VANESSA JULIANA GOMES CARVALHO

**Expressão dos genes codificadores de canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8
e Nav 1.9 em portadores da Síndrome de Ardência Bucal**

São Paulo
2015

VANESSA JULIANA GOMES CARVALHO

**Expressão dos genes codificadores de canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8
e Nav 1.9 em portadores da Síndrome de Ardência Bucal**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientadora: Profa.Dra.Carina Domaneschi

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Carvalho, Vanessa Juliana Gomes.

Expressão dos genes codificadores de canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 em portadores da Síndrome de Ardência Bucal / Vanessa Juliana Gomes Carvalho ; orientadora Carina Domaneschi. -- São Paulo, 2015.

95 p. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Canais de sódio. 2. Síndrome da Ardência Bucal. I. Domaneschi, Carina. II. Título.

Carvalho VJG. Expressão dos genes codificadores de canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 em portadores da Síndrome de Ardência Bucal. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / / 2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos **meus pais Eunice e Welington** os responsáveis por tudo o que conquistei até hoje, sempre me acompanhando em cada passo com amor e dedicação, assim como em palavras e gestos de incentivos, por vezes me pegando no colo para que eu pudesse persistir em meus sonhos.

À **Deus** o grande roteirista do meu destino, por me dar força e graça todos os dias.

À **Vivian Diane Pelegrini** que infelizmente não pode ver a conclusão deste trabalho, ao qual deu início com amor e afinho, deixando o desejo de que um dia fosse terminado, pois aqui está. Esta dissertação foi concluída também em sua homenagem póstuma.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Profa. Dra. Carina Domaneschi** pela presteza e amizade, pela orientação e correção da dissertação, por ter aceitado o desafio de me ter como sua primeira aluna de mestrado.

A **Profa. Dra. Camila de Barros Gallo** sempre pronta a ajudar, auxiliando e ensinando de forma sobremaneira na execução dos procedimentos laboratoriais, sem você esse trabalho não teria sido desenvolvido, meu eterno agradecimento por sua orientação e amizade.

Ao **Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya** que com seu vasto conhecimento e senso crítico me deu nortes a mudança de tese e desenvolvimento desse estudo.

Ao **Prof. Dr. Dante Antonio Migliari** por transmitir seus conhecimentos e pelo apoio cedido.

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Braz da Silva** por sua colaboração no estudo histológico.

Aos **Professores da Disciplina de Estomatologia Clínica**, pelos acompanhamentos de casos clínicos, amizade e orientações.

Aos **funcionários do Departamento de Estomatologia** pela amizade e ajuda na realização desse trabalho.

Aos **colegas da Pós-Graduação** (Juliane, Thaís, Paula, Gustavo, Ricardo, Érica, Durval, Welington, Breno) pela amizade, almoços, risadas, estudos e troca de conhecimentos.

À **Ana Maria Hoyos** pelas fotos histológicas, revisão de texto e confecção de lâminas agradeço pelo seu tempo e sua amizade; sua colaboração foi essencial para este trabalho.

Aos amigos **Ícaro Ferracini e Cláudia Rezende** pelo apoio em momentos de desespero e por sempre me dizerem: eu acredito em você.

Ao **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes** por ceder seu laboratório de bom grado para a confecção desse trabalho.

Aos alunos do Programa de Pós- Graduação da Patologia Bucal **Douglas Magno Guimarães, Daniella Moraes Antunes e Maria Fernanda Setubal Destro Rodrigues**, pela gentileza em conceder os reagentes para a realização do PCR.

Aos **Professores Doutores Paulo Francisco César e Rodolfo Francisco Haltenhoff Melani** por terem me iniciado na carreira acadêmica.

Aos **amigos** que me incentivaram a busca dessa conquista, cedendo força e coragem.

A todos os **pacientes** que participaram desta pesquisa.

A **Capes** pelo apoio financeiro.

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória, nem a derrota.

(Theodore Roosevelt)

Lembre-se de que sonhos sem riscos produzem conquistas sem méritos.

(Augusto Curry)

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Carvalho VJG. Expressão dos genes codificadores de canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 em portadores da Síndrome de Ardência Bucal [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

A síndrome de ardência bucal (SAB) é uma condição caracterizada pelo sintoma de ardência na mucosa oral, na ausência de qualquer sinal clínico. Sua etiologia é desconhecida e, até o momento, não dispõe de tratamento efetivo. Há entretanto características de doença neuropática que justificam investigações nesse sentido. O objetivo desse estudo foi mensurar a expressão gênica dos receptores de canais de sódio, Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9, nos pacientes portadores de SAB. A casuística foi composta por dois grupos sendo o grupo de estudo composto por 12 pacientes portadores de SAB, selecionados através do critério estabelecido pela *International Headache Society*, em 2013 e o grupo controle composto por 4 pacientes não portadores de SAB. As amostras analisadas foram coletadas do dorso lingual, por meio de biópsia realizada com *punch* de 3 mm e profundidade de 3 mm, estas foram submetidas ao método de análise RT-PCR em tempo real. A expressividade dos genes de canais de sódio foi avaliada nos indivíduos portadores de SAB em relação aos do grupo controle, sendo esta calculada a partir da normalização dos dados da quantificação destes com os da expressão do gene constitutivo (GAPDH), pelo método de *Cycle Threshold* comparativo e analisados estatisticamente por meio do teste estatístico Mann-Whitney. Observou-se o aumento da expressão gênica do Nav 1.7 (*fold-change* = 38.70) e diminuição da expressão gênica do Nav 1.9 (*fold-change* = 0.89), porém sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados. O gene Nav 1.8 não foi expresso em nenhuma das amostras analisadas. O Nav 1.7 expressa-se tanto em neurônios nociceptivos quanto no sistema nervoso autônomo e mutações no Nav 1.9 tem sido associada a perda de percepção dolorosa. Os resultados obtidos embora não estatisticamente significativos são compatíveis com as características da doença, justificando a extensão dos estudos na linha expressão de genes codificadores dos canais de sódio em pacientes com SAB.

Palavras-chave: Canais de sódio. Nav 1.7. Nav 1.8. Nav 1.9. Síndrome de Ardência Bucal. RT-PCR em tempo real. Dor neuropática.

ABSTRACT

Carvalho VJG. Expression of coding genes sodium channel Nav 1.7, Nav 1.8 and Nav 1.9 in patients with Burning Mouth Syndrome [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Burning mouth syndrome (BMS) is a condition characterized by symptoms of burning in the oral mucosa, in the absence of any clinical signs. Its etiology is unknown and so far, it has no effective treatment. *It is important to mention that BMS exhibits some traits of a neuropathic disease, what justifies a thorough investigation of this subject.* The objective of this study was to measure the gene expression of the sodium channel receptors, Nav 1.7, Nav 1.8 and Nav 1.9, in patients with BMS. The sample was composed of two groups, being the study group formed by 12 patients with SAB, selected according to the criteria established by the International Headache Society in 2013, while the compound control group had 4 patients without SAB. The analyzed samples were collected from the tongue, by the biopsy technique with a 3 mm punch and 3mm depth. These samples were processed in real time, following the guidelines set forth by the RT-PCR method. The expressiveness of the sodium channels was evaluated in the individuals with BMS in relation to control group, which was calculated from the normalization of these data with the quantification of the expression of a constitutive gene (GAPDH) by the Cycle Threshold comparative methods and statistically compared by Man-Whitney test. We observed an increased gene expression of Nav 1.7 (fold-change = 38.70) and a decreased gene expression of Nav 1.9 (fold-change = 0.89), but no statistically significant differences between the groups. Nav 1.8 gene was not expressed in any of the samples. Nav 1.7 is expressed in both nociceptive neurons as the autonomic nervous system and changes in Nav 1.9 has been associated with loss of pain perception. The results although not statistically significant are consistent with the disease characteristics, justifying the extension line of the studies on the expression of genes encoding the sodium channel in patients with SAB.

Keywords: Sodium channel. Nav 1.7. Nav 1.8. Nav 1.9. Burning Mouth Syndrome. RT-PCR in real-time. Neuropathic pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Doenças sistêmicas associadas a SAB secundária	21
Figura 2.2 - Epidemiologia da SAB	24
Figura 2.3 - Comparação dos estudos realizados a respeito da etiologia multifatorial da Síndrome de Ardência Bucal.....	25
Figura 2.4 - Sinopse dos mecanismos moleculares que contribuem para a dor neuropática	34
Figura 2.5 - Classificação dos canais de sódio α -subunidades	40
Figura 2.6 - Canais de sódio presentes em diferentes tecidos de origem animal (macaco)	41
Figura 4.1 - Imagem ilustrativa da biópsia com <i>Punch</i> para coleta da amostra de tecido a ser analisada	49
Figura 4.2 - Amostras coletadas permaneceram congeladas em <i>freezer</i> a -80°C ...	50
Figura 4.3 - Pipetas utilizadas para mensuração volumétrica dos reagentes líquidos em todos os procedimentos laboratoriais	50
Figura 4.4 - Ilustração do nitrogênio líquido sendo dispensado na caixa de isopor, evitando o descongelamento da amostra durante o processo de maceração	51
Figura 4.5 - A: maceração em nitrogênio líquido do fragmento de tecido, B: aspecto após maceração e adição do reagente Trizol	52
Figura 4.6 - Centrífuga Eppendorf modelo 5810R utilizada nos experimentos	53
Figura 4.7 - Equipamento NanoDrop 2000 utilizado na quantificação e avaliação da qualidade das amostras de RNA extraído e purificado	53
Figura 4.8 – Gel de integridade demonstrando a integridade do RNA nas amostras A11, A12, C9, A17 e C11	54

Figura 4.9 - Conjunto de reagentes utilizado para purificação e eliminação do DNA genômico (RNeasy MinElute Clean-up Kit, QIAGEN)	55
Figura 4.10 - Conjunto de reagentes utilizados para a reação de transcrição reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) .	56
Figura 4.11 - Termocicladora Eppendorf Mastercycler utilizada para a reação de transcrição reversa	57
Figura 4.12 - Equipamento de RT-PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems)	59
Figura 5.1 - Curva observada no NanoDrop referente a quantidade de RNA presente na amostra C8	65
Figura 5.2 -Curva de amplificação permitindo a comparação entre os genes estudados Nav 1.7, Nav 1.8, Nav 1.9 e GAPDH, na amostra A14 obtidas pelo equipamento de RT- PCR em tempo real	67
Figura 5.3 - Curva de dissociação dos iniciadores conferindo especificidade da reação de PCR	68
Figura 5.4 - Diferença na expressão gênica entre grupo SAB e controle: embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$), observa-se tendência de aumento da expressão do Nav 1.7 e de diminuição do Nav 1.9 de acordo com a análise do método do CT comparativo	69
Figura 5.5 - Fragmento de mucosa oral. Imunoistoquímica S100. (A) Feixe nervoso em aumento de 40x	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	58
Tabela 5.1 - Sítios acometidos e tempo de duração dos sintomas dos pacientes com SAB da amostra estudada	61
Tabela 5.2 - Doenças sistêmicas relatadas pela amostra de pacientes portadoras de SAB	62
Tabela 5.3 - Medicamentos utilizados pelas pacientes portadoras de SAB	62
Tabela 5.4 - Terapêutica instituída para tratamento de SAB	63
Tabela 5.5 – Resultados da análise espectrofotométrica das amostras de RNA extraídas e selecionadas para a reação de RT-PCR em tempo real, analisadas no Nanodrop, pré e pós-purificação das mesmas	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido Alfa Lipóico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CT	Threshold Cycle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Neurônio do gânglio dorsal
DHEA	Dehidroepiandrosterona
FCA	Adjuvante completo de Freund
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IHS	International Headache Society
IL	Interleucina
LPM	Laboratório de Patologia Molecular
mRNA	Rna mensageiro
Nav 1.7	Canal de sódio do gene SCN9A
Nav 1.8	Canal de sódio do gene SCN10A
Nav 1.9	Canal de sódio do gene SCN11A
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGF	Fator de crescimento neural
NKA	Neuroquinina A
NK1R	Receptor de neuroquinina 1
Nm	Nanômetro
Pb	Pares de bases
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAB	Síndrome de Ardência Bucal
SP	Substância P
SPR	Receptor de substância P
TACR1	Receptor de taquikinina 1
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRP	Receptor de potencial transitório do canal de cátions
TRPV1	Receptor de potencial transitório do canal de cátions, subfamília V , membro 1
TTX	Corrente de canal de sódio
TTX r	Corrente de canal de sódio resistente
VAS	Escala Visual Analógica
VGSC	Voltagem tetrodotoxina-resistente

LISTA DE SÍMBOLOS

J / cm ²	Joules por centímetro quadrado
J	Joules
Aδ	Amperes
K ⁺	Potássio
Na ⁺	Sódio
Ca ⁺	Cálcio
Cl ⁻	Cloro
mW	Megawatt
μL	Micro litros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Caracterização da Síndrome de Ardência Bucal	20
2.1.1 SAB primária	22
2.2 Epidemiologia da SAB	22
2.3 Tratamentos para a Síndrome de Ardência Bucal.....	26
2.3.1 Psicotrópicos	26
2.3.2 Capsaicina	27
2.3.3 Ácido alfa lipóico	27
2.3.4 Terapia a laser de baixa intensidade.....	29
2.3.5 Homeopatia	30
2.4 Alterações Neurogênicas em Pacientes com a SAB	31
2.5 Dor Neuropática e Alodínia	32
2.6 Biologia Molecular	35
2.6.1 Síndrome de Ardência Bucal e a biologia molecular	36
2.7 Canal de Sódio Voltagem Dependente	39
2.7.1 Canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9	41
3 PROPOSIÇÃO	45
3.1 Objetivo primário.....	45
3.2 Objetivo secundário	45
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Casuística	46
4.2 Desenho do Estudo.....	46
4.2.1 Critérios de inclusão do grupo caso	47
4.2.2 Critérios de inclusão do grupo controle	48
4.2.3 Critérios de exclusão de ambos os grupos.....	48
4.3 Método de coleta e processamento das amostras	48
4.3.1 Extração do RNA total	51
4.3.2 Quantificação do RNA e verificação de sua qualidade.....	53
4.3.3 Eliminação do DNA genômico e purificação do RNA	54

4.3.4 Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA	56
4.3.5 RT-PCR em tempo real.....	57
4.3.5.1 Iniciadores.....	58
4.3.5.2 Reação de PCR	59
4.4 Análise dos Resultados	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 Caracterização do Grupo Caso (Pacientes com SAB)	61
5.2 Caracterização do Grupo Controle	64
5.3 Dados Obtidos Através de RT-PCR em Tempo Real.....	64
5.4 Histologia e Imunoistoquímica	69
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

No início do século XX a Síndrome de Ardência Bucal (SAB) foi caracterizada por Butlin e Oppenheim como glossodínia (Gilpin, 1936), nos anos seguintes foi referida como glossopirose, disestesia oral, língua dolorosa, estomatodínia e estomatopirose (Zakrzewska et al., 2005).

De acordo com os critérios diagnósticos atuais da *International Headache Society* (IHS) de 2013, a SAB é caracterizada por dor espontânea em queimação, tendo uma mucosa visivelmente intacta, com achados clínicos, dentários, laboratoriais e sistêmicos normais. E segundo Merksey e Bogduk (1994) a SAB é uma entidade nosológica distinta, caracterizada por episódios de ardência com duração de pelo menos quatro meses.

A SAB afeta sete vezes mais mulheres que homens, entre a 4ª e 5ª décadas de vida (Bergdahl; Anneroth, 1993). Em literatura nota-se os seguintes fatores de risco para o seu desenvolvimento: gênero feminino, perimenopausa, distúrbios de depressão e ansiedade, doença de Parkinson e doenças crônicas, incluindo doenças gastrointestinais e urogenitais (Gurvits; Amy, 2013). A prevalência é de 0,7 a 4,6% na população geral (Grushka; Sessle, 1991), sendo que essa variabilidade nos números de prevalência reflete na dificuldade de se estabelecer um critério para diagnóstico da SAB (Borelli et al., 2010).

O início dos sintomas é espontâneo, podendo ser comumente acompanhado por uma alteração de paladar (metálico ou amargo) e xerostomia (Ship et al., 1995; Nagler; Hershkovich, 2004; Granot; Nagler, 2005; Eliav et al., 2007; Jääskeläinen, 2012). Na maioria dos casos, os relatos descrevem picos álgicos no decorrer do dia podendo ser esses persistentes ou pontuais. Os sintomas surgem pela manhã, piora ao longo do dia, tendo o seu pico no final da tarde com remissão à noite, raramente interferindo no sono do paciente (Gruska et al., 2002; Torgerson, 2010; Jääskeläinen, 2012) e variam também de acordo com os alimentos ingeridos e o estado emocional. Os sítios mais envolvidos são a língua, seguido pelo palato, mucosa do lábio inferior e mucosa jugal (Grushka, 1987). A queixa geralmente é bilateral, podendo ocorrer, todavia unilateralmente (Jääskeläinen, 2012; Kohorst et al., 2015).

Trata-se de uma dor de grande intensidade, assemelhando-se a sensação de queimar a mucosa oral após a ingestão de alimentos quentes e apimentados.

Atualmente o diagnóstico da SAB é feito naqueles pacientes que apresentam o sintoma de ardência bucal com ausência de sinais clínicos ou alterações em mucosa, no entanto, a característica crônica da doença só é dada quando o quadro permanece idiopático, mesmo após avaliação completa (Patton et al., 2007). No entanto, algumas condições foram relacionadas a causa da ardência, como: gengivite, tratamento dentário, infecções, reações alérgicas, deficiência nutricional e outras alterações endócrinas como diabetes e menopausa.

As manifestações clínicas sistêmicas associadas a esta Síndrome incluem distúrbios gastrointestinais, urogenitais, psiquiátricos, neurológicos e metabólicos, assim como reações a drogas (Gurvits; Amy, 2013). Devido à variedade de alterações apresentadas pelos portadores de SAB, supõe-se que a etiologia seja multifatorial, envolvendo fatores locais, sistêmicos e psicogênicos.

Fatores psicológicos como depressão, ansiedade e diminuição da qualidade de vida desses pacientes, também são comumente relacionados a SAB, embora não tenha sido demonstrada uma relação concisa de causa e efeito, isso se deve principalmente pela dificuldade no estabelecimento das relações temporais e causais entre o distúrbio psicológico e a SAB (Sardella et al., 2006; Suarez; Clarck, 2006).

O mecanismo de transdução neuroquímica da dor envolve, geralmente, a interação dos mediadores com um canal iônico da membrana tipo voltagem-dependente (canais de sódio, potássio e cálcio) (Carvalho, Lino 1998).

Na última década um possível envolvimento da SAB com o sistema nervoso central ou sistema nervoso periférico recebeu maior atenção, sugerindo-se uma alteração neuropática como provável característica nosológica da SAB, desde então algumas pesquisas foram desenvolvidas investigando-se canais de sódio, além de diversos neuropeptídeos.

Na tentativa de desvendar a etiologia da SAB emergiu a ideia de utilizar os recursos da biologia molecular no sentido de contribuir com o esclarecimento das bases etiológicas da condição e, por consequência, possibilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da Síndrome de Ardência bucal

A SAB caracteriza-se pela sensação de ardência crônica, idiopática, que afeta a mucosa da cavidade oral na ausência de sinais clínicos locais ou alterações laboratoriais detectáveis (Grushka et al., 2002).

No entanto, Scala et al. (2003) propuseram que a SAB poderia ser classificada sob duas formas clínicas:

- SAB primária ou SAB idiopática cujas causas locais ou sistêmicas não podem ser identificadas e uma causa neuropatológica é provável.
- SAB secundária que seria a variante resultante de condições patológicas locais ou sistêmicas sensíveis à etiologia da terapia dirigida, onde a causa é alguma condição tratável local ou sistêmica, como hipossalivação, infecções orais, deficiências nutricionais, alergias, irritação causada por refluxo esofágico, utilização de determinadas drogas, e algumas doenças endócrinas.

A figura 2.1 ilustra as doenças sistêmicas que podem ter associação com a SAB, caracterizando assim a SAB secundária (Javali, 2015).

A. Physical, chemical, Medications.

- Parafunctional habits.
- Contact stomatitis/allergy, i.e., allergy to dentifrices, mouthwashes, cinnamon and metals.
- Fixed drug eruption.
- Radiation mucositis and its long-term sequelae.
- Chemotherapy, Antihypertensive drugs, benzodiazapines.

C. Nutritional disorders

- Vitamin B-1, B-2, B-6, B-12.
- Iron deficiency and Folate deficiency.

B. Infection

- Candidiasis, pseudomembranous and median rhomboid glossitis.
- Fusospirochetal infections, Helicobacter pylori.
- Gonococcal infection.
- HIV, HSV, VSV infection.
- ANUG.

D. Dermatologic disorders

- Lichen planus, particularly atrophic lichen planus.
- Erythema multiforme, Benign mucous membranes pemphigoid.
- Pemphigus vulgaris, Lupus erythematosus.

E. Systemic diseases

- Diabetes mellitus.
- Uremia.
- Crohn's disease.
- Blood dyscrasias.

F. Referred pain from other disorders.

- Myofascial pain dysfunction and cervical nerve distributions.
- Gastroesophageal reflux disease.
- Trigeminal and glossopharyngeal neuralgia.

G. Burning mouth syndrome-like symptoms secondary to disorders of the central nervous system

- Multiple sclerosis, Parkinson's disease, Tardive dyskinesia.
- Mass lesions involving the brain and CNS.

H. Psychological

- Anxiety, Depression and Psychopathologic disorders.

Figura 2.1 - Doenças sistêmicas associadas a SAB secundária (Javali, 2015. p.176)

2.1.1 SAB primária

Apesar de extensa pesquisa no campo, ainda pouco se sabe sobre SAB.

A SAB é caracterizada por dor espontânea em queimação, tendo uma mucosa visivelmente intacta, com achados clínicos, dentários, laboratoriais e sistêmicos normais. (IHS 2013)

Normalmente, alguns outros sintomas podem acompanhar a SAB tais como boca seca e / ou alteração do paladar. Atualmente, pensa-se que a SAB primária reflete neuropatia das pequenas fibras trigeminais.(Boras et al.,2015).

De acordo com Jääskeläinen (2012) o diagnóstico clínico da SAB primária engloba pelo menos três formas distintas de dor neuropática subclínicas.

A) primeiro subgrupo (50-65%) - caracterizado por fibras de diâmetro pequeno e neuropatia periférica da mucosa intra-oral.

B) segundo subgrupo (20-25%) - composto de pacientes com patologia lingual ou mandibular, patologia do sistema trigeminal que podem ser dissecados com exame neurofisiológico cuidadoso, mas é clinicamente indistinguível entre os dois outros subgrupos.

C) terceiro subgrupo (20-40%) - encaixa-se no conceito de dor central podendo estar relacionando com hipofunção dos neurónios dopaminérgicos nos gânglios basais.

2.2 Epidemiologia da SAB

A prevalência é de 0,7 a 4,6% na população geral (Grushka; Sessle, 1991), sendo que essa variabilidade nos números de prevalência reflete na dificuldade de se estabelecer um critério para diagnóstico da SAB (Borelli et al., 2010).

Em uma análise transversal, a partir de registros públicos da *Dental Health Service*, mais de 1000 pacientes suecos foram selecionados aleatoriamente e desta amostra 3,7% dos indivíduos foram diagnosticados com SAB depois de relatar sintomas de ardência em boca (Bergdahl; Bergdahl,1999).

Lipton et al. (1993) relataram uma prevalência estimada de 0,7% de pacientes portadores de SAB com base apenas nos sintomas auto-relatados em 45.000 lares americanos entrevistados.

Haberland et al. (1999) em um estudo, realizado nos EUA com duração de 2 anos e meio, observaram que 9,7%, da amostra total de 486 novos pacientes, foram diagnosticados com SAB.

No estudo retrospectivo de Netto et al. (2011) composto por mais de 3000 pacientes brasileiros, relataram uma prevalência de cerca de 0,99% na amostra estudada na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), durante um período de 7 anos.

Popa et al. (2011) relataram que entre os portadores de SAB que 89% eram moradores urbanos, 72,9% possuíam idade acima de 50 anos e em 93% dos casos o sítio mais acometido foi a língua.

Adamo et al. (2015) encontraram em sua amostra (75 pessoas) uma proporção homem / mulher = 1: 3, sendo a idade média dos portadores da SAB de 61,17 anos e a idade média do início da doença foi 56,75 anos; adicionalmente também observaram um baixo nível educacional e 80% de desemprego.

A remissão espontânea é rara e aproximadamente 1/2 a 2/3 dos pacientes relatam melhoria dos sintomas após 6 a 7 anos do início da sintomatologia (Grushka et al.,1987). Sardella et al. (2006) encontrou 3% de remissão espontânea em 5 anos.

Kohorst et al. (2015) realizaram um compilamento dos estudos sobre epidemiologia na SAB, os dados obtidos nesse apanhamento foram compactados e podem ser observados na figura 2.2.

Study	Prevalence (%)	Study method
Kohorst 2015, present report ^a	0-11, total; 0-04, male; 0-17, female	Population-based retrospective review of Olmsted County, Minnesota
Dangore-Khasbage 2012[9]	20-7	Cross-sectional study of 150 psychiatric patients at a single hospital in India
Netto 2011[10]	1-0	Retrospective review of 3243 patients referred to the oral pathology department at a single hospital in Brazil over 7 years
Suzuki 2010[6]	3-0, total; 2-8, male; 3-2, female	Questionnaire of 2599 dental patients at two offices in Japan
Rabiei 2010[11]	16-9	Cross-sectional study of 216 nursing-home residents in Iran
Moore 2007[7]	2-1	Cross-sectional study of 216 volunteer participants in Pittsburgh, Pennsylvania
Brailo 2006[12]	5-4	Retrospective review of 1399 patients referred to an oral medicine department in Croatia in 2001
Bergdahl 1999[5]	3-7, total; 1-6, male; 5-5, female	Survey of 1427 Swedish volunteers (age 20–69 years)
Riley 1998[13]	1-7	Telephone survey of 1636 volunteers from North Florida (age > 65 years)
Hakeberg 1997[14]	4-6	1017 middle-aged and elderly women in Sweden
Thorstensson 1996[15]	3-4	Survey of 533 Swedish volunteers (age 20–70 years)
Tammiala-Salonen 1993[8]	14-8	431 Finnish volunteers

^a Point prevalence on 31 December 2010. Adapted from Kohorst JJ, Bruce AJ, Torgerson RR *et al.* A population-based study of the incidence of burning mouth syndrome. *Mayo Clin Proc* 2014; **89**:1545–52. Used with permission of Mayo Foundation for Medical Education and Research.

Figura 2.2 - Epidemiologia da SAB (Kohorst et al., 2015. p.1654)

Diversos fatores são diagnósticos diferenciais da SAB e devem ser excluídos como: a prótese mal adaptada, fatores parafuncionais, candidíase, alergias, diabetes, hipotireoidismo, menopausa, deficiências (de ferro, ácido fólico, vitamina B e / ou de zinco), distúrbios do trato digestivo, síndrome de Sjögren e outras doenças auto-imunes, medicamentos da classe dos anti-histamínicos, anti-epilépticos, medicamentos hipotensores e diuréticos. Observa-se concomitantemente as alterações já citadas mudanças nos perfis psicológicos dos pacientes, incluindo ansiedade, depressão, hipocondria, cancerofobia, e instabilidade emocional. (Bergdall; Bergdall, 1999; Scala et al., 2003; Mendak-Ziółko et al., 2012; Javali, 2015).

A fisiopatologia é considerada heterogênea, apesar da expressão clínica homogênea do grupo de pacientes com SAB (Grémeau-Richard et al., 2009).

Por possuir sua etiologia ainda incerta, Mendak-Ziółko et al. (2012) investigaram os fatores que poderiam ser predisponentes aos portadores de SAB, realizando um apanhado de estudos e sintetizados em uma tabela, como é possível

visualizar na figura 2.3. Os fatores mais associados foram: psicológicos, hábitos parafuncionais, terapia hormonal, polifarmácia e xerostomia.

<i>Author, year, country</i>	<i>No. of patients with BMS/number of controls</i>	<i>No. and type of variables</i>	<i>Analysis type</i>	<i>Findings (significant variables)</i>
Maresky et al. ³² 1993, Republic of South Africa	85/156	36 variables: 27 general, 8 dental, 1 psychological	Chi-square	In women: autotherapy, hormone therapy, anemia, xerostomia In men: polypharmacy, autotherapy, central nervous system disorders, prosthetic treatment, xerostomia
Svensson and Kaaber ³³ 1995, Denmark	30/26, all with prosthesis	23 variables: 8 general, 13 dental, 2 psychological	Chi-square	Gynecologic and neurological disorders, psychological stress, short-term wearing of dentures, incorrectly fitted upper and lower dentures Major depression episode, anxiety states
Bogetto et al. ³⁴ 1998, Italy	102/102	15 variables: 6 general, 9 psychological and psychiatric	Chi-square	
Bergdahl and Bergdahl ⁴ 1999, Sweden	53/1360	22 variables: 17 general, 3 psychological, 2 dental	Spearman's correlation, multiple regression	In correlation: xerostomia, age, polypharmacy, depression on the Beck scale, trait anxiety (STAD), treatment with thyroxine
Hakeberg et al. ³⁵ 1997, Sweden	48/969 women	17 variables: 10 general, 7 dental	Logistic regression	Regression: lack of a significant model Xerostomia, hypotensive drugs, hormonal therapy, tinnitus
Soares et al. ¹³ 2005, Spain	40/40	10 variables: 5 general, 3 dental, 2 psychological	Chance quotient	Xerostomia, hypotensive medications, diuretics
Gao et al. ⁹ 2009, China	87/82	20 variables: 14 general, 3 dental, 3 psychological and psychiatric	Logistic regression	Significant model for 6 variables: tongue parafunction, parafunctional lip sucking, parodontitis, smoking, polypharmacy, depression
Takenoshita et al. ³⁶ 2010, Japan	125	12 variables: 1 general, 11 psychological and psychiatric	Two-way logistic regression	Age over 50, affective diseases; especially depression
Gleber Netto et al. ³⁷ 2011, Brazil	32/64	10 general variables	Logistic regression	Digestive tract or genitourinary system disorders
Rouleau et al. ¹⁴ 2011, United States	68/102	8 variables: 5 general, 3 dental	Logistic regression	Time and wearing of removable dentures, protective effect of herbal medications
Authors' own studies	33/30	17 variables: 16 neurological and 1 general	Logistic regression	Latency >2.35 ms in the sensory ulnar nerve latency >5.96 ms V-R in BAEP amplitude >39 μ V P2-L in TSEP

Figura 2.3 - Comparação dos estudos realizados a respeito da etiologia multifatorial da Síndrome de Ardência Bucal (Mendak-Ziółko et al., 2012. p. 330)

2.3 Tratamentos para a Síndrome de Ardência Bucal

As propostas atuais de tratamento ainda são empíricas, sendo empregadas terapias indicadas para o controle de dores neuropáticas (Scala et al., 2003).

2.3.1 Psicotrópicos

É comum o uso de medicamentos como os antidepressivos tricíclicos, clonazepam (benzodiazepínico), gabapentina e antiepiléticos, medicamentos estes voltados essencialmente para o controle dos sintomas da ardência bucal e não para a cura da doença (Grushka et al., 2002).

Yamazaki et al. (2009), avaliaram 71 pacientes e medicaram com cloridrato de paroxetina. Neste estudo prospectivo, sem grupo controle, após 12 semanas de tratamento 70,4% dos pacientes tiveram remissão completa da sintomatologia.

O Clonazepam Tópico utilizado no estudo de Gremeau-Richard et al. (2004), apresentaram um resultado benéfico significativo, quando comparado ao grupo placebo. Foi administrado três vezes ao dia, em tabletes com 1mg da droga, durante quatorze dias, proporcionando melhora em 2/3 dos sujeitos incluídos na pesquisa.

Barker et al. (2009) compararam a efetividade do uso via oral do diazepam e clonazepam mostrando que o efeito do clonazepam foi superior, percentualmente, quando comparado ao diazepam, embora não se tenha estabelecido significância estatística entre ambos.

2.3.2 Capsaicina

A capsaicina atua em receptores tipo C diminuindo o estímulo de dor e reduzindo a inflamação nos neurônios segundo Rumisfield e West (1991). No entanto, em relação ao seu uso como agente tópico, Grushka et al. (2002) afirmaram que não há relatos suficientes que deem suporte à indicação deste agente como terapêutica na SAB.

Petruzzi et al. (2004), em virtude de considerarem a aplicação tópica da capsaicina pouco efetiva e de difícil aceitação pelo paciente, avaliaram o efeito da capsaicina sistêmica no tratamento da SAB por quatro semanas. Este tratamento provocou alterações gástricas (dor) em 32% dos pacientes, com início dos sintomas relatado a partir da segunda semana de tratamento. Os autores observaram redução significativa do sintoma e sugeriram que os resultados positivos encontrados reforçam a teoria da etiologia neurológica.

No trabalho desenvolvido por Fréo 2008, foi utilizado a capsaicina em indivíduos com SAB e controles, a evolução dos sintomas dor controlada através de escala visual de sintomatologia e questionário a cerca do efeito global percebido. A conclusão deste estudo foi que a capsaicina apresentou efetividade no controle da sintomatologia da SAB, parecendo haver correlação com a intensidade inicial de sintomas e manutenção do uso do medicamento.

2.3.3 Ácido alfa lipóico

O Ácido Alfa Lipóico (ALA) é um importante antioxidante que impede danos oxidativos ao sistema nervoso.

Embora ainda não se conheça o exato mecanismo de ação desta medicação na SAB, sabe-se que o ALA eleva os níveis celulares de glutathione. Baixos níveis de glutathione podem causar estresse oxidativo e inflamações assim como dano neural, induzindo o desenvolvimento de um quadro de neuropatia periférica. Como a SAB

pode se desenvolver a partir de uma neuropatia relacionada à produção de radicais livres e baixos níveis de glutathione intracelular, o ALA pode ser benéfico pelo menos para alguns destes pacientes (Feminiano et al., 2004).

Marino et al. (2010) realizaram um estudo com 56 pacientes com SAB separados aleatoriamente em grupos para tratamento com capsaicina, ALA, lisozima-lactoperoxidase (fármacos de teste) ou ácido bórico (grupo de controle). Os resultados demonstraram a eficácia similar de capsaicina e ácido alfa-lipóico em controlar os sintomas da Síndrome de Ardência Bucal, sendo que a utilização do ácido bórico não apresentou melhoras nas queixas dos pacientes.

Em contrapartida, Carbone et al. (2009), realizaram um estudo randomizado controlado com placebo, incluindo dois grupos, dois testes e um controle, para avaliar a eficácia do ALA na SAB, sendo um grupo composto por ALA sistêmico (400 mg), o segundo grupo por ALA (400 mg) mais vitaminas, e o terceiro grupo placebo. Todos os três grupos tiveram reduções significativas de 30% na pontuação da Escala Visual Analógica (VAS). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, quer na taxa de resposta ou na latência média do efeito terapêutico, concluindo que não houve diferenças entre placebo e medicação, portanto esse estudo não considerou a terapia com ALA eficaz.

Miziara et al. (2015) realizaram uma revisão da literatura sobre as principais opções de tratamento na SAB idiopática e comparou os melhores resultados dos principais estudos em 15 anos. Concluiu que o clonazepam tópico mostrou bons resultados em curto prazo para o alívio da dor, embora isso não foi apresentado como uma cura definitiva; o ALA mostrou bons resultados, mas existem poucos estudos randomizados controlados que mostraram os resultados a longo prazo e remissão completa dos sintomas.

Silveira et al 2009, realizaram um estudo composto por trinta e um pacientes randomizados em dois ciclos de tratamento: um com ácido alfa lipóico e o outro com placebo, ambos administrados via oral com cápsulas idênticas. Os sintomas orais e a resposta ao tratamento foram avaliadas utilizando a Escala Visual Analógica, com 100 mm de extensão, antes e depois de cada ciclo e o global. O nível de redução nos sintomas de ardência foi significativo para ambos os tratamentos, ficando dessa forma demonstrada a mesma eficácia entre grupo doença e placebo.

2.3.4 Terapia a laser de baixa intensidade

A irradiação com laser de baixa intensidade com comprimentos de onda entre 632nm a 780nm tem demonstrado que a fototerapia aumenta o metabolismo da célula nervosa injuriada, estimulando a produção de um tecido cicatricial no sítio da lesão; previne e/ou diminui a degeneração das fibras lesionadas; estimula o crescimento axonal e a remielinização da mesma. Os efeitos produzidos permanecem mesmo depois de cessado o período da irradiação (Rochkind, 2006).

No estudo de Pellegrini 2010, foi utilizado laser de baixa intensidade em pacientes portadores de SAB, o grupo portador de SAB foi dividido entre o grupo laser e o grupo placebo, os grupos foram randomizados através de um programa de computador e os pacientes foram mantidos cegos, na análise estatística o grupo laser demonstrou melhor resposta, concluindo desta forma a eficácia do laser no controle dos sintomas da ardência.

Um estudo com laser de baixa intensidade foi realizado a fim de determinar os níveis de citocinas pró inflamatórias de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) em saliva não estimulada em indivíduos com SAB antes e após o tratamento. Um grupo controle foi adicionado ao estudo para padronização dos dados. Após 4 semanas de utilização da laserterapia, os níveis salivares do TNF- α e IL-6 diminuiu significativamente no grupo doença ($p < 0,001$), porém não houve diferença significativa neste grupo em relação a escala VAS (Pezelj-Ribarić et al., 2013).

Noutro estudo, dez pacientes foram submetidos a uma sessão semanal de laser de baixa intensidade durante 10 semanas. Um comprimento de onda contínua de 660 nm, potência de 40 mW, 20 J / cm², 0,8 J / ponto, com cada ponto irradiado por 10 s. Em todas as sessões a intensidade dos sintomas foram avaliadas utilizando a escala VAS, com uma escala de 10 cm. Todos os pacientes relataram melhora em todas as sessões, com redução nos escores de VAS em até 58% na décima sessão. Quando apenas a linha de base VAS da primeira sessão foi comparado com as outras sessões, houve uma redução estatisticamente significativa nos escores de VAS na quarta ($p = 0,03$), quinta ($p = 0,03$), sexta ($p = 0,009$), sétima ($p = 0,003$), oitava, nona e décima sessões (todos $p = 0,002$) (Santos et al., 2011).

Treze pacientes em um estudo piloto, não controlado, foram irradiados com laser em baixa intensidade e relataram até 80,4% de melhora na sintomatologia (Kato et al., 2010).

Após realizar uma revisão de literatura que aborda os tipos de terapêuticas disponíveis, Javali (2015) concluiu que a terapêutica efetiva seria um conjunto de terapêuticas, somando a terapia cognitiva, o ácido alfa-lipóico e ou clonazepam tópico. Ressalta também a importância de incluir acompanhamento psiquiátrico em casos pontuais.

De acordo com as terapias propostas para a SAB primária, o estudo realizado por De Moraes et al. (2012), mostraram que algumas das terapias testadas tiveram efeitos colaterais. A capsaicina causou desconforto gástrico após o uso prolongado, o clonazepam causou sonolência, xerostomia e também aumentou a sensação de queimação em boca. Dor de cabeça e dor de estômago foram relatados com o uso de ALA.

2.3.5 Homeopatia

Homeopatia (do grego ὁμοιος + πάθος transliterado hómoios - + páthos = "semelhante" + "doença") é uma forma de terapia alternativa iniciada por Samuel Hahnemann (1755-1843). Baseia-se no princípio *similia similibus curantur* (semelhante pelo semelhante se cura), ou seja, o tratamento se dá a partir da diluição e dinamização da mesma substância que produz o sintoma num indivíduo saudável. A homeopatia reconhece os sintomas como uma reação contra a doença. A doença seria uma perturbação da energia vital e a homeopatia provocaria o restabelecimento do equilíbrio (Bomtempo, 1992).

Estudo realizado por Chebel, 2013 utilizou duas fases terapêuticas para a avaliação dos efeitos da homeopatia em pacientes portadores de SAB. Este estudo foi composto por 31 pacientes diagnosticados com o sintoma de ardor bucal cuja resposta terapêutica fora avaliada utilizando uma Escala Visual de Sintomatologia (EVS) a cada visita. Para se avaliar o Efeito Global Percebido (EGP), utilizou-se uma escala de 5 pontos ao término da FASE 1. O nível de redução sobre o sintoma ardor bucal avaliado pela EVS e o Efeito Global Percebido (EGP) foram estatisticamente significantes para o grupo G1 (*Arsenicum album*) com redução de sintoma de 44,50% em relação ao placebo (12,65%). Na FASE 2 (estudo aberto), 28 pacientes que

participaram da FASE 1, receberam medicamento homeopático individualizado durante 7 meses, com visitas mensais e Washout de 60 dias. Houve redução de sintomas no final do tratamento de 64,60%. A análise dos dados permitiu concluir que ambos os tratamentos FASE 1 e FASE 2 tiveram efeito terapêutico com significância estatística.

2.4 Alterações Neurogênicas em Pacientes com SAB

Jääskeläinen et al. (1997), demonstraram uma alteração no reflexo do piscar de olhos em um pequeno grupo de pacientes com SAB, corroborando com a etiologia neuropática da condição. Forssell et al. (2002), evidenciaram anormalidades significantes em teste eletrofisiológico e teste sensorial quantitativo, indicando uma possível neuropatia em inervação periférica como causa para SAB.

Ao comparar pacientes portadores de SAB com pacientes saudáveis pareando os mesmos por sexo e idade Svensson et al. (1993) obtiveram como resultados que limiares de dor foram significativamente elevados no lábio inferior, no palato duro anterior, e nas mãos de pacientes com SAB em um teste utilizando laser de argônio. A respeito do nível de limiar sensorial, uma percepção comparada a uma fraca alfinetada era frequentemente relatada por pacientes com SAB, enquanto no grupo controle era sentido como uma percepção de calor.

Imagens de Ressonância Magnética mostraram diferentes padrões qualitativos e quantitativos de ativação cerebral em pacientes com SAB quando comparados ao grupo controle após estimulação térmica do nervo trigêmeo. Uma hipo atividade no lobo parietal e no tálamo poderia ser incluída entre os potenciais fatores associados à SAB, justificando também as desordens psíquicas observadas nesses pacientes como, ansiedade, depressão, transtorno obsessivo compulsivo (Albuquerque et al., 2006).

Em 2007, Eliav et al. avaliaram uma possível disfunção do nervo corda do tímpano, mostrando hipoteticamente que uma disfunção nesta inervação poderia originar hiperfunção do nervo lingual e consequente sensação de ardência.

Scardina et al. (2008), estudaram *in vivo* alterações da microcirculação em pacientes com SAB. Os capilares sanguíneos em indivíduos com SAB apresentaram

aumento estatisticamente significativo. As alterações vasculares que ocorrem durante um processo inflamatório, proporcionariam um maior fluxo sanguíneo e este, por sua vez, poderia provocar dor e calor na região. Entretanto, essa investigação não pode comprovar se esses achados constituem consequência ou causa da SAB.

Houve uma investigação a respeito da inervação do epitélio da língua para avaliar se os danos das fibras nervosas periféricas eram subjacentes à patogênese da SAB. Foram examinados 12 pacientes com SAB clinicamente definida por pelo menos 6 meses. As biópsias superficiais foram realizadas nos dois terços anteriores da língua de todos os pacientes e nove controles saudáveis. Foram realizados estudos de imunoistoquímica e confocal sendo realizadas com marcadores citoplasmáticos, *cytoskeletal*, célula de Schwann e de mielina. A densidade de fibras nervosas epiteliais foi quantificada. Os pacientes apresentaram uma densidade significativamente menor de fibras nervosas epiteliais em relação ao grupo controle, com uma tendência de correlação com a duração dos sintomas e mostrou-se difusa as alterações morfológicas que refletem a degeneração axonal. A conclusão obtida foi que a SAB é causada por uma neuropatia das pequenas fibras trigeminiais sensoriais e que a biópsia superficial da língua pode ser útil no diagnóstico (Lauria et al., 2005).

2.5 Dor Neuropática e Alodínia

Um estudo inédito realizado na França realizou um levantamento nacional sobre o impacto da dor neuropática, em relação a dor não neuropática na qualidade de vida e utilização dos cuidados de saúde na população em geral. Os indivíduos que apresentaram dor neuropática exibiram maior grau de comprometimento de qualidade de vida e sono, apresentaram escores de ansiedade e depressão mais elevados em comparação à aqueles com queixa de dor sem características neuropáticas e aos indivíduos sem dor (Attal et al., 2011).

A dor neuropática é desencadeada pela presença de lesões no sistema nervoso somatossensorial que alteram a sua estrutura e função, de modo que a dor ocorre espontaneamente e respostas a estímulos nocivos são patologicamente amplificadas (Costigan et al., 2009).

Para o diagnóstico mais preciso da dor neuropática, é necessário a realização de exames para excluir outras causas. Além de exames laboratoriais (imagens e sangue), a coleta de amostra de tecido mostrou-se eficiente para a detecção de neuropatias, a biópsia de pele teve uma eficiência diagnóstica de 88,4%, o exame clínico de 54,6% e o teste sensorial quantitativo de 46,9% (Devigili et al., 2008).

Existem diversos mecanismos que tentam elucidar a dor neuropática, segundo Schestatsky et al. (2008), o mecanismo mais plausível e cientificamente aceito para explicar a dor neuropática é a geração ectópica de impulsos nervosos às fibras de pequeno calibre do tipo C e Aδ. Após a lesão do nervo, alguns pacientes desenvolveram alterações na distribuição e conformação de canais iônicos em especial os canais de sódio que promovem aumento da excitabilidade axonal das fibras finas nociceptivas. Tal excitabilidade é muitas vezes gerada longe do foco da lesão inicial, entretanto, são capazes de acarretar o surgimento de sintomas de características neuropáticas.

Na figura 2.4 Nickel et al. (2012) exemplificaram a via da dor neuropática de forma ilustrativa, onde temos:

- **Sensibilização do nociceptor:** são receptores com diferentes modalidades específicas de estímulo sendo ativados por estímulos mecânicos, térmicos, químicos e tóxicos.
- **Excitabilidade anormal ectópica dos neurônios aferentes e dor simpaticamente mantida:** em síndromes de dor neuropática ectópica anormal a excitabilidade de neurônios aferentes leva a sintomas positivos. Aparentemente, estes sintomas são gerados por canais de sódio, que são diferencialmente expressos e distribuídos de forma anormal e ativos na dor neuropática.
- **Propriocepção no corno dorsal da medula:** a propriocepção leva a sensações dolorosas espontâneas, picos de hiperalgesia e alodinia são os sinais clínicos relacionados com a sensibilização central.

Estes mecanismos adaptativos resultam em aumento da excitabilidade dos neurônios nociceptivos centrais que se tornam ativados, resultando na dor neuropática.

Figura 2.4 - Sinopse dos mecanismos moleculares que contribuem para a dor neuropática. A) sensibilização do nociceptor. B) excitabilidade anormal ectópica dos neurônios aferentes e dor simpaticamente mantida. C) A desinibição da nocicepção na rede inibidora da coluna vertebral. D) Propriocepção no corno dorsal da medula (Nickel et al., 2012. p.83)

Os aspectos sensoriais e psicológicos de dor são separáveis em termos de vias dentro do sistema nervoso central, todavia existe uma inter-relação entre as vias neurais que contribuem para esses componentes. A partir destes sintomas em ambos os locais periféricos e centrais, existem mecanismos que podem amplificar e prolongar a experiência de um estímulo doloroso e uma codificação errada de estímulos normalmente inócuos podendo provocar dor intensa na presença de uma desordem periférica, mesmo sendo esta pequena (Harve; Dickenson, 2008).

Sherrington (1906) definiu um estímulo nocivo como sendo um estímulo de intensidade e qualidade suficiente para desencadear a retirada reflexa, respostas autonômicas e dor, constituindo coletivamente o que chamou de reação nociceptiva.

A SAB pode ser considerada uma alodínia, definida como dor originada através de um estímulo incapaz de provocar dor em situações normais (Schestatsky, 2008).

Canais de sódio voltagem-dependentes são fundamentais na regulação da excitabilidade dos neurônios sendo que mudanças significativas na expressão desses canais podem produzir padrões de disparo espontâneos anormais que podem levar à dor crônica. A expressão canais de sódio voltagem-dependente tem se mostrado altamente dinâmica em ambos os modelos de dor neuropática e inflamatória. A modulação destes canais em tecido dos gânglios da raiz dorsal pode apresentar uma oportunidade terapêutica para a manipulação seletiva dos neurônios sensoriais primários (Waxman & Dib-Hajj, 2005).

Neurônios sensoriais são especializados em detectar estímulos intensos e representam a primeira linha de defesa contra quaisquer entradas ambientais, potencialmente ameaçadoras ou prejudiciais. Ao sentir estímulos nocivos os neurônios sensoriais geram as reações necessárias para evitar o dano, produzindo assim uma sensação desagradável ou intensamente dolorosa, dessa forma os nociceptores são essenciais para a manutenção da integridade do corpo (Pezet; McMahon, 2006).

2.6 Biologia Molecular

A Biologia Molecular é o estudo da Biologia em nível molecular, com especial foco no estudo da estrutura e função do material genético e seus produtos de expressão, as proteínas, sendo possível a análise dos canais de sódio e suas alterações de expressividade. Mais concretamente, a Biologia Molecular investiga as interações entre os diversos sistemas celulares, incluindo a relação entre ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA) e síntese proteica (Astbury, 1961).

2.6.1 Síndrome de Ardência Bucal e a biologia molecular

Recentes avanços na etiologia, fisiopatologia e condução da SAB, incentivaram os estudos a encontrar biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da SAB, a fim de elucidar as queixas frequentes de alteração de paladar e boca seca. Granot e Nagler, (2005), buscaram através da biologia molecular procurar alterações na composição salivar dos portadores de SAB. A análise revelou que um elevado limiar sensorial quente foi associado com níveis salivares mais elevados de concentrações de K^+ e Cl^- nas pacientes com SAB, estes resultados podem ser atribuídos a uma pequena fibra neuropática idiopática regional, afetando a sensação oral e secreção salivar em SAB.

Kim et al. (2012) investigaram os níveis do cortisol salivar, 17β -estradiol, progesterona, dehidroepiandrosterona (DHEA) e α -amilase salivar nos pacientes com SAB, comparado com controle. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de cortisol em fluxo salivar não estimulado e de 17β -estradiol em fluxo salivar estimulado. No entanto não foram apresentadas correlações entre a eficácia do tratamento e análises dos níveis salivares.

Em 2015, o estudo realizado por De Souza et al. investigou a associação entre biomarcadores salivares e traços de personalidade em pacientes portadores de SAB. Todos os indivíduos foram avaliados com uma entrevista psiquiátrica estruturada (*Mini Internacional Entrevista Neuropsychiatric*) e o inventário *Big Five*. A análise incluiu os níveis salivares de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento neural, fator de necrose tumoral- α , IL-6, IL-10 e de cortisol. Os pacientes com SAB exibiram mais traços de neuroticismo (ansiedade/depressão); os biomarcadores salivares nos pacientes com SAB mostraram um aumento na proteína total ($p = 0,05$) e IL-6 ($p = 0,042$), e uma diminuição do TNF- α ($p = 0,046$) em comparação com os controles.

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) é produzido tanto no sistema nervoso periférico, quanto no sistema nervoso central, sendo este um potente peptídeo vasodilatador podendo atuar na transmissão da dor. No sistema trigeminal vascular, o gânglio do trigêmio é a principal fonte de CGRP (Brain, 1985).

Zidverc-Trajkovic et al. (2009), compactuaram com a premissa da degeneração das fibras nervosas nos pacientes de SAB, pois encontraram o nível do

CGRP diminuído em saliva de pacientes com SAB quando comparados ao grupo controle. O CGRP modula a transmissão nociceptiva no sistema trigeminovascular.

O receptor de taquikina 1 (TACR1), também conhecido como receptor de neuroquinina 1 (NK1R) ou receptor de substância P (SPR), é uma proteína G, acoplado a um receptor sendo encontrada no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico. O ligante endógeno a esse receptor é a substância P, embora este também tenha afinidade por outras taquikinas. A proteína é produto do gene TACR1 (Takeda et al., 1991). A substância P é liberada nas terminações nervosas sensoriais específicas, sendo esta associada ao processo inflamatório e de dor. A substância P está fortemente correlacionada a neuroquinina A (Campbell et al., 2011).

Neuropeptídeos como SP, neuroquinina A (NKA) e o CGRP, foram avaliados no soro e saliva de pacientes com SAB, comparado com controles. Não houve diferença estatisticamente significativa na saliva em nenhum dos três neuropeptídeos, mas no soro, a NKA apresentou-se significativamente diminuída em pacientes SAB, sugerindo uma deficiência no sistema dopaminérgico (Boras et al., 2010).

A inflamação neurogênica deve ser considerada como um mecanismo de proteção à integridade do tecido. Entretanto, se prolongado, o estímulo nocivo pode gerar uma ostensiva resposta inflamatória. O principal mediador da inflamação neurogênica é o CGRP junto com a SP, entre outros peptídeos (Scardina et al., 2007).

Ainda no campo da biologia molecular, Guimarães et al. (2006), encontraram evidências de polimorfismo genético associado à IL-1 β em pacientes com SAB, quando coletaram amostras da mucosa oral com swab. A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória, tem papel importante no desencadeamento do estímulo da dor, além de também exercer algum papel no sintoma de depressão. Já quando avaliado os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em coletas de saliva, não foram encontrados dados estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle (Suh et al., 2009).

Em 2010 (a), Beneng et al., encontraram imunorreatividade aumentada do receptor P2X₃ em fibras nervosas linguais de pacientes com SAB. Receptores P2X pertencem a uma grande família de receptores purinérgicos. Seis dos sete receptores da família P2X são localizados em neurônios sensoriais primários e estudos prévios mostram a presença de canais P2X no nervo trigêmeo (Collo et al., 1996; Kidd et al.,

1995). Este receptor pode desempenhar papel importante no desenvolvimento da dor neuropática, incluindo dor orofacial.

Um estudo piloto, avaliando neuropeptídeos em saliva de pacientes com SAB, mostrou níveis de fatores de crescimento neural (NGF) e triptase aumentados e o nível de Substância P diminuída quando comparados a pacientes controles. Estes dados suportaram mais uma vez a origem neurogênica da SAB e embora valores de substância P estivessem diminuídos, os autores sugerem que este neuropeptídeo tenha um papel distinto na SAB, quando comparado a outras condições dolorosas crônicas (Borelli et al., 2010).

Hiperalgesia a estímulos mecânicos, ao calor e ao frio, é mediado por transdução em fibras C amielínicas, de pequeno diâmetro e fibras A δ mielinizadas, de diâmetro médio. Inflamação e disfunção de inervação periférica têm sido associadas com o aumento da excitabilidade de nociceptores, como resultado de alterações na condução iônica celular (Levine; Alessandri-Haber, 2007).

O receptor potencial transitório (TRP) é um grupo de canais catiônicos de voltagem independente, expresso em células de mamíferos. Estes estão fortemente ligados a neuropatias e inflamação periférica. Quatro destes receptores são ativados por calor (TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4) e 2 ativados a frio (TRPM8 e TRPA1). O TRPV1, também é conhecido como receptor de capsaicina, sendo bastante estudado na hiperalgesia térmica. Em SAB já foi demonstrado o aumento da expressão de TRPV1 quando comparado a pacientes controles, quando analisado através de biópsias de língua (Yilmaz et al., 2007).

Beneng et al. (2010b) estudou os níveis de Nav1.7 na pulpíte que é uma condição inflamatória, e na SAB, conhecida como dor neuropática, para isso dois grupos de pacientes foram recrutados, um grupo consistia de pacientes com pulpíte e outro com pacientes portadores de SAB, sendo que em ambos os grupos possuíam pacientes saudáveis como grupos controles. Houve um aumento significativo da pontuação de intensidade visual para Nav1.7 nas fibras nervosas na pulpíte em comparação aos controles. Fibras imunorreativas Nav1.7 foram vistas em abundância na camada sub-mucosa de biópsias de língua, mas não houve nenhuma diferença significativa entre e SAB controles. Dessa forma concluiu-se que o canal de sódio Nav 1.7 pode desempenhar um papel significativo na pulpíte, sendo que em SAB esse

canal de sódio não apresentou relevância comprovada por este estudo, apenas uma tendência ao aumento da expressividade de Nav 1.7 em SAB.

2.7 Canal de Sódio Voltagem Dependente

O canal de sódio é uma glicoproteína de membrana que se encontra principalmente em axônios e músculo, e é ativada pela despolarização da membrana abrindo seu poro central e permitindo a entrada de sódio, o que leva à propagação do estímulo nervoso; é seletiva ao íon sódio sendo que a passagem de K^+ equivale a cerca de 8% de Na^+ (Araújo et al., 2008).

Dentre os canais voltagem dependentes, o canal de sódio é o mais estudado. A presença dessa proteína determina a especialização funcional de muitos tipos de células, como neurônios sensoriais e células cardíacas, principalmente em processos fisiológicos, como dor, inflamação e contratilidade. A via mais eficaz para correlacionar a expressão de canais de sódio voltagem-dependentes com as características biofísicas de células excitáveis é determinar propriedades como velocidade de condução do potencial de ação e influxo de sódio, o que tem auxiliado cada vez mais no entendimento de seu mecanismo de ação, bem como de agentes que agem sobre o canal como anestésicos locais e toxinas (Lai et al., 2004).

Os conhecimentos sobre os canais que estão envolvidos na fisiopatologia da dor e quais canais específicos desempenham um papel específico nos subtipos de dor como, por exemplo, na dor neuropática e a inflamatória, expandiram-se consideravelmente nos últimos anos. Estes conhecimentos permitiram estipular quais canais estão envolvidos no processo da dor neuropática, sendo esta modulada por um subconjunto de canais de sódio dependentes da voltagem, especificamente Nav 1.3, Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9 (Rogers et al., 2006).

Na figura 2.5, Rogers et al. (2006) realizou um breve resumo com as principais características da família Nav. Pode-se observar que Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 estão presentes no gânglio da raiz dorsal, ou seja são capazes de captar e responder a estímulos dolorosos.

Classification of Sodium Channel α -Subunits						
Name	Further Names	Gene	TTX Sensitive?	Localisation	Inactivation Rate	Disease link
Nav1.1	Type 1	<i>SCN1A</i>	Yes	CNS, DRG	Fast	Epilepsy
Nav1.2	Type 2	<i>SCN2A2</i>	Yes	CNS	Fast	Epilepsy
Nav1.3	Type 3	<i>SCN3A</i>	Yes	Embryonic CNS, injured DRG	Fast	Ectopic discharge in neuropathic pain
Nav1.4	Skm1	<i>SCN4A</i>	Yes	Skeletal muscle	Fast	Contractility problems
Nav1.5	H1, Skm2	<i>SCN5A</i>	Moderate	Heart, embryonic CNS	Slow	Cardiac arrhythmias
Nav1.6	PN4, CerIII	<i>SCN8A</i>	Yes	DRG, motor neurons	Fast	Neurological dysfunction
Nav1.7	PN1, hNe, NaS	<i>SCN9A</i>	Yes	DRG, low levels in CNS	Fast	Peripheral transmission
Nav1.8	PN3, SNS	<i>SCN10A</i>	No	DRG	Slow	Sensory hypersensitivity
Nav1.9	PN5, NaN, SNS-2	<i>SCN11A</i>	No	DRG, low levels in hippocampus	Slow	Modulates resting potential in DRG, linked to hyperalgesia

Figura 2.5 - Classificação dos canais de sódio α -subunidades (Rogers et al., 2006. p.572)

DRG - Gânglio da raiz dorsal

CNS - Sistema nervoso central

Após realizar um compilado de estudos, Brouwer et al. (2014), encontrou diversas mutações nos genes *SCN9A*, *SCN10A* e *SCN11A*, que são responsáveis por codificar os canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9; o que pode levar à dor neuropática.

Cada tecido do corpo possui uma determinada expressão dos canais de sódio, estas podem se encontrar aumentadas, diminuídas ou não expressas. Raymond et al. (2004) realizou um resumo em forma de tabela demonstrando a presença dos diversos genes responsáveis pela decodificação dos canais de sódio voltagem dependentes em macacos ilustrado na figura 2.6; a parte de interesse neste estudo (língua) foi ressaltada, permitindo observar a baixa expressividade dos genes *SCN9A*, *SCN10A*, e *SCN11A*.

Figura 2.6 - Canais de sódio presentes em diferentes tecidos de origem animal (macaco) Raymond et al., 2004. p.46236.

2.7.1 Canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9

Canais de sódio voltagem dependentes desempenham um papel essencial na regulação da excitabilidade dos neurônios aferentes primários nociceptivos (Strickland et al., 2008).

Significativamente, o canal de Nav1.7 tem sido localizada para terminações sensoriais, de tal modo que tanto a sua distribuição e a fisiologia podem predispor a um papel importante na transmissão de estímulos dolorosos (Rogers et al., 2006).

Relatórios descrevem um aumento da expressão de Nav 1.7 e Nav 1.8 em neurônios de ratos em modelos de dor neuropática e inflamatória crônica (Amir et al., 2006), levando a um aumento da excitabilidade neuronal.

Dutta e Roy, em 2014, afirmaram que a estrutura e função da via da dor humana é complexa. A transmissão do estímulo doloroso e seu processamento envolvem diferentes canais iônicos, receptores, e vários mediadores químicos. A presença de canais de sódio Nav 1.7 e Nav 1.8 são importantes vias nociceptivas para transmissão dos estímulos dolorosos.

A sinalização da dor neuropática começa com a queima exacerbada de potenciais de ação em axônios danificados. O início da propagação desses potenciais de ação normalmente requer a abertura de canais de sódio voltagem-dependentes (Nav 1.x), pelo fato de que eles podem inibir a ação potencial de disparo, Nav 1.x bloqueadores têm sido investigados como tratamentos para a dor neuropática. Alguns bloqueadores tais como a lidocaína e a carbamazepina, demonstraram eficácia pré-clínica e / ou clínica no tratamento da dor neuropática, proporcionando assim a validação para esta abordagem (Hoyt et al., 2007).

Cox et al. (2006) demonstrou que a presença de mutações no gene da SCN9A que codifica a subunidade alfa da Nav 1.7 do canal de sódio, geram uma indiferença congênita na dor.

Os seres humanos que apresentam perda de função ou possuem mutações no canal de sódio Nav 1.7, são indiferentes à dor, fazendo dessa forma que Nav 1.7 torne-se um alvo promissor para o desenvolvimento de analgésicos (Jukic et al., 2014).

Ao estudar a dor neuropática em gânglio dorsal de rato, foi possível encontrar evidência direta ligando o Nav 1.8 a dor neuropática. Como expressão Nav 1.8 é restrita a neurônios sensoriais, este canal oferece um alvo molecular específico e altamente eficaz para o tratamento de dor neuropática (Lai et al., 2002).

Houve uma correlação positiva entre o nível de expressão do Nav 1.8 e o grau de formigamento relatado pelos pacientes, o que sugere que este canal de sódio pode ter um papel importante no desenvolvimento e / ou manutenção da dor neuropática. No entanto, dados indicam que níveis elevados de Nav 1.9 podem não desempenhar

um papel significativo na geração e manutenção da dor neuropática produzida através da lesão do nervo lingual (Bird et al., 2013).

Liu et al. (2012), provocaram a dor neuropática através da constrição crônica do nervo ciático em ratos. Os testes comportamentais demonstraram que os limiares para hiperalgesia térmica e mecânica foram significativamente reduzidos em ratos de dor neuropática 3-28 dias após a indução modelo. Os resultados de ensaios de imunistoquímica, *Western Blot* e Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) mostrou que o Nav 1.7 proteína e a expressão de RNA mensageiro foram significativamente aumentados em gânglios da raiz dorsal que foram feridos. Estes resultados indicaram que o Nav 1.7 pode desempenhar um papel importante no modelo de dor neuropática crônica.

Em uma amostra constituída de 345 pacientes com neuropatia periférica, que não possuíam mutações em Nav 1.7 e Nav 1.8, foram identificadas oito mutações de SCN11A (canal de sódio gene que codifica Nav 1.9) em 12 indivíduos concluindo dessa forma que mutações em Nav 1.9 podem causar neuropatia periférica (Huang et al., 2014).

Um estudo realizado em pacientes previamente selecionados com dor neuropática, utilizou como material de análise biópsias em pele, resultando na confirmação de mutações genéticas em 8 de 28 pacientes da amostra (28,6%) no gene SCN9A responsável por codificar o canal de sódio Nav 1.7, que está presente dentro de fibras nervosas periféricas pequenas (Faber et al., 2012).

A distribuição de Nav 1.8 reflete essencialmente a presença de canais funcionais em axônios sem mielina sendo seu aumento marcante ao longo do nervo ciático com dor neuropática (Gold et al., 2003).

Resultados de estudos com animais são menos consistentes em relação as possíveis contribuições de isoformas de canais de sódio específicas para dor neuropática que os vistos na dor inflamatória. Os resultados avaliados em alguns estudos pelo autor Levinson et al. (2012), não demonstraram nenhum efeito sobre a dor neuropática para Nav 1.3, 1.7, 1.8, 1.9 em camundongos *knock-out*, enquanto o uso de técnicas não *knock-down* mostraram resultados de efeitos positivos para Nav 1.8 e nenhum efeito para Nav 1.9.

O estudo realizado por Nassar et al. (2005), confirmaram que o canal de sódio subunidades α - Nav1.7 e α - Nav 1.8, foram expressos seletivamente em neurônios

sensoriais nociceptivos, tendo papéis importantes na nocicepção e na dor. O estudo defendeu a importância desses canais na dor inflamatória, porém não presente na dor neuropática.

Nav 1.8 é um canal de sódio regulado pela voltagem tetrodotoxina-resistente (VGSC) que é altamente expressa em neurônios sensoriais de diâmetro pequeno. Ele tem sido implicado na patofisiologia da dor inflamatória e neuropática, é previsto que o bloqueio seletivo de Nav 1.8 seja analgésico. Foi descrito no estudo de Scanio et al. (2010) a preparação e caracterização de uma série de 6-aril-2-pyrazinecarboxamides, que são potentes bloqueadores do canal Nav 1.8 em humano e também bloqueiam as correntes de sódio TTX e em gânglios da raiz dorsal de rato.

Os canais Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 são encontrados também em inflamação crônica, tendo diversos estudos avaliando sua expressividade aumentada, portanto, esses canais de sódio são amplamente investigados em dores neuropáticas e dor de origem inflamatória crônica.

A falta de um protocolo terapêutico completamente satisfatório tem sua justificativa baseada no desconhecimento da real etiopatogenia da condição. A aparente etiologia neuropática da SAB, suportada pelas pesquisas anteriormente citadas, foi motivo pela busca de esclarecimentos dos mecanismos causadores da sintomatologia por meio das técnicas e procedimentos oferecidos pela biologia molecular. Grande parte das pesquisas nesse campo, especificamente atreladas à SAB, utilizou como substrato de análise saliva e soro dos pacientes. Poucos trabalhos utilizaram tecido, que parece propiciar resultados mais precisos neste campo.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo primário

Visando comparar as populações estudadas e contribuir com o esclarecimento da etiopatogenia da Síndrome de Ardência Bucal, o objetivo da dissertação foi estudar a expressão dos genes codificadores de canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 por RT-PCR em tempo real, comparando pacientes com SAB a indivíduos controle sadios.

3.2 Objetivo secundário

Levantamento de dados da amostra com Síndrome de Ardência Bucal como sexo, idade, doenças sistêmicas, utilização de medicamentos, duração dos sintomas e resposta às terapias empregadas.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

A casuística foi composta por pacientes diagnosticados com SAB, sintomatologia restrita na língua e pacientes clinicamente saudáveis. Os pacientes foram examinados no ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e incluídos no estudo no período de janeiro de 2013 a abril de 2015, sendo que os pacientes com SAB foram diagnosticados segundo os critérios estabelecidos pela *International Headache Society* de 2013.¹

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP na data de 8 de fevereiro de 2012 sob o número de protocolo 137/11 (Anexo A). A participação dos pacientes ocorreu mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

4.2 Desenho do Estudo

O tipo de desenho do estudo selecionado para esta investigação foi do tipo caso-controle. Desta forma os indivíduos foram incluídos em dois grupos: grupo caso, indivíduos que apresentavam SAB; e grupo controle, indivíduos não portadores de SAB e/ou outras neuropatias que apresentavam outra patologia benigna em língua, pareados ao grupo caso por sexo e idade.

¹ Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society (IHS). The international classification of headache disorders. 3rd ed. *Cephalalgia*. 2013;**33**:629–808.

4.2.1 Critérios de inclusão do grupo caso

A inclusão dos pacientes neste grupo foi baseada na expressão de sintomatologia condizente com o diagnóstico da SAB, ou seja, presença do sintoma de ardência diária por período superior a quatro meses, ausência de alterações clínicas nos tecidos acometidos e a exclusão de alterações locais e sistêmicas relacionadas com a sintomatologia de ardência em boca, tais como: candidose, xerostomia/hipossalivação, anemia, deficiência nutricional e diabetes mellitus.²

Desta forma, os pacientes que apresentaram queixa de ardência bucal foram submetidos a anamnese, exame clínico (Anexo C) e exames hematológicos (hemograma completo, glicemia em jejum, dosagem sérica de ferro, ferritina, ácido fólico e vitamina B12) foram solicitados para excluir presença de anemia, deficiência nutricional e diabetes mellitus, visto que estas alterações sistêmicas podem confundir o diagnóstico da SAB.

Em relação as alterações locais, para a exclusão da candidose, além do critério clínico onde é possível visualizar placas brancas que sedem a raspagem e áreas eritematosas, foi realizada a citologia esfoliativa para pesquisar a presença de fungos.

A avaliação do fluxo salivar para investigação de hipossalivação consistiu na mensuração do fluxo salivar não estimulado. Cada paciente foi instruído a eliminar o conteúdo salivar em uma proveta com auxílio de funil, após descarte inicial da saliva contida na boca, durante 15 minutos em um ambiente reservado e sem interferências. A saliva coletada foi mensurada em ml/min e valores abaixo de 0,01 ml/min foram consideradas como hipossalivação.

² Estes critérios foram estabelecidos pela *International Headache Society* em 2013.

4.2.2 Critérios de inclusão do grupo controle

Foram incluídos no grupo controle, pacientes não portadores da Síndrome de Ardência Bucal ou outras neuropatias, pareados por sexo e idade ao grupo caso, que necessitavam de cirurgias para remoções de lesões proliferativas benignas em língua.

4.2.3 Critérios de exclusão de ambos os grupos

Foram excluídos pacientes menores de 18 anos de idade ou diagnosticados com Neoplasia Maligna de cabeça e pescoço, sob tratamento ou história de quimioterapia e radioterapia, grávidas, portadores de Doenças Sistêmicas como diabetes, hipovitaminoses e anemia, pacientes sob tratamento de Síndrome de Ardência Bucal; pacientes que não apresentavam ardência em língua ou em outros sítios orais, pacientes com hipossalivação ou síndrome de Sjögren.

Pacientes portadores de limitações que impediram a compreensão e concordância com o TCLE também não foram incluídos na pesquisa. Assim como, pacientes portadores de candidose oral ou outra lesão em mucosa oral, como por exemplo glossite migratória benigna, com sintomatologia de ardor bucal receberam tratamento ou orientação pertinente no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP

4.3 Método de Coleta e Processamento das Amostras

Após seleção dos pacientes de ambos os grupos, segundo os critérios de inclusão e exclusão acima mencionados, foi realizado o preenchimento de ficha clínica do protocolo da pesquisa (Anexo C).

As amostras analisadas foram coletadas da língua, por meio de biópsia, realizada com *punch* de 3mm. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no período matutino, sob condições ideais de assepsia e biossegurança, segundo protocolo do Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP. A técnica anestésica local preservou a área de tecido removida para análise.

Os pacientes do **grupo caso** foram submetidos à biópsia de dorso de língua em região afetada pelo sintoma de ardência bucal, utilizando-se *punch* de 3mm de diâmetro e profundidade aproximada de 3mm (Figura 4.1). Os pacientes do **grupo controle** foram submetidos à remoção de fragmento de dorso de língua clinicamente saudável, também se utilizando *punch* de 3mm de diâmetro e profundidade de 3mm, após a excisão da lesão pela qual o paciente procurou por diagnóstico e tratamento.

Figura 4.1 – Imagem ilustrativa da biópsia com *Punch* para coleta da amostra de tecido a ser analisada (Borsani et al., 2014. p.526)

Cada paciente teve duas amostras de tecido coletadas, a primeira foi armazenada em formol para posterior análise histológica e emissão do laudo histopatológico e a segunda amostra foram acondicionadas em criotubos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente foram armazenadas em *freezer* a -80°C até a execução dos procedimentos de extração e análise laboratoriais (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Amostras coletadas permaneceram congeladas em *freezer* a -80°C

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular (LPM) da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP sob responsabilidade do Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes.

Para mensurar a quantidade de reagentes e componentes líquidos a serem inseridos em cada etapa do processo, foram utilizadas pipetas, exclusivas para a manipulação de *RNA*, devidamente calibradas (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Pipetas utilizadas para mensuração volumétrica dos reagentes líquidos em todos os procedimentos laboratoriais

4.3.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio e precipitação alcoólica já padronizado no LPM, utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen Corporation, Life Technologies – Califórnia, EUA), uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento do RNA de células e tecidos.

Cada amostra congelada foi completamente macerada em nitrogênio líquido, com o auxílio de um gral e pistilo, mantidos dentro de uma caixa de isopor (Figura 4.4) até a visualização de um pó branco (Fig 4.5A), sem permitir o descongelamento e a consequente degradação do RNA. Em seguida, acrescentou-se 500 µL de TRIzol ao material que foi novamente macerado até a visualização de um pó rosa (Figura 4.5 B).

Figura 4.4 - Ilustração do nitrogênio líquido sendo dispensado na caixa de isopor, evitando o descongelamento da amostra durante o processo de maceração

Figura 4.5 - A: maceração em nitrogênio líquido do fragmento de tecido, B: aspecto após maceração e adição do reagente Trizol (Gallo, 2011. p.65)

O material macerado foi transferido para microtubos de 2.0 mL contendo 500 μ L de TRIzol, e as amostras foram homogenizadas e incubadas em temperatura ambiente até seu descongelamento completo. Em seguida, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil) e o microtubo (Axygen Scientific – Califórnia, EUA) devidamente selado foi vigorosamente agitado durante 30 s para a mistura das soluções sendo acondicionado a -20°C durante 5 min. Os tubos foram, então, centrifugados na centrífuga Eppendorf modelo 5810R – Hamburg, Alemanha, (Figura 4.6) a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C . Após a centrifugação, observava-se a formação de três fases, a fase aquosa (transparente) foi transferida para outro microtubo e a ela acrescentou-se 500 μ L de álcool isopropílico (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil); após homogeneização foi armazenada a -20°C durante 1h.

Em seguida os tubos foram submetidos a nova centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C , verificando-se então a presença do precipitado de RNA no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e este precipitado lavado por inversão com 1 mL de etanol 75% (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil) e novamente centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a secagem, deixando-se os microtubos abertos por no máximo 10 min. Em seguida, acrescentou-se 30 μ L de água ultrapura (RNase-Free water, QIAGEN – Venlo, Holanda).

Figura 4.6 - Centrífuga Eppendorf modelo 5810R utilizada nos experimentos

4.3.2 Quantificação do RNA e verificação de sua qualidade

A pureza das amostras de RNA extraídas foi avaliada e quantificada no NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific – Massachusetts, EUA, (Figura 4.7) pelas leituras das absorbâncias do ácido ribonucléico (RNA), e de proteínas e outros contaminantes.

Figura 4.7- Equipamento NanoDrop 2000 utilizado na quantificação e avaliação da qualidade das amostras de RNA extraído e purificado

A integridade do RNA foi verificada em gel denaturante de agarose (1%) corado com brometo de etídio, verificando-se a presença das bandas 28s e 18s, correspondentes ao RNA ribossômico que deveriam se apresentar nítidas e intensas numa relação de 2:1. A figura 4.8 ilustra o gel de integridade onde é possível visualizar as bandas coradas.

Figura 4.8 - Gel de integridade demonstrando a integridade do RNA nas amostras A11, A12, C9, A17 e C11.

4.3.3 Eliminação do DNA genômico e purificação do RNA

Previamente à síntese do DNA complementar para a realização da RT-PCR em tempo real, é indicado o tratamento da amostra de RNA total em duas etapas. A primeira etapa consiste na digestão da amostra de RNA total com a enzima DNase (RNase-Free DNase Set, QIAGEN – Venlo, Holanda), conferindo resultados mais confiáveis, uma vez que a amplificação pela PCR será apenas do DNA complementar sintetizado a partir do RNA, refletindo a expressão do gene (RNA mensageiro) e não do gene constitutivamente presente no DNA das células humanas (DNA genômico).

A segunda etapa corresponde à purificação do RNA (RNeasy MinElute Cleanup Kit, QIAGEN – Venlo, Holanda), eliminando eficientemente os contaminantes proporcionando uma amostra de RNA de alta qualidade e concentrado, levando a resultados da PCR mais fidedignos. Os dois processamentos descritos foram

realizados de acordo com as indicações do fabricante para uma quantidade máxima de 45µg de RNA total extraído.

Para a digestão com DNase (RNase-Free DNase Set, QIAGEN – Venlo, Holanda) acrescentou-se a 45 µg de RNA de cada amostra, 10 µL do tampão da reação (RDD buffer) e 2,5 µL da enzima DNase (DNase I RNase-Free) num volume final de 100 µL. Esta mistura foi acondicionada à temperatura ambiente por 10 min para permitir a ação da enzima de degradação do DNA.

Em seguida as amostras foram diretamente submetidas à purificação do RNA (RNeasy MinElute Clean-up Kit, QIAGEN – Venlo, Holanda). Para os 100 µL de RNA obtidos na etapa anterior foram adicionados 350 µL do tampão RLT (RLT buffer) e 250 µL de etanol absoluto (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil). Esta mistura foi transferida a uma coluna para RNA (RNeasy MinElute Spin Columns) e centrifugada a 10.000 rpm por 15 s à temperatura ambiente.

O filtrado obtido após a centrifugação foi adequadamente descartado (pois contém tiocianato de guanidina) e a coluna para RNA foi adaptada num novo tudo coletor (Collection tubes), 500 µL de tampão RPE (RPE buffer) foi depositado sobre a membrana da coluna e a coluna foi submetida à nova centrifugação a 10.000 rpm por 15s à temperatura ambiente. O filtrado foi novamente descartado e para a lavagem do RNA foi acrescentado a coluna 500 µL de etanol 80% (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil) e novamente a coluna foi submetida a centrifugação a 10.000 rpm por 2 min à temperatura ambiente (Figura 4.9).

Figura 4.9 - Conjunto de reagentes utilizado para purificação e eliminação do DNA genômico (RNeasy MinElute Clean-up Kit, QIAGEN)

Após este passo a coluna foi inserida num novo tubo coletor e centrifugada com as tampas abertas a 10.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente, para a secagem da membrana da coluna que contém o RNA, eliminando completamente o etanol (pois interfere nas reações subsequentes). Assim, a coluna foi inserida num microtubo de 1,5 mL e 15 µL de água livre de RNase (RNase-Free water, QIAGEN – Venlo, Holanda) foi depositada sobre o centro da membrana e o conjunto centrifugado por 1 min na velocidade máxima, resultando num de RNA limpo e concentrado, que foi novamente quantificado por meio do uso do NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific– Massachusetts, EUA) (Figura 4.7).

4.3.4 Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada com o conjunto de reagentes High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies – Califórnia, EUA) partindo de 1 mg de RNA tratado com DNase e purificado (Figura 4.10).

Figura 4.10 - Conjunto de reagentes utilizados para a reação de transcrição reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems)³

³ Foto extraída da página: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814>

O RNA foi combinado a 1 µL de RNase OUT (Invitrogen, Life Technologies – Califórnia, EUA), 2 µL de 10x RT Buffer, 0,8 µL de dNTP MIX (100mM), 2 µL de 10x RT Random Primer, 1 µL de Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), num volume final de 20 µL. Em seguida, as amostras foram acondicionadas na termocicladora Eppendorf Mastercycler – Hamburg, Alemanha (Figura 4.11) e submetidas aos seguintes ciclos de temperaturas: 10 min a 25°C (incubação), 120 min a 37°C (reação de RT) e 5 min a 85°C (inativação da enzima de RT) para a síntese do cDNA.

Figura 4.11 - Termocicladora *Eppendorf Mastercycler* utilizada para a reação de transcrição reversa

4.3.5 RT-PCR em tempo real

Esta metodologia combinou amplificação e detecção simultaneamente, isto é, a fluorescência emitida foi mensurada em tempo real à medida que os produtos oriundos da combinação das amostras e dos primers, foram originados no decorrer da reação. Durante toda a reação, uma curva foi gerada de acordo com a concentração do produto sintetizado e em função do número de ciclos. Nesta curva pode-se observar a quantificação do número de moléculas produzidas.⁴

⁴ http://www.ufrgs.br/labvir/material/CBS6008/PCR_em_tempo_real.pdf

Tabela 4.1 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Nome do oligonucleotídeo	Temperatura	Gene Bank	Sequência	Tamanho do produto de PCR
Nav1.7-F	58°C	NM_002977.3	AATCAGTCACCACTCAGCATT	161pb
Nav1.7-R	58°C	NM_002977.3	CCCCTTCTGCTCTCATTGTC	161pb
Nav1.8-F	61°C	NM_006514.3	TGGCAGATGACCTGGAAGAACC	135pb
Nav1.8-R	61°C	NM_006514.3	CGATACGGTAGCAAGTCTTGCG	135pb
Nav1.9-F	58 °C	NM_001287223.1	CCCAGCAGCTGTAAAGGAG	242pb
Nav1.9-R	58 °C	NM_001287223.1	ATTCTGGGACAGTCGTTTGG Senso: GCATCCTGGGCTACACTGA Anti-senso:	242pb
GAPDH	59 °C	NM_002046	CCACCACCCTGTTGCTGTA	162pb

Pb: pares de bases

4.3.5.1 Iniciadores

As sequências dos iniciadores para a reação de PCR em tempo real foram desenhadas na base de dados Primer-Blast, disponível na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), para os canais de sódio Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 e para o gene constitutivo Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Sendo que as sequências de iniciadores deveriam englobar, em ao menos uma delas (senso ou antissenso), regiões de dois éxons diferentes, garantindo a amplificação apenas do RNA mensageiro. Além de apresentar temperatura de associação entre 58 e 62°C, porcentagem G-C de até 40%, produtos de PCR entre 100 e 200 pares de bases e baixa formação de estruturas secundárias. Na tabela 4.1 pode ser observado as especificações dos iniciadores utilizados.

Após a amplificação por RT-PCR em tempo real, curvas de dissociação foram analisadas para verificação da especificidade da reação, garantindo a confiabilidade dos resultados.

4.3.5.2 Reação de PCR

As reações foram realizadas em duplicata visando a minimização dos erros de pipetagem, críticos neste tipo de experimento. Desta forma, para cada tubo óptico de 0,2 mL, específico para RT-PCR em tempo real, acrescentou-se a cada 0,5 μ L de cDNA, 5 μ L de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies – Califórnia, EUA) e 0,4 μ L de cada iniciador (400nM), num volume final de 10 μ L.

A amplificação em tempo real foi realizada através do aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies – Califórnia, EUA) (Figura 4.12).

As condições de ciclagem consistiram em ciclos de 2 min a 50°C (incubação) e 10 min a 95°C (ativação da enzima Taq polimerase), seguidos de 40 ciclos, cada um com duas fases: 15s a 95°C (desnaturação) e 60s a 60°C (hibridização/extensão-deteção).

Além das curvas de amplificação, foram realizadas as curvas de dissociação para verificar a especificidade da amplificação, confirmando a ausência da formação de dímeros de primer ou qualquer outro produto inespecífico, garantindo a confiabilidade dos resultados. Os dados foram normalizados com base na expressão do gene constitutivo (GAPDH). E analisados através do programa 7500 Software v2.0.6

Figura 4.12 -Equipamento de RT-PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems)

4.4 Análise dos Resultados

A expressividade dos receptores analisados foi avaliada nos indivíduos portadores de SAB em relação aos controles e calculada a partir da normalização dos dados da quantificação com base na expressão do gene constitutivo, pelo método de Threshold Cycle (CT) comparativo a partir da quantificação relativa ou $2^{-\Delta\Delta CT}$. Neste método, são comparados os valores de CT, ou seja, do número do ciclo em que a fluorescência gerada na reação atinge o limiar de amplificação exponencial (threshold). E comparada estatisticamente, através do teste estatístico Mann-Whitney (programa BioEstat 5.0, Manuel Ayres, 2007 – Pará, Brasil).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do Grupo Caso (Pacientes com SAB)

A casuística foi constituída por 12 pacientes diagnosticados com SAB no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOUSP. Todos os pacientes incluídos no grupo caso foram do gênero feminino, com idade entre 48-71 anos e média de idade de 61,18 anos.

Os resultados da citologia esfoliativa, avaliados pelo Laboratório de Patologia Bucal da FOUSP, foram negativos para a presença de hifas e receberam a classificação I ou II de Papanicolau para todos os casos de SAB incluídos neste estudo.

Nenhum dos pacientes com SAB incluído no estudo apresentou discrasias sanguíneas ou deficiências nutricionais, visto que os exames solicitados se apresentavam dentro da faixa de normalidade.

Todas negaram o hábito de tabagismo e etilismo, duas pacientes eram usuárias de prótese total sendo uma bi-maxilar e a outra paciente prótese total superior.

Das 12 pacientes com SAB avaliadas, 9 referiam sintomatologia de ardência em língua e 3 reportavam esta queixa também em palato, gengiva e lábios. A respeito do tempo de duração da sintomatologia os relatos variaram de 6 meses a 27 anos, conforme demonstrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Sítios acometidos e tempo de duração dos sintomas dos pacientes com SAB da amostra estudada

Fator (amostra)		Paciente n (%)
Localização	Língua	12(100%)
	Lábios	2(16,6%)
	Gengiva	2(16,6%)
	Palato	1(8,3%)
Duração	6 meses à 1 ano	6(50%)
	2 anos à 5 anos	3(25%)
	6 anos à 8 anos	2(16,6%)
	9 anos ou mais	1(8,3%)

Dentre as alterações sistêmicas constatou-se que apenas 2 pacientes não apresentaram doenças sistêmicas, 5 possuíam alterações gastrointestinais (refluxo, azia e hemorroidas), 4 apresentaram distúrbios neurológicos (ansiedade, depressão), 3 pacientes com hipotireoidismo, 3 eram hipertensas, 1 com osteoporose, e 1 com problema cardíaco, como demonstra a Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Doenças sistêmicas relatadas pela amostra de pacientes portadoras de SAB

Doenças sistêmicas	N (%)
Gastrointestinais	5 (41,6)
Neurológicos	4 (33,3)
Hipotireoidismo	3 (25)
Hipertensão	3 (25)
Ósseos	1 (8,3)
Cardíacos	1 (8,3)
Nenhuma	2 (16,6)

Dentre as medicações utilizadas, em associação ou de forma isolada, tem-se que 5 utilizavam inibidores da bomba de prótons, 3 anti-hipertensivos, 3 delas usavam hormônio tireoideanos, 2 antidepressivos, 2 pacientes referiram o uso de ansiolíticos, 1 reposição hormonal com estrogênio e 2 pacientes não utilizavam nenhuma medicação, como demonstra a Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Medicamentos utilizados pelas pacientes portadoras de SAB

Medicamentos	N (%)
Inibidores da bomba de prótons	5 (41,6%)
Anti hipertensivos	3 (25%)
Hormônios tireoideanos	3 (25%)
Antidepressivos	2 (16,6%)
Ansiolíticos	2 (16,6%)
Reposição hormonal (estrogênio)	1 (8,3%)
Nenhum	2 (16,6%)

Após a coleta do material para o estudo as pacientes receberam terapêutica para alívio dos sintomas presentes na SAB como demonstra a Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Terapêutica instituída para tratamento de SAB

Terapêutica	N de pacientes
Capsaicina	5
Laserterapia	4
Homeopatia	3
Clonazepan tópico	2
Não aderiu ao tratamento	2

Dez pacientes receberam terapêutica voltada para SAB, sendo que não foi empregada mais de uma terapia medicamentosa concomitantemente, porém houve pacientes que foram submetidas a mais de uma terapêutica e duas pacientes não aderiram ao tratamento. Os melhores resultados foram obtidos com o uso da capsaicina resultando na redução dos sintomas até níveis aceitáveis de convivência, todavia em 2 casos após o período de 3 meses de tratamento (via tópica 2 vezes ao dia) relataram a perda da eficácia do medicamento.

Cabe ressaltar que o número de pacientes que procuraram o ambulatório devido a queixa de ardência foi frequente. A amostra final com 12 pacientes foi constituída devido à exclusão de pacientes que sentiam ardência somente em regiões distintas da língua como, por exemplo, palato, lábios e gengiva marginal. Também foram excluídos pacientes que relataram ardência devido à presença de candidose, confirmada pelo exame citológico e foram tratados com nistatina 1.000 UI em forma de bochechos durante 10 dias.

Aos pacientes com déficit no exame hematológico foram encaminhados ao médico clínico geral para avaliação e conduta adequada, sendo que esses casos obtiveram resolução do quadro de ardência após a normalização dos níveis séricos sanguíneos, mas não participaram, portanto desse estudo. Pacientes que apresentaram ardor devido a traumas obtiveram a resolução do quadro após remoção/adaptação do agente agressor e aos pacientes com hipossalivação houve a

prescrição de medicações salivares artificiais, assim como orientações para manterem a hidratação da boca.

5.2 Caracterização do Grupo Controle

A casuística foi constituída por 4 pacientes do gênero feminino, com idade entre 48-70 anos e média de idade de 57,25 anos. Dados de doença sistêmica não foram detalhados neste estudo, exceto como critérios de exclusão. Todas as amostras saudáveis coletadas para análise e comparação foram vizinhas as lesões benignas cujos resultados do exame anatomopatológico foram 3 Fibromas e 1 pigmentação melânica na região do dorso da língua.

5.3 Dados Obtidos Através de RT- PCR em Tempo Real

Foram coletadas no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da FOU SP, 12 amostras de pacientes no grupo caso SAB e 4 amostras do grupo controle, pareadas proporcionalmente por sexo e idade. Em relação aos parâmetros de sexo e idade entre os grupos analisados, todas as amostras eram provenientes de pacientes do sexo feminino e em relação à idade, não houve diferença significativa ($P = 0.396$), sendo então estatisticamente pareados.

Realizou-se a extração e purificação do RNA destas amostras, que apresentaram bons níveis de concentração, qualidade e pureza (Tabela 5.5) e, desta forma, foram submetidas à reação de RT-PCR em tempo real, com a exceção da amostra A7 (grupo caso) que foi excluída do estudo por não atingir a qualidade de RNA extraído necessária para o experimento de RT-PCR em tempo real.

Foram consideradas adequadas as amostras cujo resultado das relações A260/A280 e A260/A230 foi superior ao valor 1.8, gerando uma curva com pico único, que demonstra a pureza do RNA extraído, a partir da leitura do Nano Drop.(Figura 5.1)

Figura 5.1 - Curva observada no NanoDrop referente a quantidade de RNA presente na amostra C8

Tabela 5.5 - Resultados da análise espectrofotométrica das amostras de RNA extraídas e selecionadas para a reação de RT-PCR em tempo real analisada no Nanodrop, pré- e pós-purificação das mesmas

Amostra	Sexo	Idade	Pré-purificação				Pós-purificação			
			[C]µg/µl	Rna (µl)	A260/A280	A260/A230	[C]µg/µl	Rna (µl)	A260/A280	A260/A230
A1	F	59	578	17.340	1,79	0,89	361,8	5.427	1,94	1,87
A6	F	66	855,8	25.674	1,76	0,81	1412,8	21.192	2,1	2,09
A9	F	71	876,7	26.301	1,3	0,43	190,5	2.857,50	2,05	1,75
A11	F	68	1090,8	32.724	1,95	1,14	1389,2	20.838	2,06	2,01
A12	F	50	1213,5	36.405	1,99	1,44	1622,2	24.333	2,06	2,09
A13	F	67	1512	45.360	1,45	0,7	420,3	6.304,50	1,97	1,46
A14	F	55	937,4	28.122	1,31	0,4	868,3	13.024,50	2,05	2,01
A15	F	59	762,3	22.869	1,74	0,36	786,9	11.803,50	2,03	2,24
A16	F	48	802,7	24.066	1,82	0,71	715,6	10.734	2,06	2,14
A17	F	65	591,4	17.742	1,82	0,52	1612,3	24.184,50	2,06	2,1
A19	F	65	1124,5	33.735	1,59	0,51	1041,8	15.627	2,08	1,98
C3b	F	58	1352,2	40.566	1,82	1,73	139,6	2.094	1,96	1,49
C4	F	52	664,5	19.935	1,48	0,35	1216,3	18.919,50	2,06	1,95
C8	F	48	1988,2	59.646	1,88	1,01	600,2	9.003	2,06	2,05
C11	F	70	1217,5	36.525	1,81	0,62	627	9.405	2,05	1,86

A partir dos resultados do RT-PCR em tempo real, foi possível observar graficamente as curvas de amplificação dos genes estudados, sendo consideradas adequadas quando apresentavam uma curva de amplificação exponencial seguida de platô, em que o programa 7500 Software v2.0.6 limita o limiar de detecção (*threshold*) em que se inicia a amplificação exponencial. A partir deste limiar são obtidos os valores do ciclo em que cada amostra ultrapassa este (*cycle threshold* – CT), que foram utilizados na análise dos resultados.

Para exemplificar esta análise, na figura 5.2, podemos visualizar a expressão dos genes estudados na amostra A14. O gene constitutivo GAPDH demonstra potente expressividade, com valor de CT de 17,31. Para os outros genes estudados os valores de CT foram 31,58 para o Nav 1.7 e 36,42 para o Nav 1.9 e indeterminado para o Nav 1.8. Quanto maior o valor do CT, menor é a expressão do gene estudado nesta amostra individualmente. Desta forma, para a amostra A14 o GAPDH (curva rosa) é mais expresso que o Nav1.7 (curva azul), seguido do Nav1.9 (curva lilás). A expressão do Nav 1.8 não foi detectada pela leitura da fluorescência no equipamento de RT-PCR em tempo real, o que indica uma expressão muito reduzida ou inexistente deste gene nesta amostra, pois não observamos a curva descrita como adequada e apenas o que se denomina como ruído de fundo (*background*, curva verde).

Figura 5.2 - Curva de amplificação permitindo a comparação entre os genes estudados Nav 1.7, Nav 1.8, Nav 1.9 e GAPDH, na amostra A14 obtidas pelo equipamento de RT-PCR em tempo real

Também foram analisadas as curvas de dissociação dos iniciadores (*melting curve*), sendo considerada adequada quando produzia um pico único como demonstrado na figura 5.3, evidenciando a especificidade da reação.

Figura 5.3 - Curva de dissociação dos iniciadores conferindo especificidade da reação de PCR

Na análise dos dados obtidos pela quantificação relativa avaliados pelo método CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) observa-se o aumento da expressão gênica do Nav 1.7 (*fold-change* = 38.70) e diminuição da expressão gênica do Nav 1.9 (*fold-change* = 0.89), como demonstrado a figura 5.4. Porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão dos genes avaliados (Nav 1.7: $P = 0.117$ e Nav 1.8: $P = 0.397$) entre o grupo caso e controle. O gene Nav 1.8 não foi expresso em nenhuma das amostras analisadas.

Figura 5.4 - Diferença na expressão gênica entre grupo SAB e controle: embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$), observa-se tendência de aumento da expressão do Nav 1.7 e de diminuição do Nav 1.9 de acordo com a análise do método do CT comparativo

5.4 Histologia e Imunoistoquímica

Através das amostras obtidas por biópsias das pacientes portadoras de SAB, foi possível realizar análises microscópicas por meio da técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e Imunoistoquímica S-100.

Todas as amostras coletadas das pacientes com SAB foram armazenadas em formol e submetidas à coloração de HE. A análise dos cortes histológicos revelou fragmentos de mucosas revestidas por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado, com características de normalidade.

Na análise imunoistoquímica foi utilizado o S-100 por ser um marcador de células gliais, Schwann, melanócitos, adipócitos, condrócitos, células de Langerhans e células reticulares interdigitantes.

O S100 foi positivo em todos os cortes na marcação de feixes nervosos, mesmo sendo pouca quantidade. Na figura 5.5 pode-se notar um pequeno feixe nervoso presente na amostra do grupo SAB.

Figura 5.5 - Fragmento de mucosa oral. Imunoistoquímica S100. (A) Feixe nervoso em aumento de 40x.

A análise imunoistoquímica foi realizada em 3 amostras de portadoras SAB com a finalidade de demonstrar a quantidade de feixes nervosos presentes em cada tecido coletado através da biópsia. As amostras sugerem que os resultados obtidos na expressividade dos Naves possam ter sido influenciados pela pequena quantidade de fibras nervosas presentes.

6 DISCUSSÃO

A SAB permanece uma condição clínica importante, pois causa transtornos significativos para a qualidade de vida do paciente (Grushka et al., 2002; Scala et al 2003; Zakrzewska et al., 2003). Por se tratar de uma doença sem sinais clínicos visíveis, o paciente, com frequência, se sente desacreditado por familiares e profissionais de saúde desconhecedores da SAB. Consequentemente, enfrentam uma grande dificuldade no diagnóstico, sendo referidos a diversas especialidades de saúde e submetidos a diversas terapêuticas, na maioria das vezes, ineficazes. Desta forma, a investigação científica tanto em aspectos terapêuticos quanto etiológicos é indispensável.

O grupo de pacientes, com o diagnóstico de SAB, incluídos consecutivamente neste estudo foi exclusivamente do sexo feminino com uma média de idade de 61,18 anos. Estes dados vão de acordo com os achados de diversos estudos epidemiológicos que delinearam o perfil destes pacientes, sendo este predominantemente do sexo feminino e no período peri / pós menopausa (Bergdahl & Anneroth , 1993; Grushka et al., 2002; Zakrzewska et al., 2003; Scala et al., 2003; Jääskeläinen, 2012; Gurvits et al., 2013).

Em relação à caracterização do sintoma de ardência, observou-se o padrão previamente descrito na literatura em 100% das pacientes analisadas, em que referiam este sintoma pela manhã, piorando ao longo do dia, mas raramente interferindo no sono das mesmas (Gruska et al., 2002; Torgerson, 2010; Jääskeläinen, 2012). Este perfil também varia de acordo com os alimentos ingeridos e o estado emocional. A maioria dos pacientes avaliados relatou grande incomodo com a ingestão de alimentos ácidos e correlacionaram também maior intensidade de ardência de acordo com o grau de tensão emocional submetidos em determinados dias.

A respeito do sítio na cavidade oral em que o sintoma de ardência se manifesta, 58,3% destas pacientes referiram com maior frequência a região de ápice de língua, apesar da queixa mais comum ser bilateral em borda língua, de acordo com a literatura (Jääskeläinen, 2012; Kohorst et al., 2015).

Na prática clínica foi observada a queixa de xerostomia, afetando cerca de 33,3% das pacientes; apesar desta queixa, o nível de fluxo salivar medido estava

dentro do limite de normalidade e não caracterizava hipossalivação em todas as pacientes avaliadas. Além disso, todas as pacientes faziam uso de diversos medicamentos para tratamento de doenças crônicas sistêmicas, o que dificulta o enquadramento do diagnóstico em SAB primária. As observações que foram realizadas neste estudo denotam que a atual definição da SAB pode necessitar de algumas revisões devido a grande dificuldade em se enquadrar o portador da SAB nos rígidos critérios clínicos diagnósticos estabelecidos, também evidenciados por outros pesquisadores (IHS, 2013; Patton et al., 2007; Granot e Nagler, 2005; Eliav et al., 2007).

Com esse estudo notou-se, concomitantemente, às intempéries do estabelecimento do diagnóstico, uma grande dificuldade no relacionamento com os pacientes de SAB, visto que em sua grande maioria apresentam distúrbios de ansiedade e depressão, sem excluir o ceticismo na cura de uma doença invisível a olhos nus, porém capaz de desencadear grandes transtornos sociais, alimentares e psicológicos. Na casuística avaliada, 33,3% das pacientes já apresentavam o diagnóstico de distúrbios de ansiedade e/ou depressão e faziam algum tipo de tratamento para estes distúrbios do comportamento. Porém, foi possível notar que algumas pessoas se mostravam ansiosas ou depressivas sem terem tido diagnóstico prévio. O quadro suportado por quem sofre SAB ao longo dos anos também foi apontado como causa de alterações nos seus perfis psicológicos e também diminuem a qualidade de vida de seus portadores (Grushka et al., 2002; Scala et al., 2003; Albuquerque et al., 2006; Mendak-Ziólko et al., 2012; Javali, 2015).

Outra alteração sistêmica frequentemente referida pelos pacientes incluídos neste estudo foi à presença de distúrbios do aparelho digestivo como gastrite e refluxo gastroesofágico em 41,6%. Esta correlação também foi observada em outros estudos (Netto et al., 2011; Mendak-Ziólko et al., 2012; Gurvits et al., 2013).

Finalmente, também foi observado no acompanhamento dos pacientes deste estudo que determinadas terapias tem maiores sucessos em alguns pacientes portadores de SAB em relação a outros, mesmo que estes pacientes apresentem queixas e idade semelhantes. Esta contraditória relação já foi relatada na literatura (de Moraes et al., 2012 e Javali, 2015) e considerando-se os 3 subtipos da SAB primária (Jääskeläinen et al., 2012) e que a dor neuropática associada à SAB pode ser mista, periférica ou central (Grémeau-Richard, 2010) a terapia proposta ideal

deverá ser individualizada (Nickel et al., 2012). Porém, novos estudos para definir melhores protocolos de tratamentos são necessários, uma vez que este não foi o objetivo do presente estudo.

Os desafios que circundam a obtenção de um tratamento efetivo para a SAB são diversos e estão principalmente relacionados ao desconhecimento da etiopatogenia da doença. São escassos estudos realizados em amostras de tecido bucal de pacientes com SAB, caracterizando mais detalhadamente as possíveis alterações morfológicas locais em fibras nervosas sensoriais, em que mutações genéticas também podem estar envolvidas neste processo. Além da dificuldade de diagnóstico da doença e os fatores psicológicos e neurológicos envolvidos e anteriormente mencionados, contribuindo para a inexistência de uma droga ou um conjunto delas que seja eficaz para o tratamento desta condição.

Neste contexto, a compreensão da SAB como uma modalidade de dor neuropática possibilita o entendimento do mecanismo do sintoma e abre um amplo campo para a investigação do mecanismo e etiologia destes (Forssell et al., 2015). Por exemplo, é conhecido o envolvimento de canais de sódio dependentes de voltagem na transmissão de mensagens de dor neuropática, em que a expressão gênica e proteica de certos canais é modificada e assim proporciona alterações nas respostas de dor, geralmente exacerbadas, frente aos estímulos rotineiros e triviais (Rogers et al., 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre o papel destes na SAB, o que motivou a presente investigação.

Assim, a expressão gênica dos canais de sódio dependentes de voltagem Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 foi avaliada por meio de RT-PCR em tempo real neste estudo. Foi observado, na análise pelo método do CT comparativo, um aumento de 38,7 vezes na expressão do RNA mensageiro do Nav 1.7 em relação ao grupo controle e uma diminuição da expressão do Nav1.9 em 0,89 vezes. Entretanto estas diferenças na expressão gênica do Nav 1.7 e Nav 1.9 não foram estatisticamente significativas entre os grupos caso e controle avaliados. O Nav 1.8 não foi expresso por nenhuma amostra analisada, independentemente do grupo.

Nas 3 amostras de pacientes com SAB avaliadas por imunoistoquímica para a marcação da proteína S100 sugeriram um baixo número de feixes de fibras nervosas nas biópsias de língua. Esta correlação é compatível com a literatura no tema, Lauria et al. (2005) observaram, por meio de microscopia confocal e imunoistoquímica, uma

redução na densidade de fibras nervosas epiteliais em pacientes com SAB, com uma tendência de correlação com o tempo de duração dos sintomas. Este achado também foi confirmado por outro estudo, sugerindo que os pacientes com SAB apresentam uma neuropatia de pequenas fibras sensoriais periféricas (Yilmaz et al., 2007).

Entretanto, para a confirmação desta relação nos casos de SAB avaliados neste estudo, seria necessário ampliar a amostra de pacientes com SAB avaliada por imunistoquímica. Além de realizar esta análise comparativamente a um grupo controle, que neste momento não foi o objetivo desta dissertação. Mais ainda, foi realizada uma imunomarcção simples com a proteína S100, que evidencia células derivadas da crista neural, como células de Schwann e melanócitos, e também é encontrada em várias células conjuntivas como adipócitos e condrócitos. Porém, também seria recomendável numa avaliação mais aprofundada com a utilização de outros imunomarcadores os anticorpos Nav 1.7 e Nav 1.8, como aqueles utilizados nos estudos de Lauria et al., (2005) e Yilmaz et al., (2007) que avaliaram pequenas fibras sensoriais periféricas em pacientes com SAB.

Tendo em vista esta possível alteração morfológica local na SAB, é esperada alguma influência deste fator na avaliação da expressão gênica de canais de sódio dependentes de voltagem. Isto porque a baixa concentração de fibras nervosas influenciaria diretamente na baixa expressão geral que estes genes apresentaram nas amostras avaliadas.

Além disso, é provável que exista uma expressão diferencial dos canais desta família em diferentes tecidos e órgãos. Este fato já foi observado em estudo com animais (macacos – Figura 2.6), em que avaliação de transcritos (RNA) dos canais estudados por *microarray*, em língua, era baixa tanto em relação às outras estruturas quanto em relação aos outros canais (Raymond et al., 2004). Embora não exista um estudo semelhante em seres humanos, supõe-se que o processo seja semelhante e que as isoformas dos canais de sódio apresentem padrões de expressão únicos dentro de tecidos específicos (Rogers et al., 2006).

Apenas dois estudos publicados na literatura mundial (Beneng et al., 2010b) e Yilmaz et al., 2007) se dedicaram à investigação dos canais de sódio dependente de voltagem na SAB. Em relação ao Nav 1.7, Beneng et al., (2010b), assim como na presente investigação, não observaram diferenças estatisticamente significativas da imunomarcção deste canal de sódio entre amostras de SAB e controles, embora

visualmente percebessem uma marcação mais intensa nas amostras de SAB que sugeria uma maior expressão local, porém também não comprovada pelo restrito tamanho da amostra incluído na análise.

No Nav 1.8 também foi observado um discreto aumento da expressão proteica em análise imunoistoquímica (Yilmaz et al., 2007). Além disso, afirmaram que a imunomarcção do Nav 1.8 em fibras nervosas intra-epiteliais é rara ou até mesmo ausente, em relação às camadas mais profundas da língua. Entretanto, no presente estudo não foi observada expressão gênica detectável do Nav 1.8 em nenhuma das amostras avaliadas de ambos os grupos, sendo que todas estas apresentavam RNA de qualidade, bem como a amplificação do gene constitutivo.

Ambas investigações citadas realizaram a análise por imunoistoquímica, ou seja, a investigação da expressão proteica dos Nav 1.7 e Nav 1.8 e, em contrapartida, foi avaliada a expressão gênica destes mesmos canais de sódio no estudo atualmente apresentado. Cabe ressaltar que algum processo pós-transcricional ou durante a tradução do RNA mensageiro em proteína pode estar alterado nesta doença e favorecer alguma diferença nos resultados observados entre estes estudos. Grémeau-Richard et al.(2010) também salientaram que a grande variabilidade de fatores interindividuais e metodológicos podem explicar diferentes resultados encontrados entre os diferentes estudos .

O Nav 1.9 não foi avaliado em estudos anteriormente publicados na literatura mundial. Esta escassez de estudos neste campo salienta o ineditismo deste trabalho e a necessidade de aprofundamento destas investigações. Ainda mais porque as pesquisas clínicas atuais para o desenvolvimento de drogas específicas para o tratamento de dores neuropáticas se baseiam em inibidores seletivos de canais de sódio dependentes da voltagem (Rogers et al., 2006).

As disfunções nos canais de sódio, chamadas canalopatias, são investigadas há décadas em outras dores neuropáticas, e especialmente em modelos animais, desde que, como salientado anteriormente, a compreensão da base genética das neuropatias dolorosas proporciona maior conhecimento fisiopatológico e, conseqüentemente, uma terapêutica mais eficiente (Cox et al., 2006; Hoyt et al., 2007; Brouwer et al., 2014; Jukic et al., 2015). Mutações nos genes podem desencadear alterações na expressividade dos canais de sódio, como por exemplo, mutações nos genes SCN9A, SCN10A e SCN11A, responsáveis por codificar os canais de sódio

Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 respectivamente, tornando os neurônios do gânglio da raiz dorsal hiperexcitáveis (Faber et al., 2012).

Estudos em modelos animais de dor neuropática observaram aumento na expressão gênica e proteica do Nav 1.7 no gânglio da raiz dorsal de ratos (Liu et al., 2012) relacionando este canal de sódio ao desenvolvimento de dor neuropática. A mesma relação foi estabelecida em relação ao Nav 1.8 (Scanio et al., 2010), e outro estudo em modelo animal que induziu a diminuição da expressão deste canal de sódio observou a reversão do quadro de dor neuropática (Lai et al., 2002).

Em contrapartida em 2005, Nassar et al., demonstraram que o desenvolvimento da dor neuropática não requer a presença de Nav 1.7 sendo este avaliado isoladamente ou em combinação Nav 1.8, por meio de um estudo de silenciamento de ambos os genes.

A expressão do Nav 1.9 parece estar, assim como dos outros canais de sódio estudados, reduzida tanto em relação ao RNA mensageiro quanto em relação à proteína em modelos de dor neuropática (Rogers et al., 2006). Porém, o Nav 1.9 foi pouco estudado na dor neuropática e os resultados a respeito dele são bastante contraditórios, mesmo neste tipo de estudos com modelos animais. Por exemplo, em estado de excitabilidade persistente, como o encontrado na dor neuropática, este tipo de canal foi observado como inativado e, por conseguinte, não está disponível para condução dos estímulos dolorosos (Erikson et al., 2005).

Assim como no estudo de Bird et al. (2013) em que a avaliação por imunoistoquímica não revelou expressão representativa do Nav 1.9 em neuromas do nervo lingual de forma que este canal de sódio não deve apresentar grande relevância na geração e manutenção da dor neuropática. Ressalta-se que nesta investigação o Nav 1.9 apresentou discreta diminuição da expressão gênica nas amostras de SAB.

Embora estas diferenças de expressão gênica dos Nav1.7 e Nav1.9 não tenham sido estatisticamente significativas, possivelmente pelo pequeno tamanho da amostra analisada, supõe-se que estes receptores apresentem alguma alteração em sua expressão gênica nos pacientes com SAB, uma vez que já foram previamente relacionados à modulação da dor, inclusive da dor neuropática sugerindo aprofundamento nesta linha de investigação.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que:

1. A amostra de pacientes com SAB estudada foi do gênero feminino entre a 4ª e 6ª década de vida, sendo a doença gastrointestinal o distúrbio sistêmico mais frequente e a medicação mais utilizada a bomba de inibidores de prótons.
2. A queixa principal de ardência bucal foi associada à queixas secundárias como a sensação de xerostomia e disgeusia. O ápice de língua foi o sítio mais acometido.
3. Dentre as terapias empregadas, a capsaicina mostrou-se a mais efetiva no controle dos sintomas.
4. Existe uma tendência de aumento de expressão gênica do Nav 1.7 e diminuição da expressão do Nav 1.9 em pacientes portadores de SAB em relação ao grupo controle.
5. O gene do canal de sódio dependente de voltagem Nav 1.8 não foi expresso em nenhuma amostra de ambos os grupos incluídos.
6. Os genes dos canais de sódio de alta voltagem Nav 1.7 e Nav 1.9 apresentam baixa expressão em mucosa bucal de língua humana.

REFERÊNCIAS⁵

Adamo D, Celentano A, Ruoppo E, Cucciniello C, Pecoraro G, Aria M, Mignogna MD. The Relationship Between Sociodemographic Characteristics and Clinical Features in Burning Mouth Syndrome. *Pain Medicine*. 2015;16(11): 2171-9.

Albuquerque RJC, Leeuw R, Carlson CR, et al. Cerebral activation during thermal stimulation of patients who have burning mouth disorder: An fMRI study. *Pain*. 2006 Jun;122(3):223–34.

Amir R, Argoff CE, Bennett GJ, et al. The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain. *J Pain*. 2006 May; 7(5):S1-S29.

Araujo DR, Paula E, Fraceto LF. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. *Química Nova*. 2008; 1775-1783.

Astbury, William Thomas. *Molecular biology or ultrastructural biology?* 1961; 1124-1124.

Attal N, Lanteri-Minet M, Laurent B, et al. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey. *Pain*. 2011 Dec;152(12):2836-43.

Barker KE, Batistone MD, Savage NW. Comparison of treatment modalities in burning mouth syndrome. *Aust Dent J*. 2009 Dec;54(4):300-5. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01154.x.

Beneng K, Yilmaz Z, Yiangou Y, et al. Sensory purinergic receptor P2X3 is elevated in burning mouth syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010b Aug;39(8):815-9. doi: 10.1016/j.ijom.2010.03.013. Epub 2010a Apr 24.

Beneng K, Renton T, Yilmaz Z, et al. Sodium channel Nav1.7 immunoreactivity in painful human dental pulp and burning mouth syndrome. *BMC Neurosci*. 2010b Jun;11(1):71. doi: 10.1186/1471-2202-11-71.

⁵ De acordo com estilo Vancouver.

Bergdahl J, Anneroth G. Burning mouth syndrome: literature review and model for research and management. *J Oral Pathol Med*. 1993 Nov;22(10):433-8.

Bergdahl M, Bergdahl J. Burning mouth syndrome: prevalence and associated factors. *J Oral Pathol Med*. 1999 Sep;28(8):350–4.

Bird EV, Christmas CR, Loescher AR, et al. Correlation of Nav1.8 and Nav1.9 sodium channel expression with neuropathic pain in human subjects with lingual nerve neuromas. *Mol Pain*. 2013 Oct;9(1):1-11. doi: 10.1186/1744-8069-9-52.

Bomtempo, Márcio. *Medicina natural: homeopatia e radiestesias*. Nova Cultural, 1992.

Boras VV, Savage NW, Brailo V, et al. Salivary and Serum levels of Substance P, neurokinin A and calcitonin gene related peptide in burning mouth syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010 May;15(3):427-31.

Boras VV, Pejakić M, Musić L, Krpan K, Illeš D. Burning Mouth Syndrome-Retrospective Analysis of 328 Patients. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science*. 2015, 6(5):141-6.

Borelli V, Marchioli A, Di Taranto R, et al. Neuropeptides in saliva of subjects with burning mouth syndrome: a pilot study. *Oral Dis*. 2010 May;16(4):365-74. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01648.x. Epub 2010 Mar 9.

Borsani E, Majorana A, Cocchi MA, et al. Epithelial expression of vanilloid and cannabinoid receptors: a potential role in burning mouth syndrome pathogenesis. *Histol Histopathol*. 2014 Apr;29(4):523-33.

Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. 1985: 54-56.

Brouwer BA, Merkies ISJ, Gerrits MM, et al. Painful neuropathies: the emerging role of sodium channelopathies. *J Peripher Nerv Syst*. 2014 Jun;19(2):53–65. doi: 10.1111/jns5.12071.

Campbell, Neil A, and Jane B Reece. *Biology*. 7th ed. San Francisco: Pearson Education, Inc ;2011.

Carbone M, Pentenero M, Carrozzo M, et al. Lack of efficacy of alpha-lipoic acid in burning mouth syndrome: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Pain*. 2009 May;13(5):492–6. doi: 10.1016/j.ejpain.2008.06.004. Epub 2008 Dec 9.

Carvalho WA, Lino L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Rev Bras Anesthesiol*. 1998;48 (2):137-58.

Cavalcanti, D. R.& Da Silveira, F. R. X. Alpha lipoic acid in burning mouth syndrome—a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Journal of oral pathology & medicine*. 2009 38(3), 254-61.

Chebel, Inês Fugitaro Otobe. Ação do tratamento homeopático na sintomatologia da síndrome da ardência bucal em duas fases: estudo duplo cego placebo controlado e estudo aberto. Diss. Universidade de São Paulo, 2012.

Collo G, North RA, Kawashima E, et al. Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci*. 1996 Apr;16(8):2495–507.

Costigan M, Joachim S, Clifford J.W. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32-32:1. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531. Review.

Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*. 2006 Dec;444(7121):894-8.

Devigili G, Tugnoli V, Penza P, et al. The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain*. 2008 Jul;131(Pt 7):1912-25. doi: 10.1093/brain/awn093.

De Moraes M, do Amaral BA, da Rocha PC, et al. Randomized trials for the treatment of burning mouth syndrome: an evidence-based review of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2012 Apr;41(4):281-7. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01100.x.

De Souza FT, Kummer A, Silva ML, et al. The Association of Openness Personality Trait with Stress-Related Salivary Biomarkers in Burning Mouth Syndrome. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(4):250-5. doi: 10.1159/000367714.

Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, et al. Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci*. 2010;33:325-47. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153234.

Dutta D, & Roy C. Ion channel gene mutation and pain. *Indian Journal of Pain*. 2014; 28(2): 59.

Eliav E, Kamran B, Schaham R, et al. Evidence of chorda tympani dysfunction in patients with burning mouth syndrome. *J Am Dental Assoc*. 2007 May;138(5):628-33.

Eriksson J, Jablonski A, Persson AK, et al. Behavioral changes and trigeminal ganglion sodium channel regulation in an orofacial neuropathic pain model. *Pain*. 2005 Dec;119(1):82-94.

Faber CG, Hoeijmakers JG, Ahn HS, et al. Gain of function Nav1. 7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Ann Neurol*. 2012 Jan;71(1):26-39. doi: 10.1002/ana.22485.

Fréo, Bianca. Estudo clínico da atividade da capsaicina em portadores da Síndrome de Ardência Bucal.[Dissertação]. Universidade de São Paulo. 2008.

Femiano F, Gombos F, Scully C. Burning mouth syndrome: the efficacy of lipoic acid on subgroups. *JEA VD*. 2004;18:676-8.

Forssell H, Jaaskelainen S, Tenovuo O, et al. Sensory dysfunction in burning mouth syndrome. *Pain*. 2002 Sep;99(1-2):41-7.

Forssell H, Jääskeläinen S, List T, et al. An update on pathophysiological mechanisms related to idiopathic oro-facial pain conditions with implications for management. *J Oral Rehabil*. 2015;42(4):300-22. doi: 10.1111/joor.12256.

Gallo CB. Expressão de receptores Toll-Like (2, 4 e 7) em células do sangue e da mucosa oral de pacientes portadores de ulceração aftosa recorrente [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2008.

Gilpin SF. Glossodynia. *J Am Med Assoc*.1936;106:1722-4.

Gold MS, Weinreich D, Kim CS, et al. Redistribution of Nav1. 8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci*. 2003 Jan;23(1):158-66.

Granot M, Nagler RM. Association between regional idiopathic neuropathy and salivary involvement as the possible mechanism for oral sensory complaints. *J Pain*. 2005 Sep;6(9):581–7.

Grémeau-Richard C, Woda A, Navez ML, et al. Topical clonazepam in stomatodynia: a randomized placebo-controlled study. *Pain*. 2004Mar;108(1):51–7.

Grémeau-Richard C, Dubray C, Aublet-Cuvelier B, et al. Effect of lingual nerve block on burning mouth syndrome (stomatodynia): a randomized crossover trial. *Pain*. 2010 Apr;149(1):27-32. doi: 10.1016/j.pain.2009.11.016.

Grushka M. Clinical features of burning mouth syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987 Jan;63(1):30–6.

Grushka M, Sessle BJ. Burning mouth syndrome. *Dent Clin North Am*. 1991 Jan;35(1):171-84.

Grushka M, Epstein JB, Gorrsky M. Burning mouth syndrome: differential diagnosis. *Dermatol Ther*. 2002;15(3):287-91.

Guimarães ALS, de Sá AR, Netto JM, et al. Interleukin-1 β and serotonin transporter gene polymorphisms in burning mouth syndrome patients. *J Pain*. 2006 Sep;7(9):654-8.

Gurvits GE, Amy T. Burning mouth syndrome. *World J Gastroenterol*. 2013 Feb;19(5):665. doi: 10.3748/wjg.v19.i5.665.

Haberland CM, Allen CM, Beck FM. Referral patterns, lesion prevalence, and patient care parameters in a clinical oral pathology practice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 May;87(5):583-8.

Harvey VL, Dickenson AH. Mechanisms of pain in nonmalignant disease. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2008 Jun;2(2):133-9. doi: 10.1097/SPC.0b013e328300eb24.

The international classification of headache disorders, 3rd ed. (beta version). *Cephalalgia*. 2013 Jul;33(9):629–808. doi: 10.1177/0333102413485658.

Hoyt SB, London C, Ok H, et al. Benzazepinone Na v 1.7 blockers: Potential treatments for neuropathic pain. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 Nov;17(22):6172-7.

Huang J, Han C, Estacion M, et al. Gain-of-function mutations in sodium channel Nav 1.9 in painful neuropathy. *Brain*. 2014 Jun;137(Pt 6):1627-42. doi: 10.1093/brain/awu079.

Jääskeläinen SK, Forssell H, Tenovuo O. Abnormalities of the blink reflex in burning mouth syndrome. *Pain*. 1997 Dec;73(3):455-60.

Jääskeläinen SK. Pathophysiology of primary burning mouth syndrome. *Clin Neurophysiol*. 2012 Jan;123(1):71-7. doi: 10.1016/j.clinph.2011.07.054.

Javali MA. Burning mouth syndrome: An enigmatic disorder. *Kathmandu Univ Med J*. 2015;11(2):175-8.

Jukic M, Danijel K, Marko A. Isoform selective voltage-gated sodium channel modulators and the therapy of pain. *Curr Med Chem*. 2014;21(2):164-86.

Kato IT, Pellegrini VD, Prates RA, et al. Low level laser therapy in burning mouth syndrome patients: a pilot study. *Photomed Laser Surg*. 2010 Dec;28(6):835-9. doi: 10.1089/pho.2009.2630.

Kidd EJ, Grahames CB, Simon J, et al. Localization of P2X receptor transcripts in the rat nervous system. *Mol Pharmacol*. 1995 Oct;48(4):569–73.

Kim HII, Kim YY, Chang JY, et al. Salivary cortisol 17 β -estradiol, progesterone, dehydroepiandrosterone, and α -amilase in patients with burning mouth syndrome. *Oral Dis*. 2012 Sep;18(6):613-20. doi: 10.1111/j.1601-0825.2012.01937.x.

Kohorst JJ, Bruce AJ, Torgerson RR, et al. The prevalence of burning mouth syndrome: a population-based study. *Br J Dermatol*. 2015;172(6):1654-6. doi: 10.1111/bjd.13613.

Lai J, Gold MS, Kim CS, et al. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain*. 2002 Jan;95(1-2):143–52.

Lai J, Porreca F, Hunter JC, et al. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:371-97.

Lauria G, Majorana A, Borgna M, et al. Trigeminal small-fibers sensory neuropathy causes burning mouth syndrome. *Pain*. 2005 Jun;115(3):332-7.

Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1772(8):989–1003.

Levinson Simon R, Songjiang L, Henry MA. The role of sodium channels in chronic pain. *Muscle Nerve*. 2012 Aug;46(2):155-65. doi: 10.1002/mus.23314. Review.

Lipton JA, Ship JA, Larach-Robinson D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *J Am Dent Assoc*. 1993 Oct;124(10):115–21.

Liu C, Cao J, Ren X, et al. Nav1. 7 protein and mRNA expression in the dorsal root ganglia of rats with chronic neuropathic pain. *Neural Regen Res*. 2012 Jul;7(20):1540. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.20.003.

Marino R, Torretta S, Capaccio P, et al. Different therapeutic strategies for burning mouth syndrome: preliminary data. *J Oral Pathol Med*. 2010 Sep;39(8):611–16. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00922.x.

Mendak-Ziółko M, Tomasz K, Zdzisław AB. Evaluation of select neurophysiological, clinical and psychological tests for burning mouth syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Sep;114(3):325-32. doi: 10.1016/j.oooo.2012.04.004.

Merksey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms/prepared by the Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain. 2nd. ed. Seattle: IASP; 1994.

Miziara I, Chagury A, Vargas C, et al. Therapeutic options in idiopathic Burning Mouth Syndrome: Literature Review. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2015 Jan;19(1):86-9. doi: 10.1055/s-0034-1378138.

Nagler RM, Hershkovich O. Sialochemical and gustatory analysis in patients with oral sensory complaints. *J Pain*. 2004 Feb;5(1):56-63.

Nassar MA, Levato A, Stirling LC, et al. Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na. *Mol Pain*. 2005 Aug;1:24.

Netto FOG, Diniz IMA, Grossmann SMC, et al. Risk factors in burning mouth syndrome: a case-control study based on patient records. *Clin Oral Investig*. 2011 Aug;15(4):571-5. doi: 10.1007/s00784-010-0419-5.

Nickel FT, Seifert F, Lanz S, et al. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2012 Feb;22(2):81-91. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.05.005.

Patton LL, Siegel MA, Benoliel R, et al. Management of burning mouth syndrome: systematic review and management recommendations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Mar;103 Suppl:S39.e1-13.

Pellegrini, Vivian Diane. Terapia laser em baixa intensidade em pacientes portadores da Síndrome de Ardência Bucal: estudo randomizado e controlado. Diss. Universidade de São Paulo, 2010.

Petruzzi M, Lauritano D, De Benedittis M, Baldoni M, Serpico R. Systemic capsaicin for burning mouth syndrome: short-term results of a pilot study. *Journal of oral pathology & medicine*. 2004; 33(2): 111-4.

Pezelj-Ribarić S, Kqiku L, Brumini G, et al. Proinflammatory cytokine levels in saliva in patients with burning mouth syndrome before and after treatment with low-level laser therapy. *Lasers Med Sci*. 2013;28(1):297-301. doi: 10.1007/s10103-012-1149-5.

Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu. Rev Neurosci*. 2006;29:507-38. Review.

Popa C, Stelea C, Popescu E. Risk factors of burning mouth syndrome:un update. *Romanian Journal of Oral Rehabilitation*. 2011; 3(3): 47.

Raymond CK, Castle J, Garrett-Engle P, et al. Expression of alternatively spliced sodium channel α -subunit genes: unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *J Biol Chem*. 2004 Oct;279(44):46234-41.

Rochkind S. Photoengineering of neural tissue repair processes in peripheral nerves and the spinal cord: Research development with clinical applications. *Photomed Laser Surg*. 2006 Apr;24(2):151-7. Review.

Rogers M, Tang L, Madge DJ, et al. The role of sodium channels in neuropathic pain. *Semin Cell Dev Biol.* 2006 Oct;17(5):571-81.

Rumisfield JA, West DP. Topical capsaicin in dermatologic and peripheral pain disorders. *Ann Pharmacother.* 1991;25:381-7.

Santos LDFCD, Carvalho ADAT, Leão JC, et al. Effect of low-level laser therapy in the treatment of burning mouth syndrome: a case series. *Photomed Laser Surg.* 2011 Dec;29(12):793-6. doi: 10.1089/pho.2011.3016.

Sardella A, Lodi G, Demarosi F, et al. Burning mouth syndrome: a retrospective study investigating spontaneous remission and response to treatments. *Oral Dis.* 2006 Mar;12(2):152-6.

Scala A, Checchi L, Montevicchi M, et al.. Update on burning mouth syndrome: Overview and patient management. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):275-91.

Scanio MJ, Shi L, Drizin I, et al. Discovery and biological evaluation of potent, selective, orally bioavailable, pyrazine-based blockers of the Na(v)1.8 sodium channel with efficacy in a model of neuropathic pain. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:7816–25. doi: 10.1016/j.bmc.2010.09.057.

Scardina GA, Pisano T, Messina P. [Burning mouth syndrome]. *Recenti Prog Med.* 2007 Feb;98(2):120–8. Italian.

Scardina GA, Pisano T, Carini F, et al. Burning mouth syndrome: an evolution of in vivo microcirculation. *J Am Dent Assoc.* 2008 Jun;139(7):940-6.

Schestatsky P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. *Ver Hosp Clín Porto Alegre.* 2008;28(3):177-87.

Sherrington, Charles. The integrative action of the nervous system. Vol. 2. CUP Archive, 1906.

Ship JA, Grushka M, Lipton A, et al. Burning mouth syndrome: an update. *J Am Dent Assoc.* 1995 Jul;126(7):842-53.

Strickland IT, Martindale JC, Woodhams PL, Reeve AJ, Chessell I P, McQueen DS. Changes in the expression of NaV1. 7, NaV1. 8 and NaV1. 9 in a distinct population of

dorsal root ganglia innervating the rat knee joint in a model of chronic inflammatory joint pain. *European Journal of Pain*. 2008;12(5): 564-72.

Suarez P, Clarck GT. Burning Mouth Syndrome: an update on diagnosis and treatment methods. *J Calif Dent Assoc*. 2006Aug;34(8):611-22.

Suh KI, Kim YK, Kho HS. Salivary levels of IL-1b, IL-6, IL-8, and TNF-a in patients with burning mouth syndrome. *Arch Oral Biol*. 2009 Sep;54(9):797-802. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.05.007.

Svensson P, Bjerring P, Arendt-Nielsen L, et al. Sensory and pain thresholds to orofacial argon laser stimulation in patients with chronic burning mouth syndrome. *Clin J Pain*. 1993 Sep;9(3):207–15.

Takeda Y, Chou KB, Takeda J, et al. Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Sep;179 (3):1232–40.

Torgerson RR. Burning mouth syndrome. *Dermatol Ther*. 2010 May-Jun;23(3):291-8. doi: 10.1111/j.1529-8019.2010.01325.x.

Waxman SG, Dib-Hajj S. Erythermalgia: molecular basis for an inherited pain syndrome. *Trends Mol Med*. 2005 Dec;11(12):555–62. Review.

Yamazaki Y, Hata H, Kitamori S, et al. An open-label, noncomparative, dose escalation pilot study of the effect of paroxetine in treatment of burning mouth syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Jan;107(1):6-11. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.08.024.

Yilmaz Z, Renton T, Yiangou Y, et al. Burning mouth syndrome as a trigeminal small fibre neuropathy: Increased heat and capsaicin receptor TRPV1 in nerve fibres correlates with pain score. *J Clin Neurosci*. 2007 Sep;14(9):864–71.

Zakrzewska JM, Forssell H, Glenny AM. Interventions for the treatment of burning mouth syndrome: a systematic review. *J Orofac Pain*. 2003 Fall;17(4):293-300. Review.

Zakrzewska JM, Forssell H, Glenny AM. Interventions for the treatment of burning mouth syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 Jan;(1):CD002779. Review.

Zidverc-Trajkovic J, Stanimirovic D, Obrenovic R, et al. Calcitonin gene-related peptide levels in saliva of patients with burning mouth syndrome. *J Oral Pathol Med*. 2009 Jan;38(1):29-33. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00721.x.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 137/11
CAAE 0151.0.017.000-11

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **“Expressão gênica associada a neurotransmissores humanos na Síndrome de Ardência Bucal”**, de responsabilidade da pesquisadora Vivian Diane Pellegrini, sob orientação do Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 08 de fevereiro de 2012.

Prof.ª Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Expressão gênica de neurotransmissores em portadores da Síndrome de Ardência Bucal

Pesquisador (es) responsável (is): Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya.

Instituição/Departamento: Faculdade de Odontologia/ Departamento de Estomatologia

Telefone para contato: (11) 3091-7883

Local da coleta de dados: Clínica da Faculdade de Odontologia da USP

Prezado (a) Senhor (a):

- Estamos convidando-o (a) a participar de uma pesquisa clínica de forma **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa e responder este questionário, é muito importante que o Sr (a) compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores estão aptos a esclarecer às suas dúvidas antes do (a) Sr (a) se decidir a participar.
- O Sr (a) tem o direito de **desistir** da participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais tenha direito.

Objetivos: O (A) Sr (a) está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que tem como objetivo investigar e identificar alterações em genes que possam estar relacionados ao envolvimento e causa da síndrome da ardência bucal.

Procedimentos:

Pacientes portadores de Síndrome de Ardência Bucal: O(A) Sr(a) será submetido a exame clínico padrão desta instituição, que consiste de entrevista e exame da boca. Será necessário também uma pequena cirurgia para detalhamento do diagnóstico. Este mesmo material será utilizado para estudo genético.

Pacientes NÃO portadores de Síndrome de Ardência Bucal: Parte do material que será removido na sua cirurgia poderá ser utilizado em um estudo laboratorial que visa investigar as proteínas possivelmente envolvidas nas causas da Síndrome de Ardência Bucal, colaborando desta forma com a pesquisa nesta doença.

Riscos e desconfortos: Não há previsão de riscos importantes para este estudo, apenas o desconforto decorrente do procedimento cirúrgico. A intervenção cirúrgica será conduzida sob condições adequadas de limpeza e segurança. O Sr (a) será devidamente avaliado(a) quanto as condições de submeter se ao procedimento planejado, que será conduzido sob anestesia local e finalizado com alguns pontos cirúrgicos. A atenção às orientações profissionais previne problemas pós-operatórios, mas na eventualidade de tal ocorrência o(a) Sr (a) terá à disposição o telefone (11)3091-7883, contatando os pesquisadores responsáveis.

Tempo: O tempo despendido para tal procedimento será de 60 minutos e será realizado em 1 sessão.

Benefícios: Esta pesquisa pretende contribuir para um tratamento eficaz da síndrome de ardência na boca, trazendo benefícios a toda população que sofre dessa condição. Cabe aqui ressaltar que ainda não existe um tratamento completamente eficaz para solucionar o problema da síndrome de ardência bucal.

Ajuda de custos: Não será fornecida nenhuma ajuda de custos para realização dos procedimentos descritos.

Garantia de sigilo: As informações fornecidas pelo Sr (a) serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Direito de desistir: O Sr(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito, como por exemplo, a vaga para continuar o atendimento em nossa clínica e tratamento convencional.

Forma de contato: para esclarecimentos de dúvidas ou se precisar de assistências o Sr poderá entrar em contato com os pesquisadores através do tel (11)3091-7901, no endereço Av. Prof. Lineu Prestes 2227, Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo, ou pelos email: nnsugaya@usp.br.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Prof. Lineu Prestes 2227, Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo ou pelo email cepfo@usp.br)

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador **concordo** em participar de forma voluntária da pesquisa.

São Paulo, ____/____/____

Nome por extenso do paciente

Assinatura do paciente ou responsável

Documento de identificação
RG do paciente

Nome do pesquisador: Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya /CROSP 16158

Assinatura

ANEXO C – Ficha Clínica para avaliação da saúde geral

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA - FOSP
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA –
DISCIPLINA DE ESTOMATOLOGIA CLÍNICA

Nome: _____

Endereço: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ RG: _____ TEL res: _____

Estado Civil: _____ Profissão: _____ TEL com: _____

Nacionalidade: _____ Naturalidade: _____

Data de entrada: _____ Matrícula: _____

Queixa Principal:

História da doença atual:

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are approximately 20 lines visible. The paper appears to be a standard notebook page or a sheet of stationery.

História Odontológica:

História Médica e Pgressa atual:

Antecedentes Familiares:

Hábitos:

Fuma atualmente? () não () sim . Já fumou ? () não () sim . Quando parou? _____

Tipo _____ quantidade/dia _____ tempo de uso _____

Álcool? () não () sim Já bebeu? () não () sim Quando parou? _____

Tipo: _____ quantidade: _____ tempo de uso _____

EXAME FÍSICO:

Geral:

Extra-Oral:

Intra-Oral:

Exames Complementares (anotar o exame, data e o resultado)

Sialometria:

Histórico e evolução clínica: