sports Med.* 2017;45(13):2955-64.
79. Bodin J, Ha C, Petit Le Manac'h A, Sérazin C, Descatha A, Leclerc A, et al. Risk factors for incidence of rotator cuff syndrome in a large working population. *Scand J Work Environ Health.* 2012;38(5):436–46.
80. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007;18(2):148–52.
81. Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver [Internet]. 2000; Available from: http://dna.ac/filogeografia/labs/Lab_SIMCOAL_Topicos_Crawford_2009.pdf.
82. Jorgenson E, Tang H, Gadde M, Province M, Leppert M, Kardina S, et al. Ethnicity and human genetic linkage maps. *Am J Hum Genet.* 2005;76(2):276–90.
83. Lanfear DE, Marsh S, Cresci S, Shannon WD, Spertus JA, McLeod HL. Genotypes associated with myocardial infarction risk are more common in African Americans than in European Americans. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(1):165–7.

84. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908;28(706):49–50.
85. Teunis T, Lubberts B, Reilly BT, Ring D. A systematic review and pooled analysis of the prevalence of rotator cuff disease with increasing age. *J Shoulder Elbow Surg*. 2014;23(12):1913–21.
86. Baumgarten KM, Gerlach D, Galatz LM, Teefey SA, Middleton WD, Ditsios K, et al. Cigarette smoking increases the risk for rotator cuff tears. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(6):1534–41.
87. Bishop JY, Santiago-Torres JE, Rimmke N, Flanigan DC. Smoking Predisposes to Rotator Cuff Pathology and Shoulder Dysfunction: A Systematic Review. *Arthroscopy*. 2015;31(8):1598–605.
88. Gumina S, Arceri V, Carbone S, Albino P, Passaretti D, Campagna V, et al. The association between arterial hypertension and rotator cuff tear: the influence on rotator cuff tear sizes. *J Shoulder Elbow Surg*. 2013;22(2):229–32.
89. Oliva F, Osti L, Padulo J, Maffulli N. Epidemiology of the rotator cuff tears: a new incidence related to thyroid disease. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(3):309–14.
90. Plate JF, Haubruck P, Walters J, Mannava S, Smith BP, Smith TL, et al. Rotator cuff injuries in professional and recreational athletes. *J Surg Orthop Adv*. 2013;22(2):134–42.
91. Titchener AG, White JJ, Hinchliffe SR, Tambe AA, Hubbard RB, Clark DI.

- Comorbidities in rotator cuff disease: a case-control study. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014;23(9):1282–8.
92. Tashjian RZ, Farnham JM, Granger EK, Teerlink CC, Cannon-Albright LA. Evidence for an environmental and inherited predisposition contributing to the risk for global tendinopathies or compression neuropathies in patients with rotator cuff tears. *Orthop J Sports Med.* 2016;4(4):2325967116642173.
93. Yamamoto A, Takagishi K, Kobayashi T, Shitara H, Osawa T. Factors involved in the presence of symptoms associated with rotator cuff tears: a comparison of asymptomatic and symptomatic rotator cuff tears in the general population. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011;20(7):1133-7.
94. Tempelhof S, Rupp S, Seil R. Age-related prevalence of rotator cuff tears in asymptomatic shoulders. *J Shoulder Elbow Surg.* 1999;8(4):296–9.
95. Roy JS, Braën C, Leblond J, Desmeules F, Dionne CE, MacDermid JC, et al. Diagnostic accuracy of ultrasonography, MRI and MR arthrography in the characterisation of rotator cuff disorders: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2015;49(20):1316–28.
96. Lenza M, Buchbinder R, Takwoingi Y, Johnston RV, Hanchard NC, Faloppa F. Magnetic resonance imaging, magnetic resonance arthrography and ultrasonography for assessing rotator cuff tears in people with shoulder pain for whom surgery is being considered. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(9):CD009020.

97. de Jesus JO, Parker L, Frangos AJ, Nazarian LN. Accuracy of MRI, MR arthrography, and ultrasound in the diagnosis of rotator cuff tears: a meta-analysis. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;192(6):1701–7.
98. Gumina S, Candela V, Passaretti D, Latino G, Venditto T, Mariani L, et al. The association between body fat and rotator cuff tear: the influence on rotator cuff tear sizes. *J Shoulder Elbow Surg.* 2014;23(11):1669-74.
99. Fox AJ, Schär MO, Wanivenhaus F, Chen T, Attia E, Binder NB, et al. Fluoroquinolones impair tendon healing in a rat rotator cuff repair model: a preliminary study. *Am J Sports Med.* 2014;42(12):2851–9.
100. Bedi A, Kovacevic D, Hettrich C, Gulotta LV, Ehteshami JR, Warren RF, et al. The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model. *J Shoulder Elbow Surg.* 2010;19(3):384–91.
101. Neer CS II. Impingement lesions. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;173:70-7.
102. Jobe FW, Jobe CM. Painful athletic injuries of the shoulder. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;173: 117-24.
103. Ferreira Filho AA, Lech O, Ferreira Neto AA, Zoppi Filho A. Ombro. In: Barros Filho TE, Lech O, editores. *Exame físico em ortopedia.* São Paulo: Sarvier, 2001. p. 109-37.
104. Barth JR, Burkhart SS, de Beer JF. The Bear-Hug test: a new and sensitive test for diagnosing a subscapularis tear. *Arthroscopy.* 2006;22(10): 1076-84.

105. Gerber C, Krushell RJ. Isolated rupture of the tendon of the subscapularis muscle. Clinical features in 16 cases. *J Bone Joint Surg Br.* 1991;73(3):389-94.