UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

BRUNO D'AUREA FURQUIM

Potencial influência de variantes genéticas nas disfunções temporomandibulares

BAURU
2013

BRUNO D'AUREA FURQUIM

Potencial influência de variantes genéticas nas disfunções temporomandibulares

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti

BAURU
2013

F982p

Furquim, Bruno D'Aurea

Potencial influência de variantes genéticas nas disfunções temporomandibulares / Bruno D'Aurea Furquim. – Bauru, 2013.

128 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 118/2010
Data: 06/07/2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida esposa, **Flávia**, mulher da minha vida, minha melhor amiga e mãe extraordinária; que, com sua simplicidade e amor, faz todos à sua volta mais felizes. E ao meu filhão, **Felipe**, a razão da minha vida e minha maior alegria.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por iluminar o meu caminho.

Aos meus **pais**, por toda sua dedicação, doação, carinho e, acima de tudo, por serem minhas referências éticas e o meu porto seguro.

À minha querida irmã, **Rachel**, por saber que sempre poderei contar com sua cumplicidade, carinho e amizade. Ao meu cunhado e amigo, **Fernando**, por cuidar tão bem da **Rachel** e do meu afilhado **Vittório**.

Aos meus avós, **Dona Iria** e **Seu André**, que com garra, bom-humor e fé nos inspiram a enfrentar as adversidades e a valorizar a vida.

Aos meus sogros, **Paulo** e **Rosângela**, por terem me adotado como filho. E aos meus cunhados, **Paulo** e **Octávio**, pelo respeito e amizade com que sempre me trataram.

Aos meus **tios**, **tias**, **primos** e **primas**, por proporcionarem tantos momentos felizes de convívio e por sempre estarem do meu lado.

Aos meus amigos de infância, **Gustavo**, **Thiago**, **Felipe**, **Maikiel**, **Michel**, **Reginaldo**, **Juliana**, **Renata**, **Camila** e **Letícia**, por tantas risadas.

Aos amigos e parceiros profissionais, **Adilson Luiz Ramos** e **Rafael Santos Silva**, pela confiança no meu trabalho e pela oportunidade de produzir e aprender com profissionais tão competentes.

A toda a equipe da **Dental Press**, pelo comprometimento em sempre fazer melhor, e por entender a minha ausência. Em especial ao nosso produtor editorial **Júnior Bianchi**, pela liderança e generosidade, e ao meu primo **Ronis Siqueira**, por sua sempre sensata e valiosa contribuição intelectual nas mais diferentes questões.

A todos os meus amigos de doutorado: **Marcelo**, **Marcos**, **Marcela**, **Vinicius**, **Fábio**, **Roberta**, **Paulo Maurício**, **Max**, **Luiz**, **Lívia** e **Hugo**.

Ao competente “grupo de DTM” da FOB/USP: **André**, **Carol**, **Juliana**, **Léo**, **Lívia**, **Naila**, **Priscila** e **Yuri**. Tenho muito orgulho de ter sido contemporâneo desse time e muita gratidão por tudo que me ensinaram. Agradeço, em especial, à **Lívia Maria Sales Pinto Flamengui**, por ter aceito participar deste projeto e trabalhar com tanto afinco para sua realização.

Aos professores do Departamento de Reabilitação Oral, em especial aos professores **Accacio Lins do Valle**, **Carlos dos Reis Pereira de Araujo**, **Gerson Bonfante**, **José Henrique Rubo**, **Luiz Fernando Pegoraro** e **Simone Soares**, pela generosidade em dividir conosco seus conhecimentos, e pela agradável convivência.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru, em especial a **Déborah Andrea Riêra Blasca**, **Hebe Freitas** e **Maristela Petenuci Ferrari**, por realizarem seu trabalho da melhor forma possível, o que faz da FOB um lugar tão especial.

Ao meu orientador de iniciação científica, **Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached**, e de mestrado, **Prof. Dr. José Fernando Castanha Henriques**, pelos valiosos ensinamentos transmitidos e por me encorajarem a seguir a carreira acadêmica.

Ao grande amigo **Carlos Eduardo Palanch Repeke**, meu veterano de graduação, colega de turma de mestrado e meu co-orientador não oficial do doutorado, pela sua imprescindível contribuição no panejamento e realização deste trabalho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, por ter sido um verdadeiro mestre, cuja postura impecável faz com que seus alunos busquem sempre dar o seu melhor, para alcançar sua confiança e admiração. Obrigado por me ensinar tudo o que sei sobre Disfunção Temporomandibular, e por ser, além de um mestre, um grande amigo.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

"Nada é mais falso do que uma verdade estabelecida."

Millôr Fernandes

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos testar a hipótese nula de que não há diferença entre o grupo com Disfunção Temporomandibular (DTM) e o grupo Controle, para as frequências genotípicas e de alelos dos SNPs candidatos *COMT Val(158)Met* (rs4680); *TNFA-308* (rs1800629); *IL6-174* (rs1800795); *IL-1β-3954* (rs1143634); *IL10-592* (rs1800872); *MMP1-1607* (rs1799750) *e TLR4*-896 (rs4986790); e determinar, nos casos com DTM, a influência dos SNPs candidatos na sensibilidade dolorosa mecânica experimental, na intensidade e no tempo de dor. As frequências genotípicas e de alelos dos sete SNPs candidatos foram comparadas entre 152 indivíduos com DTM e 91 controles, por meio da técnica de PCR em tempo real. A sensibilidade dolorosa mecânica foi avaliada pelo limiar de dor à palpação (LDP) e a intensidade de dor, utilizando-se uma escala analógica visual. As diferenças entre as frequências dos polimorfismos estudados foram avaliadas por meio do teste qui-quadrado (x^2) e os valores de LDP entre os grupos foram comparados pelo teste t. A análise de possíveis diferenças entre os subgrupos de genótipos, com relação aos valores de LDP, EAV e tempo de dor, foi feita pelo teste estatístico one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. A hipótese nula foi rejeitada, uma vez que houve diferença entre as frequências genotípicas do SNP *TNFA-308* entre os grupos, estando o polimorfismo *TNFA-308* (1800629) associado às DTMs ($p<0,05$). Além do *TNFA-308*, os SNPs COMT *Val(158)Met*, *IL6-174*, *IL-1β-3954* e *TLR4-896* foram capazes de influenciar a sensibilidade dolorosa mecânica em indivíduos doentes ($p<0,05$). O presente estudo apresenta associação inédita entre o polimorfismo *TNFA-308* (1800629) e as DTMs. Encorajamos estudos futuros que elucidem a associação entre genótipos pró-inflamatórios e uma menor sensibilidade dolorosa mecânica.

Palavras-chave: Disfunção temporomandibular. Genética. Limiar de dor.

ABSTRACT

Potential influence of genetic variants in temporomandibular disorders

This study aimed at testing the null hypothesis which claims that there is no difference between the group with temporomandibular joint disorder (TMD) and a control group regarding the genotypic and allelic frequencies of the candidate SNPs *COMT Val(158)Met* (rs4680); *TNFA-308* (rs1800629); *IL6-174* (rs1800795); *IL-1β-3954* (rs1143634); *IL10-592* (rs1800872); *MMP1-1607* (rs1799750) *and TLR4*-896 (rs4986790). Additionally, it aimed at determining candidate SNPs influence on experimental mechanical pain sensitivity, intensity and duration of pain in the TMD cases. The genotypic and allelic frequencies of the seven candidate SNPs were compared among 152 individuals from the group with TMD and 91 individuals from the control group, by using the real-time PCR technique. Mechanical pain sensitivity was assessed through pressure pain threshold (PPT) and pain intensity was assessed using visual analogue scales (VAS). Differences between the frequencies regarding the studied polymorphisms were assessed through the chi-square test (x^2) while the PPT values were compared through the t-test. Analysis of potential differences between the genotype subgroups with respect to the PPT, VAS and pain duration values was performed with ANOVA one-way test, followed by the Tukey's test. The null hypothesis was rejected, since there were differences among the genotypic frequencies of the *TNFA-308* SNP between groups. The *TNFA-308* (1800629) polymorphism is found to be associated with the TMDs ($p<0.05$). In addition to TNFA-308, the SNPs COMT *Val(158)Met*, *IL6-174*, *IL-1β-3954* and *TLR4-896* were capable of influencing mechanical pain sensitivity in individuals with TMD ($p<0.05$). This study presents an unprecedented association between the *TNFA-308* (1800629) polymorphism and TMDs. We encourage future researches that enlighten the association between proinflammatory genotypes and lower mechanical pain sensitivity.

Keywords: Temporomandibular joint disorder. Genetics. Pain threshold.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Algometria do músculo masseter **48**

Figura 2 - Kit para coleta de DNA Oragene™ **50**

Figura 3 - Coleta da saliva com Kit DNA Oragene **51**

Figura 4 - Processo de purificação do DNA: homogeneização e coleta de 500 µL da solução (Oragene/saliva) para tubos Eppendorf de 1,5 mL **51**

Figura 5 - Encubação da amotra a 50ºC em banho-maria por 1 hora **51**

Figura 6 - **A)** Solução purificadora Oragene (Oragene Purifier); **B)** adição de 20 µL nos 500 µL da solução Oragene/saliva; **C)** homogeneização por vortex (5 segundos) **52**

Figura 7 - **A)** Encubação da amostra em gelo por 10 minutos; **B)** amostra Oragene/saliva/Purifier após encubação; **C)** centrifugação a 13.000 rpm /5 min à temperatura ambiente **52**

Figura 8 - **A)** Formação do pellet de impurezas; **B)** coleta do sobrenadante sem o precipitado, para um novo Eppendorf de 1,5 mL..... **52**

Figura 9 - **A)** Adição de 500 µL de álcool absoluto; **B)** aguardar por 10 minutos e centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente **52**

Figura 10 - **A)** Pellet de DNA; B) descarte do sobrenadante; **C)** adição de 250 µL de álcool a 70%; **D)** repouso de 1 minuto e novo descarte de sobrenadante..... **53**

Figura 11 - **A)** Adição de 100 µL de solução tampão estabilizante em pH 8.0; **B)** homogeneização por vortex / 5 segundos e acondicionamento em geladeira por 48 horas..... **53**

Figura 12 - Processo de quantificação de DNA - espectrofotômetro Nanodrop™ (0,5 µL da amostra)..... **53**

Figura 13 - Adição de 2 µL de alíquotas de DNA, purificação com 0,25 µL de água MiliQ, 0,25 µL da solução de *primers* específicos mais sonda e 2,5 µL da solução Genotyping MasterMix (Oragene) **55**

Figura 14 - Selamento da placa para homogeneização **55**

Figura 15 - **A)** Homogeneização em vortex específico para placas, por 10 segundos; **B)** solução Genotyping MasterMix (Oragene); **C)** *primers* específicos para detecção dos SNPs analizados..... **55**

Figura 16 - **A)** Aparelho ViiA^{TM}7 RealTimePCR; **B)** quadro demonstrativo das etapas da PCR em tempo real **55**

Figura 17 - Comparação dos valores de LDP entre os grupos Controle e com DTM. No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles..... **63**

Figura 18 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP COMT *Val(158)Met* (rs4680). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles **64**

Figura 19 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *TNFA-308* (rs1800629). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles **65**

Figura 20 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *IL6-174* (rs1800795). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles ... **66**

Figura 21 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *IL-1β-3954* (rs1143634). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles **67**

Figura 22 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *IL10-592* (rs1800872). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles ... **68**

Figura 23 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *MMP1-1607* (rs1799750). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles **69**

Figura 24 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *TLR4-896* (rs4986790). No sentido horário, os valores do LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles **70**

Figura 25 - Teste de associação entre o SNP COMT *Val(158)Met* (rs4680) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3 ..... **71**

Figura 26 - Teste de associação entre o SNP *TNFA-308* (rs1800629) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3 ..... **71**

Figura 27 - Teste de associação entre o SNP *IL6-174* (rs1800795) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3 ..... **71**

Figura 28 - Teste de associação entre o SNP *IL-1β* (rs1143634) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3 ..... **72**

Figura 29 - Teste de associação entre o SNP *IL10-592* (rs1800872) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3 ..... **72**

Figura 30 - Teste de associação entre o SNP *MMP1-1607* (rs1799750) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3 ..... **72**

Figura 31 - Teste de associação entre o SNP *TLR4* (rs4986790) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3 ..... **72**

Figura 32 - Teste de associação entre o SNP COMT *Val(158)Met* (rs4680) e o tempo de dor **73**

Figura 33 - Teste de associação entre o SNP *TNFA-308* (rs1800629) e o tempo de dor **73**

Figura 34 - Teste de associação entre o SNP *IL6-174* (rs1800795) e o tempo de dor **73**

Figura 35 - Teste de associação entre o SNP *IL-1β* (rs1143634) e o tempo de dor **74**

Figura 36 - Teste de associação entre o SNP *IL10-592* (rs1800872) e o tempo de dor **74**

Figura 37 - Teste de associação entre o SNP *MMP1-1607* (rs1799750) e o tempo de dor..... **74**

Figura 38 - Teste de associação entre o SNP *TLR4* (rs4986790) e o tempo de dor **75**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes candidatos **49**

Tabela 2 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP COMT *Val(158)Met* (rs4680) dos grupos Controle e com DTM **59**

Tabela 3 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *TNFA-308* (rs1800629) dos grupos Controle e com DTM **60**

Tabela 4 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *IL6-174* (rs1800795) nos grupos Controle e com DTM **61**

Tabela 5 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *IL-1β* (rs1143634) nos grupos Controle e com DTM **61**

Tabela 6 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *IL10-592* (rs1800872) nos grupos Controle e com DTM **61**

Tabela 7 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *MMP1-1607* (rs1799750) nos grupos Controle e com DTM **62**

Tabela 8 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *TLR4* (rs4986790) nos grupos Controle e com DTM **62**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**

2 REVISÃO DE LITERATURA **19**

2.1 AS DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES **21**

2.2 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO **29**

3 PROPOSIÇÃO **39**

4 MATERIAL E MÉTODOS **43**

4.1 AMOSTRA **45**

4.1.1 Grupo com DTM **45**

4.1.2 Grupo Controle **46**

4.2 PROCEDIMENTOS **47**

4.2.1 Anamnese **47**

4.2.2 Exame físico **48**

4.2.3 Avaliação genética **49**

4.2.3.1 Coleta do material biológico e extração de DNA **50**

4.2.3.2 Análise dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) **53**

4.3 ESTATÍSTICA **56**

5 RESULTADOS **57**

5.1 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E DE ALELOS DOS SNPs CANDIDATOS NOS GRUPOS CONTROLE E DTM **59**

5.2 SENSIBILIDADE DOLOROSA MECÂNICA NOS GRUPOS CONTROLE E DTM **63**

5.3 OS SNPs CANDIDATOS E A SENSIBILIDADE DOLOROSA MECÂNICA **64**

5.4 OS SNPs CANDIDATOS, A INTENSIDADE E O TEMPO DE DOR **71**

6 DISCUSSÃO **77**

7 CONCLUSÕES **91**

REFERÊNCIAS **95**

ANEXOS **123**

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A dor representa um dos fatores de maior motivação para que as pessoas busquem aconselhamento e tratamento com profissionais da saúde. As desordens de dor crônica implicam em bilhões de dólares por ano em despesas de saúde e perda de produtividade (VERHAAK et al., 1998). Admite-se que a dor, quando não aliviada, pode causar dificuldades de cicatrização, potencialmente levar a doenças autoimunes e alterações nos sistemas nervoso periférico e central, levando a síndromes de dor crônica. Os pacientes relatam, ainda, inúmeros sintomas psicossociais como, por exemplo: perda da autoestima, distúrbios do sono, perda da libido, perda de apetite, fadiga e depressão. Em suma, a dor pode governar a vida de quem dela sofre (WILLIAMSON, 1996).

Dez por cento dos pacientes que sofrem de dores crônicas apresentam dor na região facial (excluindo a dor de cabeça tradicional). Cárie dentária, doença periodontal e patologias neuropáticas são consideradas algumas das fontes de dores orofaciais (HART; PIHLSTROM; TABAK, 2004; TROMBONE et al., 2010). Entre os transtornos que provocam dor orofacial, as disfunções temporomandibulares (DTMs) compõem uma parte significativa do total de casos (POVEDA RODA et al., 2007). O termo Disfunções Temporomandibulares (DTMs) refere-se ao conjunto de desordens médicas e odontológicas que afetam a articulação temporomandibular e/ou musculatura mastigatória, assim como suas estruturas contíguas (DWORKIN, 1995), e afligem especialmente mulheres entre 20 e 40 anos de idade (CONTI et al., 1996; TUERLINGS; LIMME, 2004; SCHMITTER; RAMMELSBERG; HASSEL, 2005; ABOU-ATME; ZAWAWI; MELIS, 2006; DODIĆ et al., 2006). As DTMs afetam 5-15% da população adulta e também incorrem em bilhões de dólares em custos de cuidados com a saúde (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1983 apud DIATCHENKO et al, 2005).

Segundo o importante projeto multicêntrico OPPERA (*Orofacial pain: prospective evaluation and risk assessment*), estão associados às DTMs: os fatores psicossociais, os sintomas de apneia do sono, o histórico de trauma, a parafunção, a

maior sensibilidade à dor experimental e a presença de outras desordens dolorosas (FILLINGIM et al., 2011a; GREENSPAN et al., 2011; SLADE et al., 2013).

Contudo, a etiopatogenia das DTMs ainda não foi totalmente compreendida. Mecanismos como a inflamação articular, sensibilização periférica, sensibilização central, desregulação do sistema nervoso autonômico e modulação descendente da dor ineficiente têm sido postulados como fatores de risco importantes para a manutenção da doença (ZUBIETA et al., 2003; KANEYAMA et al., 2005; MERRILL, 2007; FILLINGIM et al., 2011a; FILLINGIM et al., 2011b; MAIXNER et al., 2011)

Em função dos diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos e da natureza multifatorial das DTMs, sugere-se que distintos *loci* genéticos possam estar relacionados, cada um contribuindo com pequenos efeitos e interagindo com as exposições ambientais (DIATCHENKO et al., 2006a; SMITH et al., 2011).

Os SNPs (do inglês "*single-nucleotide polymorphism*", polimorfismos de nucleotídeo único) surgem a partir de mudanças em nucleotídeos únicos de uma determinada sequência de DNA. A influência das características genéticas vem sendo amplamente estudada através de trabalhos que relacionam os SNPs com a presença e/ou severidade de determinadas patologias. Qualquer sítio (*locus*) no qual existam alelos múltiplos como componentes estáveis da população é, por definição, polimórfico. Um alelo é geralmente definido como polimórfico se ele estiver presente em uma frequência maior que 1% da população. Conceitualmente, os SNPs são uma alteração (adição, substituição ou exclusão) de uma base nitrogenada, podendo ou não apresentar algum papel funcional, como, por exemplo, a alteração da expressão do gene polimórfico. Cada indivíduo apresenta em seu código genético uma ampla quantidade de SNPs em diversos genes alvos, podendo assim explicar inúmeras características individuais (BROOKES, 1999; CARGILL et al., 1999; SACHIDANANDAM et al., 2001).

Tendo em vista um maior entendimento do mecanismo da dor nas DTMs, caracterizando a influência dos SNPs na individualidade da resposta à dor, o presente estudo teve como objetivo genotipar pacientes portadores de DTM e controles, em relação aos SNPs: COMT *Val(158)Met* (rs4680); *TNFa-308* (rs1800629); *IL6-174* (rs1800795); *IL-1β-3954* (rs1143634); *IL10-592* (rs1800872); *MMP1-1607* (rs1799750) *e TLR4*-896 (rs 4986790).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esse capítulo tem como objetivo expor a literatura mais qualificada e atual e, para isso, será didaticamente dividido em dois grandes tópicos: As disfunções temporomandibulares e os polimorfismos de nucleotídeo único.

2.1 AS DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES

Disfunções Temporomandibulares (DTMs) é um termo coletivo que abrange diferentes desordens relacionadas aos músculos mastigatórios, à articulação temporomandibular (ATM) e às estruturas associadas. As DTMs representam um conjunto de distúrbios musculoesqueléticos relacionados ao sistema mastigatório, com muitos sintomas em comum. Dentre eles, o mais comum é a dor, normalmente localizada nos músculos mastigatórios e/ou na região pré-auricular, sendo agravada pelo movimento mandibular. Dores na mandíbula e/ou maxila, na orelha e na cabeça são queixas frequentes, mas outros sintomas são, também, bastante comuns, como a anormalidade dos movimentos mandibulares, que podem estar limitados ou assimétricos, e os ruídos articulares (DE LEEUW, 2010).

A etiologia das DTMs parece ser multifatorial. Fatores como hábitos parafuncionais, bruxismo, postura corporal deletéria, características oclusais, anormalidades de crescimento, trauma, sobrecargas e estresse têm sido postulados como possíveis fatores etiológicos das DTMs (NILNER, 1983; HARKINS, 1986; BUCKINGHAM et al., 1991; PULLINGER; SELIGMAN; GORNBEIN, 1993; SCHELLHAS; POLLEI; WILKES, 1993; SIMONS; TRAVELL; SIMONS, 1999; REISSMANN et al., 2012). Apesar da vasta literatura a respeito, ainda são necessários trabalhos prospectivos, controlados, aleatorizados e de longo prazo que comprovem uma relação de causa e efeito. Os possíveis fatores etiológicos podem ser divididos em: predisponentes, iniciadores e perpetuantes. Os fatores predisponentes aumentam o risco para o desenvolvimento das DTMs; em outras palavras, predispõem o paciente à doença. Os fatores iniciantes são aqueles que, de fato, provocam o estabelecimento da doença. Já os fatores perpetuantes influenciam

na progressão da doença, contribuindo para sua cronificação (MCNEILL et al., 1980).

Há vinte anos, De Kanter et al. (1993), por meio de uma meta-análise que englobou mais de 16 mil sujeitos de pesquisa, demonstraram que 44% da população estudada apresentaram algum sinal ou sintoma clínico de DTM. Apesar da elevada prevalência observada, em outro estudo demonstraram que cerca de 15% da população afetada consideram os sinais ou sintomas importantes o suficiente para procurar tratamento. Essa discrepância traduz o fato de que, muitas vezes, os sinais de DTM, como por exemplo, os estalidos, são indolores e não afetam de maneira marcante a qualidade de vida do paciente (DE BOEVER; VAN WORMHOUDT; DE BOEVER, 1996). Por outro lado, a DTM pode se tornar uma doença crônica e refratária (TENENBAUM et al., 2001).

A fisiopatologia da dor na ATM é um pouco melhor compreendida do que a da dor miofascial, e, assim, é um ponto de partida conveniente para a discussão dos mecanismos da dor nas DTMs (CAIRNS, 2010). Deslocamentos do disco e doenças articulares degenerativas são patologias comuns da ATM. As osteoartrites são caracterizadas pela deterioração e abrasão da cartilagem articular, assim como pelo espessamento remodelador do osso subjacente, que provoca alterações inflamatórias secundárias, visualizadas pelo exame de ressonância magnética como efusões articulares. A ATM também pode ser afetada na artrite reumatoide; uma condição autoimune que resulta na destruição inflamatória da articulação. Mediadores químicos e citocinas desempenham importante papel tanto na artrite reumatoide quanto na osteoartrite. Independentemente da condição patológica envolvida, a ATM degenerada pode levar a uma variedade de deformidades morfológicas, com perda significativa da função articular e dor (BRINCKERHOFF, 1991; ZARB; CARLSSON, 1999; ISRAEL et al., 2003; TANAKA; DETAMORE; MERCURI, 2008; CAIRNS, 2010).

A inflamação da ATM resulta na liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, em especial o fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) e as interleucinas (SESSLE, 2005; DE LEEUW 2008b; WIESE et al., 2008), que contribuem para a remodelação e degradação da cartilagem articular (VERNAL et al., 2008). A interleucina-1 (IL-l) e a interleucina-6 (IL-6) têm sido detectadas em osteoartrites e desarranjos internos da ATM (HOLT et al., 1992; SHAFER et al., 1994; FU et al.,

1995a). As citocinas são, principalmente, produzidas pelos macrófagos que se infiltram na membrana sinovial. A inflamação da membrana sinovial altera a viscosidade do fluido sinovial e leva à deficiência na lubrificação e nutrição da cartilagem e do disco (SMITH et al., 1989).

Os mediadores inflamatórios excitam os nociceptores presentes na ATM e aumentam a liberação de CGRP e substância P, resultando em edema, vermelhidão e aumento da temperatura, processo conhecido como inflamação neurogênica (TAKEUCHI et al., 2004). O aumento dos estímulos nociceptivos na articulação inflamada também contribui para a indução da sensibilização central e para o reflexo dos músculos da mandíbula (contração protetora) (YU et al., 1996; SESSLE, 2005).

A DTM quando crônica, em especial a DTM miofascial, pode ser considerada uma síndrome dolorosa funcional, assim como a fibromialgia, a síndrome do intestino irritável, a cistite intersticial e a síndrome da fadiga crônica. Acredita-se que essas doenças possuam fatores etiológicos comuns, o que explicaria a grande comorbidade dos sintomas. É interessante notar que as desordens funcionais tendem a se sobrepor no indivíduo afetado; apresentam sensibilização central, com percepção amplificada da dor, e respondem a tratamentos similares, como o uso de antidepressivos e a terapia cognitiva comportamental. Os mecanismos patofisiológicos exatos dessas condições dolorosas permanecem obscuros. Contudo, acredita-se que a percepção dolorosa amplificada, alterações na atividade cerebral e nas funções imunológicas e neuroendócrinas, assim como a predisposição genética, possam estar envolvidas. Estudos futuros devem desvendar se existe um mecanismo predominante, ou um mecanismo unificador, que explique essas alterações funcionais (KIM; CHANG, 2012; SUMA; VEERENDRA KUMAR, 2012; LORDUY et al., 2013).

No caso das síndromes dolorosas funcionais, a dor deixa de ser um fator de proteção. Nessas situações, a dor surge espontaneamente e pode ser provocada por estímulos normalmente inócuos (alodinia); pode ser exagerada e prolongada, em resposta a um estímulo nociceptivo (hiperalgesia); e se espalhar além dos limites da área injuriada (hiperalgesia secundária) (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). A hiperalgesia que sucede uma lesão tecidual é resultado do aumento da sensibilidade dos nociceptores aferentes primários presentes na cercania da região lesionada (sensibilização periférica) (RAJA; CAMPBELL; MEYER, 1984) e do aumento da

excitabilidade dos nociceptores aferentes secundários presentes na medula espinhal (sensibilização central) (WOOLF; WALL, 1986).

O fenômeno da sensibilização periférica acontece a partir de uma resposta inflamatória induzida por uma lesão tecidual. Nessa circunstância, a alodinia e a hiperalgesia ocorrem em função dos mediadores inflamatórios liberados no local da lesão. Por exemplo, quando um dente é extraído, a área inflamada apresenta um aumento da sensibilidade à pressão (hiperalgesia), mediada por nociceptores sensibilizados. Mas é de se esperar que essa reação se resolva dentro de um período razoável de tempo, devido à diminuição da atividade dos nociceptores e consequente diminuição da atividade aferente para o corno dorsal. Contudo, o processo inflamatório e a consequente atividade aferente podem ser de intensidade suficiente para que um processo central seja estabelecido (MERRILL, 2007).

As fibras C são os primeiros nociceptores envolvidos durante o início do processo de sensibilização central, uma vez que produzem correntes sinápticas lentas e estímulos repetitivos, aumentando a despolarização no corno dorsal da medula espinhal, que ocorre como resultado da ativação dos canais de cálcio dependentes de ligantes. Inicialmente, os canais de cálcio são abertos, de forma rápida e de curta duração, pelos receptores AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propiônico), permitindo que íons cálcio adentrem a célula e facilitando a despolarização dos neurônios de variação dinâmica ampla (*wide dynamic range*), ou somente WDR, responsivos a uma ampla variedade de estímulos. Além da ativação dos receptores ionotrópicos, ocorre também a ativação dos receptores metabotrópicos pelo glutamato e substância P, liberando mais cálcio das vesículas intracelulares, aumentando a concentração desse íon e, consequentemente, ativando as enzimas proteína-quinases, que fosforilam o receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA). O canal vinculado ao receptor NMDA, em condições normais, apresenta-se obliterado por um íon magnésio. A ativação desse receptor faz com que ocorra a fosforilação e esse íon seja removido, abrindo o canal e permitindo que íons cálcio adentrem a célula com grande intensidade. Diferentemente do que acontece com o receptor AMPA, a ativação do receptor NMDA é de longa duração e de difícil reversão (THOMPSON; WOOLF; SIVILOTTI, 1993; BURSTEIN et al., 1998; MERRILL, 2007).

Apesar da ativação dos receptores NMDA provavelmente representar um dos principais fatores, parece não existir um mecanismo molecular único responsável pela sensibilização central, uma vez que essa pode ser mediada por diferentes processos capazes de produzir alterações distintas no processamento somatossensorial, como o aumento da excitabilidade da membrana neuronal, facilitação das sinapses e diminuição das influências inibitórias nos neurônios do corno dorsal. Destsa forma, a sensibilização central pode provocar sensações dolorosas que ocorrem mesmo na ausência de patologias ou estímulos dolorosos periféricos e, portanto, o tratamento deve ter como alvo o sistema nervoso central, e não a periferia (WOOLF; SALTER, 2000; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

Lorduy et al. (2013) verificaram que os sintomas de sensibilização central estão relacionados ao maior sofrimento emocional em pacientes portadores de DTMs. Outros estudos demonstraram que fatores psicológicos diferem entre pacientes com DTMs e grupos controle (BUTTERWORTH; DEARDORFF, 1987; HARNESS; DONLON; EVERSOLE, 1990; YOSHIHARA et al., 2005). Também foi demonstrado, em portadores de DTMs, que a depressão e a ansiedade podem ser consideradas fatores de risco para as dores articulares e musculares, respectivamente (KINDLER et al., 2012).

A relação entre ansiedade ou estresse e as DTMs pode ser simplesmente explicada pela maior contração da musculatura mastigatória nessas condições, uma vez que a hiperatividade muscular é um dos mecanismos mais frequentemente sugeridos como causa da dor miofascial (YEMM, 1976; MILLER et al., 1998). Em um experimento onde os participantes imaginavam uma situação estressante, aqueles que portavam DTM miofascial apresentaram maior atividade eletromiográfica do que os controles saudáveis, tanto no músculo masseter quanto no músculo frontal (KAPEL; GLAROS; MCGLYNN, 1989; FLOR et al., 1991). Porém, existe uma explicação mais complexa para essa relação.

Emoções negativas de intensidade moderada podem facilitar a dor. Nessas circunstâncias, quando o perigo é imprevisível, a dor é importante para a detecção de situações de risco, para que a integridade dos tecidos seja mantida. É uma maneira adaptativa de promover o monitoramento ambiental, um mecanismo de vigilância sensorial para melhorar a detecção de ameaças (WALTERS, 1994; RHUDY; MEAGHER, 2000; MEAGHER; ARN; RHUDY, 2001). A expectativa de

sentir dor pode aumentar a sensibilidade dolorosa, principalmente quando não se pode prever o momento em que a dor será sentida (WALTERS, 1994).

Em situações de emoções negativas de grande intensidade, quando a ameaça é iminente e previsível, a reação de luta e fuga provoca como defesa um estado de hipoalgesia. Um interessante experimento demonstrou que veteranos da Guerra do Vietnã, portadores de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), relataram diminuição de 30% na intensidade da dor provocada por estímulos de calor, após serem expostos a vídeos de combate. Não houve redução na intensidade da dor quando os veteranos foram submetidos ao uso da naloxona, um antagonista dos receptores opioides. Os resultados demonstraram, de maneira consistente, a indução de analgesia mediada por opiáceos induzida pelo estresse em pacientes com TEPT (PITMAN et al., 1990).

A amígdala é o centro de detecção de perigo, gerando medo e ansiedade, colocando-nos em situação de alerta. Conexões entre a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal estão envolvidas na modulação da nocicepção mediada pela emoção. Desregulação no circuito de detecção de ameaça nos pacientes com síndromes dolorosas funcionais pode provocar diminuição do limiar das experiências emocionais negativas, emoções negativas mais intensas e prolongadas. Dessa forma, emoções negativas intensas podem provocar hiperalgesia nesses pacientes, e não hipoalgesia, como observado em indivíduos saudáveis (ARNOLD et al., 2008; BERMAN et al., 2008).

Os controles inibitórios nocivos difusos (DNIC) são um dos principais sistemas endógenos de inibição à dor; de acordo com sua teoria, um estímulo nociceptivo irá cancelar outra estimulação nociceptiva (fenômeno “dor inibe dor”), desde que haja uma certa distância entre as superfícies corporais estimuladas. Por meio do teste pressor ao frio, os pacientes com fibromialgia apresentam menor eficiência ao DNIC, explicitando a deficiência do sistema endógeno inibitório da dor (JULIEN et al., 2005; NORMAND et al., 2011).

Robinson et al. (2004) demonstraram que o estado ansioso está positivamente correlacionado com o processo de somatização temporal, sugerindo que a ansiedade pode contribuir com o processamento da dor no sistema nervoso central. Esse efeito foi replicado por Granot et al. (2006) e o trabalho realizado por Edwards et al. (2006) sugeriu que a catastrofização da dor pode ter o mesmo efeito

facilitador. Não coincidentemente, muitos estudos mostram correlação entre emoções negativas e desordens funcionais de dor (HENNINGSEN; ZIMMERMANN; SATTEL, 2003).

O estresse psicológico é conhecido por induzir várias respostas adaptativas dos sistemas fisiológicos, incluindo o aumento da atividade do sistema hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), que promove a secreção de cortisol a partir do córtex suprarrenal e aumenta a atividade do sistema simpático-adrenal-medular (SAM), que segrega adrenalina e noradrenalina através das terminações nervosas periféricas simpáticas e da medula adrenal (AXELROD; REISINE, 1984; UCHINO et al., 1995; MCEWEN, 1998; SCHOMMER; HELLHAMMER; KIRSCHBAUM, 2003). Os níveis do traço ansioso (Inventário de Ansiedade Traço-Estado - IDATE) e as alterações nas concentrações plasmáticas de cortisol, adrenalina e nora-adrenalina foram significativamente correlacionados após indução de estresse psicológico (teste mental de aritmética) em pacientes com DTM miofascial; mas o mesmo não foi observado em indivíduos saudáveis. Esses resultados sugerem que os níveis de ansiedade, em particular o nível de ansiedade-traço, podem ser associados a uma maior sensibilidade dos sistemas HHA e SAM em pacientes com dor miofascial (YOSHIHARA et al., 2005). Evidências emergentes indicam que a desregulação do sistema nervoso autônomo contribui para o aparecimento e cronicidade das DTMs (CARLSON et al., 1993; DE ABREU et al., 1993; BRAGDON et al., 2002; LIGHT et al., 2009; SOLBERG NES et al., 2010).

Portadores de DTMs exibiram uma disfunção na atividade autonômica em relação aos indivíduos saudáveis, caracterizada pela diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), tanto em repouso quanto em resposta a ambos estressores físico (posição ortostática) e psicológico (testes de palavras coloridas de Stroop), demonstrando que, durante todos os domínios de tempo e frequência, o tônus parassimpático cardíaco estava reduzido em comparação aos controles. Os casos com DTMs também apresentaram uma redução indireta da sensibilidade dos baroreceptores (MAIXNER et al., 2011). Outros estudos também indicam um maior tônus simpático como resultado de uma desregulação central nos pacientes com DTM e outras doenças musculares crônicas (LIGHT et al., 2009; HALLMAN; LYSKOV, 2012).

Chalaye et al. (2012) confirmam a presença de níveis crescentes de hiperalgesia somática em pacientes com síndrome do intestino irritável (SII) e fibromialgia. Também observaram padrão disfuncional semelhante para a inibição de dor, acompanhado por respostas autonômicas anormais, que manteve os pacientes (principalmente os com fibromialgia) em um estado de hiperatividade simpática. Resultados recentes mostram que a sensibilidade ao barorreflexo encontra-se reduzida nos pacientes com fibromialgia (KELEMEN et al., 1998; FIGUEROA et al., 2008; REYES DEL PASO et al., 2010). A atividade do barorreflexo também tem sido associada à eficácia dos circuitos descendentes inibitórios de dor (RANDICH; MAIXNER, 1984; DWORKIN et al., 1994; BRUEHL; CHUNG, 2004). Portanto, a função anormal do barorreflexo pode explicar porque os pacientes com fibromialgia apresentam deficiência na inibição descendente de dor, juntamente com pobres ajustes autonômicos (REYES DEL PASO et al., 2011), e porque frequentemente sofrem com comorbidades como fadiga, intolerância ortostática, alterações do sono e dificuldades cognitivas (MARTINEZ-LAVIN; HERMOSILLO, 2000; REYES DEL PASO et al., 2010).

Como vimos acima, essa desregulação central nos pacientes com DTM faz com que o sistema nervoso autonômico seja menos reativo ao estresse físico ou psicológico, uma vez que o tônus simpático já está elevado mesmo em repouso. Essa característica foi relacionada as variantes do gene COMT (MUELLER et al., 2012), responsável por provocar uma estado hiperadrenérgico. As variantes do COMT também estão relacionadas à hipervigilância, à ansiedade, à hipersensibilidade dolorosa e à ineficiência do sistema opioide (ZUBIETA et al., 2003; OLSSON et al., 2005; DIATCHENKO et al., 2006b).

Desse modo, o polimorfismo do gene COMT ilustra como a genética representa um universo valioso de investigação e pesquisa, ainda pouco explorado. No tópico a seguir, o polimorfismo do COMT e de outros 6 genes candidatos será abordado de maneira mais detalhada.

2.2 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO

Apesar de possuir fatores e mecanismos semelhantes, a resposta à dor é caracterizada por sua substancial diferença interpessoal, que pode ser atribuída a fatores como: idade, sexo, deficiência do controle aos estímulos e fatores genéticos (FILLINGIM et al., 2008). No caso da dor, não é diferente, diversos genes relacionados, direta ou indiretamente, com os mecanismos da dor podem apresentar diferenças na expressão, de acordo com a presença ou não de SNPs, demonstrando a importância na caracterização dos polimorfismos de genes alvos para dor, não só para aprimorar o diagnóstico individual, mas também para otimizar as ferramentas terapêuticas de patologias como a disfunção temporomandibular.

Um dos genes mais estudados é gene COMT, responsável por codificar a enzima que recebe o mesmo nome (COMT) que, por sua vez, metaboliza as catecolaminas e faz parte de um mecanismo complexo do reflexo doloroso nociceptivo, agindo, assim, como um modulador essencial da neurotransmissão dopaminérgica e adrenérgica/noradrenérgica (LI; WARSH; GODSE, 1984; CUMMING et al., 1992). Existe um polimorfismo funcional abundante do gene COMT que codifica a substituição de um aminoácido valina (*Val)* por um aminoácido metionina (*Met*) no códon 158 (*Val(158)Met*). Essa substituição está associada a uma diferença de termoestabilidade, levando a uma redução de três a quatro vezes no período de atividade da enzima COMT (LOTTA et al., 1995). Os alelos são codominantes, portanto, os indivíduos com o genótipo *val/val* apresentam maior atividade da COMT; aqueles com o genótipo *met/met*, a menor atividade da COMT; e os indivíduos heterozigotos, apresentam atividade intermediária.

Diatchenko et al. (2005) analisaram cinco SNPs do gene COMT entre 202 mulheres jovens e saudáveis. Eles construíram três haplótipos, que foram denominados de sensibilidade baixa à dor (LPS), sensibilidade média à dor (APS), e sensibilidade alta à dor (HPS), com base em suas associações com as medidas de sensibilidade à dor experimental. Seguiram prospectivamente esses indivíduos, para determinar novos casos com sintomas de DTM, e os resultados indicaram que os indivíduos com pelo menos um haplótipo LPS tiveram menos da metade da probabilidade de desenvolver DTM, em comparação com aqueles sem qualquer haplótipo LPS.

Em ratos, foi demonstrado que a atividade diminuída da enzima COMT aumenta a sensibilidade mecânica e térmica à dor. Fenômeno que pode ser bloqueado por antagonistas não-seletivos β-adrenérgicos (propranolol) ou a administração combinada de antagonistas seletivos β2 e β3-adrenérgicos (NACKLEY et al., 2007). Em estudo piloto, avaliou-se a ação do propranolol na redução da dor clínica e experimental em pacientes com DTM. O número de pacientes que relataram redução na classificação da intensidade da dor foi maior durante o tratamento com propranolol, em comparação com o tratamento placebo. Indivíduos com haplótipos que determinam atividade enzimática diminuída da COMT foram os mais beneficiados. Benefício menor foi observado em indivíduos heterozigóticos e nenhum benefício foi observado em homozigóticos (*val/val*) (TCHIVILEVA et al., 2010). Dessa forma, os haplótipos da COMT podem ser usados para identificar um subgrupo de pacientes com DTM que se beneficiaria do tratamento com propanolol.

Até agora, observamos como os SNPs podem influenciar no limiar da sensibilidade dolorosa. Em relação à dor crônica nociceptiva, observa-se uma associação com a resposta inflamatória e sua consequente injúria tecidual. As respostas imunes e inflamatórias, bem como a cicatrização de feridas, a hematopoiese e a homeostase, sofrem importante influência das citocinas, que são mediadores da comunicação célula-célula. As doenças inflamatórias crônicas são frequentemente caracterizadas por fases cíclicas de infiltração celular e ruptura do tecido, que parecem ser iniciadas ou mantidas, em parte, pela atividade de citocinas (OGURA et al., 2005).

Estudos observaram que as concentrações de citocinas inflamatórias clássicas, como é o caso do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1beta (IL-1b), interleucina-6 (IL-6) e metaloproteinases da matriz (MMPs), foram significativamente maiores no líquido sinovial de pacientes portadores de DTM do que em controles saudáveis ($p<0,05$). Isso demonstra que as citocinas presentes no líquido sinovial podem participar da patogênese da DTM, e que a presença de SNPs nos genes correspondentes à transcrição dessas citocinas pode modular a intensidade da resposta à dor (FU et al., 1995a; KUBOTA et al., 1998; TAKAHASHI et al., 1998).

Foi demonstrado, em ratos, que o estresse psicológico pode provocar uma regulação para cima (*up-regulation*) do TNF-α e, consequentemente, afinamento da cartilagem do côndilo mandibular (LV et al., 2012). O nível de TNF-α foi positivamente correlacionado com o de IL-6, e com os receptores TNFRs-I e TNFRs-II temporomandibulares (EMSHOFF et al., 2000; KANEYAMA et al., 2005). Ainda, fibroblastos sinoviais de ATMs humanas, tratados laboratorialmente com TNF-α, apresentaram como resposta produção significativamente aumentada de IL-8, oncogene relacionado ao crescimento (GRO), proteína-1-monócito-quimioatraente (MCP-1) e RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), o que demonstra a importância do TNF-α para o início do processo inflamatório (OGURA et al., 2005). Por esse motivo, não é surpresa que as concentrações de TNF-α sejam significativamente maiores no líquido sinovial de pacientes com DTM do que nos controles, estando sua presença associada à membrana sinovial cronicamente inflamada e à dor (EMSHOFF et al., 2000).

Dessa forma, o polimorfismo presente na região promotora do gene TNFA (responsável por codificar o TNF-α) na posição -308 (*TNFA-308 G/A*; rs1800629) é um exemplo do potencial dos SNPs na modulação da resposta inflamatória. A posse do alelo A (G/A ou A/A) está associada com o aumento da produção de TNF-α (POLI et al., 2000), influenciando significativamente na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, como a doença periodontal, a artrite reumatoide, a síndrome do intestino irritável e as migrâneas.

Níveis aumentados de TNF-α nos tecidos gengivais de pacientes portadores de doença periodontal (DP) crônica foram associados ao polimorfismo *TNFA-308 G/A*, e, esse último, considerado uma influência potencial na evolução da doença (TROMBONE et al., 2009).

No caso da artrite reumatoide (AR), uma doença autoimune, sistêmica e crônica, que resulta na inflamação das estruturas articulares e extra-articulares, cuja etiologia permaneçe elusiva, existe evidências substanciais de que o TNF-α seja uma citocina chave de sua patogênese. Isso porque o TNF-α é um pivô da estimulação de citocinas críticas para o início e perpetuação da inflamação na AR (FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996). O alelo A do polimorfismo *TNFA-308* tem sido associado com a AR em mexicanos na América do Norte, em colombianos e chilenos na América do Sul (CORREA; GOMEZ; ANAYA, 2004; RODRIGUEZ-

CARREON et al., 2005; LEE; JI; SONG, 2007); bem como com formas mais graves da doença em indivíduos na Amazônia brasileira (BOECHAT et al., 2013).

Os agentes inibidores de TNF-α (anti- TNF-α) revolucionaram o tratamento da AR. Apesar dos resultados clínicos convincentes, nem todos os pacientes respondem a esses agentes. Por meio de uma meta-análise, foi demonstrado que a probabilidade de sucesso do tratamento com agentes anti- TNF-α é influenciada pela variante do polimorfismo *TNFA-308.* Os pacientes portadores do genótipo G/G são mais suscetíveis a responder aos anti-TNFA, em comparação aos pacientes portadores de pelo menos um alelo A. Esse efeito parece estar presente seja qual for o tipo de agente anti-TNF-α (antagonista de receptor ou anticorpo monoclonal) (O'RIELLY et al., 2009).

Outra desordem funcional comum, a Síndrome do Intestino Irritável (SII), é caracterizada por dor abdominal recorrente e alteração dos hábitos intestinais. Vários mecanismos têm sido propostos para sua fisiopatologia, como: hipersensibilidade visceral, motilidade intestinal alterada e fatores psicossociais. Foi demonstrado que o genótipo maior produtor de *TNFA-308* (A/A ou G/A) foi significativamente mais prevalente em pacientes com SII, em relação aos controles (41% versus 30%, respectivamente) (VAN DER VEEK et al., 2005).

Muitas evidências, em animais e em humanos, apontam para o papel da inflamação na geração da dor durante as crises de migrânea, com o envolvimento de moléculas como: o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o óxido nítrico e as citocinas (LONGONI; FERRARESE, 2006). Níveis elevados de TNF-α foram reportados em 20 pacientes afetados por migrânea sem aura, quando comparados com 17 pacientes com dor de cabeça do tipo tensional crônica (COVELLI et al., 1990). Foi demonstrado que a frequência do genótipo *TNFA-308 G/G* é significativamente maior em pacientes sem migrâneas. Assim como a diferença na distribuição das frequências dos alelos, sendo o *TNFA-308* G sobre-representado no grupo Controle e o *TNFA-308 A* sobre-representado no grupo com migrâneas, estando esse último associado a níveis mais elevados de TNF-α (YILMAZ et al., 2010). Em outro estudo onde 77 polimorfismos foram avaliados em mais de 25 mil mulheres, a presença do alelo A *(TNFA-308)* foi associada ao maior risco de migrâneas com aura (SCHURKS et al., 2009).

Apesar dos fortes indícios do possível envolvimento do polimorfismo *TNFA-308 G/A* na etiopatogenia das DTMs, não há nenhum trabalho publicado sobre o tema até o momento.

Outra citocina inflamatória clássica associada às doenças inflamatórias é a IL-6. Ela atua nas respostas imunes inata e adaptativa, na estimulação da hematopoiese e na produção de proteínas de fase aguda, por meio do crescimento dos hepatócitos e de linfócitos B. São produzidas por vários tipos de células, sejam elas linfoides ou não linfoides, tais como linfócitos T e B, monócitos, fibroblastos, ceratinócitos, células endoteliais e várias células tumorais. Apesar de essencial para o organismo, em excesso pode provocar fenômenos clínicos desfavoráveis. Seu importante papel nas reabsorções ósseas foi comprovado por meio de atividade osteoclástica *in vitro* (EMERY; SALMON, 1991; KISHIMOTO; AKIRA; TAGA, 1992; AKIRA; TAGA; KISHIMOTO, 1993; FU et al., 1995b; NISHIMOTO; KISHIMOTO; YOSHIZAKI, 2000).

A detecção de IL-6 no líquido sinovial de ATMs com desarranjos internos pode chegar a 89%. A concentração de IL-6 no fluido sinovial foi correlacionada com a gravidade da sinovite vista artroscopicamente e com o grau de edema articular mostrado pela ressonância magnética (MRI). Essa correlação não foi observada para TNFA e IL-1beta (NISHIMURA et al., 2002; SEGAMI et al., 2002). Por meio da imuno-histoquímica, também se observou correlação entre a percentagem de células da membrana sinovial coradas para IL-6 e o edema articular visto na MRI. Ainda, a presença de IL-6 no líquido sinovial pode indicar insucesso do tratamento dos desarranjos internos da ATM após artrocentese (NISHIMURA et al., 2004).

A concentração de IL-6 no líquido sinovial foi correlacionada com dor articular e com alterações degenerativas condilares, observadas radiograficamente (FU et al., 1995b), e com o desenvolvimento de osteoartrite (KANEYAMA et al., 2002). A IL-6 está presente no líquido sinovial de diversas artropatias, mas é detectada em níveis mais elevados nas artropatias inflamatórias do que nas osteoartrites. Os sinoviócitos são uma fonte potente de IL-6, o que pode contribuir para as importantes manifestações locais e sistêmicas das artrites inflamatórias (GUERNE et al., 1989). Foi demonstrado que a IL-6 é uma citocina chave envolvida na patogênese da artrite reumatoide, e o aumento das concentrações de IL-6 nas articulações ou do seu nível no sangue está correlacionado com a atividade da

doença (GOTTENBERG et al., 2012). Em ratos com artrite induzida por antígeno, a IL-6 desempenha papel chave tanto na sua indução quanto manutenção e, portanto, sugerindo que o bloqueio da IL-6 pode ser benéfico para o tratamento da artrite reumatoide (OHSHIMA et al., 1998).

O tocilizumabe é um anticorpo humanizado monoclonal que se liga aos receptores da IL-6 e bloqueia a ação dela. Estudos randomizados controlados duplo-cego têm mostrado que o tratamento com tocilizumabe combinado a outras drogas antirreumáticas modificadoras de doença resulta em melhora rápida e sustentada de vários sinais e sintomas da artrite reumatoide, em diferentes populações (GABAY et al., 2013).

Existe um SNP no gene *IL6 -174*(G/C) cujo alelo C implica na transcrição reduzida da IL-6, em comparação com o alelo G. Foi demonstrado que o genótipo CC é significativamente menos comum em indivíduos com artrite juvenil sistêmica do que em controles, podendo desempenhar papel protetor contra o desenvolvimento dessa doença (FISHMAN et al., 1998). Em um estudo mais recente, o polimorfismo da IL-6 foi novamente correlacionado com danos radiográficos de curto prazo em pacientes com artrite reumatoide juvenil (ARJ), podendo ser utilizado como um precoce indicador de prognóstico (G/C, com maior risco e G/G com menor risco) (OEN et al., 2005).

Variantes do gene promotor da IL-6 G-597A, G-572C e G-174C (rs1800797, rs1800796 e rs1800795, respectivamente) foram investigados em pacientes portadores de osteoartrite interfalângica distal sintomática; uma vez que já existiam indícios que de que essas variantes poderiam afetar tanto a transcrição quanto a secreção de IL-6. Foi observado que a presença de alelos G em *loci* polimórficos comuns do gene promotor da IL-6 estava associada com resultados mais graves de osteoartrite interfalângica distal sintomática; e sugerido que antagonistas específicos dos receptores da IL-6 poderiam inibir a cascata inflamatória na cartilagem articular e ser uma opção relevante para a concepção de novas intervenções terapêuticas para essa doença, no futuro (KAMARAINEN et al., 2008).

O SNP *IL6 -174* (G/C) também pode influenciar nas condições patológicas dentárias. A ocorrência do genótipo alelo G do SNP *IL6 -174* (G/C) foi associada com manifestações de abcessos dentários (DE SÁ et al., 2007) e com a presença de doença periodontal (TRINDADE et al., 2013). Nas DTMs, a expressão da citocina

pró-inflamatória IL-6 apresenta-se significativamente aumentada e, sabendo do caráter destrutivo de tal citocina em doenças inflamatórias, o SNP *IL6-174* (rs1800795) demonstra-se um alvo interessante na patogênese das DTMs.

Da mesma forma que o SNP *TNFA-308* e o *IL6 -174*e, o SNP *IL-1β (3954)* demonstrou ter associação com a DP crônica (FERREIRA et al., 2008; KARIMBUX et al., 2012) e com a artrite reumatoide (LEE; JI; SONG, 2009). Um interessante estudo demonstrou uma diferença significativa na distribuição dos genótipos *IL-1β (3954)* em pacientes com AR e periodontite, em comparação com indivíduos controles com apenas periodontite ou saudáveis. Essas observações levaram à constatação de que os indivíduos com o alelo T do polimorfismo *IL-1β (3954)* são suscetíveis à AR e à periodontite (KOBAYASHI et al., 2009).

Além da doença periodontal e da artrite reumatoide, o polimorfismo *IL-1β (3954)* foi associado à síndrome da boca ardente (SBA). Uma maior frequência do genótipo CT do polimorfismo *IL-1β (3954)* foi observada no grupo com SBA, em comparação com o grupo Controle (GUIMARÃES et al., 2006), observação coerente com resultados previamente descritos sobre o potencial das interleucinas em iniciar a hiperalgesia de processos inflamatórios e neuropáticos (OPREE; KRESS, 2000).

Não só os SNPs de citocinas pró-inflamatórias podem influenciar no aumento da severidade ou na suscetibilidade de doenças inflamatórias; polimorfismos em citocinas anti-inflamatórias, como é o caso do SNP *IL-10-592,* também apresentam resultados interessantes. O gene promotor da IL-10 (lócus 1q32. 1) está envolvido na inflamação e imunorregulação, uma vez que a IL-10 funciona como inibidor das citocinas pró-inflamatórias. A importância da IL-10 no delicado equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e inibidores de citocinas na patogênese da disfunção temporomandibular foi revisada por Kacena et al. (2001).

Diferenças hereditárias na produção de IL-10 foram relatadas, e várias sequências polimórficas foram identificadas no gene promotor da IL-10 (LOWE et al., 2003; YILMAZ; NUTILE-MCMENEMY; DELEO, 2005; CAPASSO et al., 2007). Três SNPs do gene promotor da IL-10 (–1082 G/A, –819 C/T, –592 C/A) mostram forte desequilíbrio de ligação e constituem dois haplótipos comuns, designados como ATA e GCC. Em função do desequilíbrio de ligação, a presença desses haplótipos pode ser totalmente determinada pela análise do polimorfismo -592 C/A, em que a ocorrência do alelo A indica a presença do haplótipo ATA (CRAWLEY et al., 1999;

EDER et al., 2007). O haplótipo ATA tem sido associado com a diminuição da síntese de IL-10, *in vitro* e *in vivo* (CRAWLEY et al., 1999; BERGLUNDH et al., 2003), e é frequentemente associado a condições patológicas (SHIN et al., 2005; CHUNG et al., 2007). Claudino et al. (2008) demonstraram que o SNP *IL10-592* é funcional na periodontite crônica, estando associado a baixos níveis de expressão de RNA mensageiro da IL-10, o que, supostamente, influenciaria na progressão da doença.

É característica de ATMs degeneradas o desequilíbrio entre a síntese e a destruição de diferentes tipos colágenos e agrecanos da matriz extracelular (ECM). As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de enzinas responsáveis pela proteólise de todos os componentes da matriz extracelular, como o colágeno, a fibronectina e os proteoglicanos.

A MMP-1 é responsável por regular a degradação dos colágenos intersticiais e, por isso, é também chamada de colagenase. *Loci* polimórficos foram identificados na região promotora do gene MMP1, e foram relacionados às diferenças hereditárias na expressão da enzima degradadora de colágeno MMP-1 (KANAMORI et al., 1999; STERNLICHT; WERB, 2001). A adição de uma guanina (G) na posição -1607 do gene promotor de MMP1 (*MMP1-1607*, rs1799750) foi associada com o aumento da atividade transcricional, caracterizando, portanto, um polimorfismo funcional, que tem sido associado com diferentes doenças (KANAMORI et al., 1999; PIRHAN et al., 2008; REPEKE et al., 2009). Particularmente com relação à DTM, os genótipos *MMP1-1607 2G/2G* foram associados com a presença de degeneração nas ATMs, tornando-se, assim, alvo em potencial para explicar a suscetibilidade aos processos degenerativos (PLANELLO et al., 2011).

Além de enzimas e citocinas, proteínas transmembrana, como os receptores *Toll-like* (TLR), também podem influenciar no processo inflamatório. Os TLRs fazem parte de um sistema chave de detecção por meio do qual as células da glia são ativadas, liberando, por sua vez, citocinas pró-inflamatórias (MILLIGAN; WATKINS, 2009; NICOTRA et al., 2012). Recentes evidências apontam o papel da ativação pró-inflamatória das células da glia, encontradas no sistema nervoso central (SNC), para iniciação e progressão da dor crônica (DE LEO; TAWFIK; LACROIX-FRALISH, 2006; MILLIGAN; WATKINS, 2009). Os TLRs constituem o sistema imunológico inato ou não específico, capaz de detectar moléculas “self”, conhecidas como

padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), ou moléculas "non-self", produzidas por micro-organismos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Diferentes agonistas exógenos são reconhecidos por diferentes TLRs: lipopeptídeos são reconhecidos pelo homodímero TLR2 ou pelos heterodímeros TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6; RNA viral de fita simples, pelo TLR7; e os lipopolissacarídeos, pelo TLR4 (GUO; SCHLUESENER, 2007). A ligação dos TLRs aos PAMPs desencadeia a cascata de transduções de sinal, conduzindo à ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) e da quinase c-Jun N-terminal (JNKs) (MUZIO et al., 1998), que induzem a transcrição de genes responsáveis por codificar citocinas e quimiocinas envolvidas na iniciação do processo inflamatório (TRINCHIERI; SHER, 2007).

Os TLRs têm sido implicados em modelos pré-clínicos de dor crônica (NICOTRA et al., 2012). O bloqueio dos TLRs quer farmacologicamente (HUTCHINSON et al., 2008) ou geneticamente (TANGA; NUTILE-MCMENEMY; DELEO, 2005; KIM et al., 2007), reduziu a ativação da microglia, o nível de citocinas pró-inflamatórias e a dor neuropática induzida em animais (NICOTRA et al., 2012). Entre os diversos polimorfismos, o SNP Asp299Gly (*TLR4 rs4986790)* do gene TLR4 é um dos mais famosos e bem estudados, com um padrão de frequência que pode variar de 0 a 9%, dependendo da população avaliada (ALI; TAMBOLI, 2008). Seus genes têm sido considerados candidatos na etiologia de doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatoide, a doença de Crohn, a SII e a periodontite (HONG et al., 2007; OZTURK; YILDIZ, 2011; BELMONTE et al., 2012; LEE; BAE; SONG, 2013).

Assim, indiferentemente do mecanismo (nociceptivo ou inflamatório), a percepção da dor apresenta-se como um processo físico-anatômico multifacetado, influenciado por vários componentes e caracterizado por sua substancial diferença interpessoal. Entre esses componentes, o fator genético mostra-se, por meio dos polimorfismos, extremamente importante e significativo nas doenças cuja principal queixa é a dor. Porém, apesar da importância, o fator genético não tem sido considerado como um dos fatores etiológicos principais (EGGLESTON, 1980). Além disso, estudos que tentaram encontrar um padrão de segregação em famílias com casos de DTMs (RAPHAEL et al., 1999), ou usaram modelos individuais (HEIBERG et al., 1980), sugeriram que as DTMs não são desordens herdadas. No entanto, os

indivíduos não são igualmente suscetíveis às DTMs. Independentemente do risco familiar, genótipos diferentes podem contribuir para a suscetibilidade a um particular desenvolvimento clínico da doença ou à resposta a um determinado tratamento. Portanto, os sintomas de DTMs devem ser entendidos como uma resposta individual complexa e peculiar, com queixas específicas, podendo ser amplificados ou atenuados em função da composição genética original (STOHLER, 2004; NISSENBAUM et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O melhor entendimento da influência das variantes genéticas nas DTMs pode trazer contribuições substanciais na compreensão de sua etiopatogenia e, consequentemente, avanços no diagnóstico individualizado e na conduta terapêutica.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivos:

- Testar a hipótese nula de que não há diferença entre as frequências genotípicas e de alelos dos SNPs candidatos entre o grupo com Disfunção Temporomandibular (DTM) e o grupo Controle.
- Determinar, nos casos com DTM, a influência dos SNPs candidatos na sensibilidade dolorosa mecânica experimental (LDP).
- Determinar, nos casos com DTM, a influência dos SNPs candidatos na intensidade e no tempo de dor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

A realização desse trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos, da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (Processo n°. 118/2010), no dia 06/07/2011 (Anexo A).

4.1 AMOSTRA

Todos os pacientes participaram da pesquisa de forma voluntária: foram informados sobre a intenção da pesquisa e, após estarem cientes, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

Foram selecionados 243 participantes voluntários, divididos em dois grupos: DTM e controle.

4.1.1 Grupo com DTM

Composto por 152 indivíduos portadores de Disfunção Temporomandibular, 136 do sexo feminino e 16 do sexo masculino, com idade média de 36 anos (18 – 65 anos; DP=11,01). Os pacientes foram selecionados por meio de um questionário e um exame físico. A classificação desses pacientes obedeceu aos critérios propostos pela Academia Americana de Dor Orofacial (DE LEEUW 2008a) (Anexo C).

Os critérios utilizados para a seleção dos pacientes foram os preconizados pelo Guia de Diagnóstico e Tratamento das Dores Orofaciais da Academia Americana de Dor Orofacial (AAOP) (DE LEEUW, 2010). Os critérios diagnósticos da Academia Americana de Dor Orofacial são apresentados como adendo na Classificação Internacional dos Distúrbios de Cefaleias (HEADACHE CLASSIFICATION SUBCOMMITTEE OF THE INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004).

Critérios de inclusão:

Indivíduos de ambos os sexos, com 18 a 60 anos de idade, portadores de deslocamentos do disco articular com ou sem redução, distúrbios articulares inflamatórios e distúrbios dos músculos mastigatórios (mialgia local, dor miofascial e mialgia centralmente mediada). Ressalta-se que, independentemente da patologia apresentada, o relato de sintomatologia dolorosa foi condição obrigatória para inclusão nesse grupo, ou seja, é um grupo composto por indivíduos com DTM dolorosa.

Critérios de exclusão:

Presença das seguintes condições patológicas: distúrbios congênitos ou de desenvolvimento (aplasia, hipoplasia, hiperplasia, displasia, neoplasia) neuropatias, síndrome da boca ardente, dor dentária, otite.

4.1.2 Grupo Controle

Composto por 91 indivíduos saudáveis, 82 do sexo feminino e 9 do sexo masculino, sem sinais e/ou sintomas presentes de Disfunção Temporomandibular ou histórico de DTM no passado, e com idade média de 35 anos (18 – 62 anos; DP = 11,04). O mesmo exame clínico realizado para a seleção dos pacientes com DTM foi empregado na seleção dos indivíduos assintomáticos.

Critérios de inclusão:

Indivíduos de ambos os sexos entre 18 a 60 anos de idades.

Critérios de exclusão:

Presença das seguintes condições patológicas: Disfunções Temporomandibulares articulares ou musculares, síndrome dolorosa miofascial cervical, fibromialgia, síndrome do intestino irritável, síndrome da fadiga crônica, cefaleia tipo tensional crônica, e migrâneas crônicas.

4.2 PROCEDIMENTOS

4.2.1 Anamnese

a) Escala de dor (Anexo D)

A Escala Visual Analógica (EVA) foi utilizada para avaliar a intensidade da dor relatada pelos pacientes no momento atual, a média de dor nos últimos trinta dias e a pior dor nos últimos trinta dias. Ela é representada por uma reta de 100 mm, onde na extremidade esquerda lê-se “sem dor” e na direita lê-se “pior dor imaginável”, e o paciente deve marcar, com um traço vertical cortando essa reta, onde ele acha que sua dor estaria localizada naquele momento. Uma das vantagens da EVA é reduzir a influência de respostas prévias, quando muitas e repetidas respostas são solicitadas a um mesmo paciente. Além disso, aumenta a probabilidade de que cada resposta seja, de fato, baseada na experiência subjetiva do momento (TORRANCE; FEENY; FURLONG, 2001).

b) Tempo de dor

Os pacientes foram questionados quanto ao histórico da dor, e sobre quando eles sentiram pela primeira vez o sintoma de dor.

c) Comorbidades dolorosas crônicas

Os pacientes foram questionados sobre diagnóstico prévio de fibromialgia, síndrome do intestino irritável e síndrome da fadiga crônica. Já as cefaleias primárias foram classificadas obedecendo aos critérios propostos pela Segunda Edição da Classificação Internacional de Cefaleia (HEADACHE CLASSIFICATION SUBCOMMITTEE OF THE INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2004; OLESEN et al., 2006).

4.2.2 Exame físico

a) Limiar de dor à pressão (LDP)

As medições dos LDPs foram realizadas bilateralmente nas seguintes regiões: aspecto lateral da ATM, músculo temporal (porção anterior), corpo do masseter e calcanhar de Aquiles (sítio não trigeminal). As medições, em Kgf, foram realizadas com a utilização de um algômetro da marca KRATOS®, por meio de uma haste com ponta circular plana de 1 cm², através da qual uma pressão constante e crescente de 0,5 kg/cm²/seg (REID; GRACELY; DUBNER, 1994) foi aplicada perpendicularmente à área avaliada.

Enquanto a palpação era realizada com uma mão, a outra servia de anteparo para que o paciente não retirasse a cabeça da posição (Figura 1). Quando a pressão passava a ser percebida como dor, o sujeito da pesquisa pressionava um dispositivo que ficava em seu poder, registrando no visor do algômetro o valor da pressão nesse exato momento.

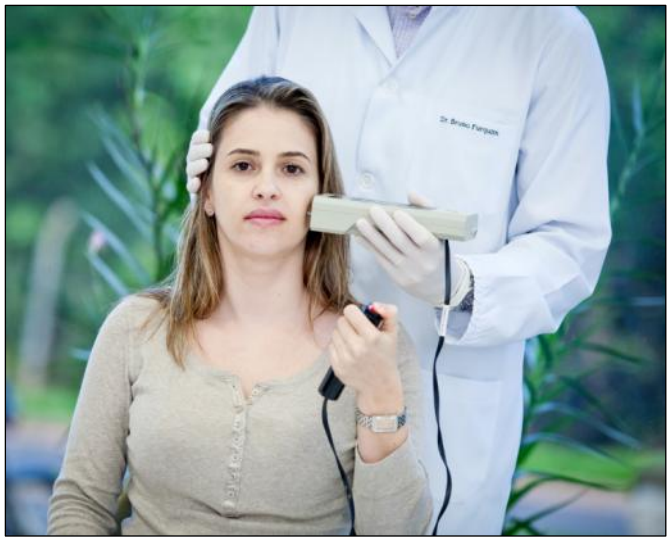

Figura 1 - Algometria do músculo masseter

b) Exame físico da articulação temporomandibular e musculatura mastigatória

Após o teste do LDP, a ATM e sua musculatura foram fisicamente avaliadas para que a DTM pudesse ser diagnosticada. O exame físico sucedeu a algometria, para evitar que o fenômeno de somação temporal pudesse influenciar nos valores de LDP. Durante a abertura bucal, a trajetória e a amplitude do movimento mandibular foram analisadas, bem como a presença de sintomatologia dolorosa e de ruídos articulares (estalos, crepitação, hipermobilidade). Tanto a ATM quanto os músculos mastigatórios foram inspecionados quanto à sensibilidade à palpação. No caso da musculatura mastigatória, a presença de pontos de gatilho e dor referida foi considerada.

4.2.3 Avaliação genética

A avaliação genética compreendeu a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de genes propostos como candidatos por contribuírem para as DTMs, influenciando na percepção individual à dor (ZUBIETA et al., 2003; DIATCHENKO et al., 2005; BUSKILA, 2007) ou na resposta inflamatória (MOVAT, 1987; GORDON; WOFSY, 1990; SANDLER et al., 1998). Foram avaliados os seguintes SNPs: COMT *Val(158)Met* (rs4680); *TNFA-308* (rs1800629); *IL6-174* (rs1800795); *IL-1β-3954* (rs1143634); *IL10-592* (rs1800872); *MMP1-1607* (rs1799750); *TLR4-896 (rs4986790).*

Tabela 1 - Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes candidatos

Gene candidato	SNP	Número de identificação de referência do SNP (rs)
COMT	A/G	rs4680
TNFA	G/A	rs1800629
IL6	G/C	rs1800795
IL-1β	C/T	rs1143634
IL10	C/A	rs1800872
MMP1	1G/2G	rs1799750
TLR4	A/G	rs4986790

4.2.3.1 Coleta do material biológico e extração de DNA

A saliva foi coletada utilizando-se o kit para coleta de DNA Oragene OG-500™, seguindo as instruções do fabricante (DNA GENOTEK, 2004b). Os participantes foram orientados a friccionar a língua em torno do interior da boca por cerca de 15 segundos e, em seguida, depositar cerca de 2 ml de saliva no copo de coleta. Após a coleta adequada, a tampa era colocada no frasco e fechada com firmeza. Os copos de coleta são projetados de modo que, quando a tampa fica bem presa, a solução do compartimento inferior do frasco é liberada e se mistura com a saliva. Assim começa a fase inicial de extração do DNA, estabilizando a amostra de saliva para o armazenamento em longo prazo na temperatura ambiente ou em *freezers* de baixa temperatura (BIRNBOIM, 2004; DNA GENOTEK, 2004a). Com esse método, amostras inteiras podem ser estocadas e transportadas em temperatura ambiente (ROGERS et al., 2007). Uma vez coletadas as amostras com o DNA Oragene OG-500™, a solução preserva a integridade do DNA, permitindo os passos seguintes, realizados conforme previamente descrito na literatura (CLAUDINO et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; REPEKE et al., 2009; TROMBONE et al., 2009; GARLET et al., 2010), compreendendo basicamente uma sequência de fenol/clorofórmio seguida pela precipitação com solução de etanol. Uma vez isolado, o DNA será diluído em TE e quantificado em um nanofotômetro Nanodrop™, também utilizado na análise da pureza e integridade da amostra.

Figura 2 - Kit para coleta de DNA Oragene™

Figura 3 - Coleta da saliva com Kit DNA Oragene

Figura 4 - Processo de purificação do DNA: homogeneização e coleta de 500 µL da solução (Oragene/saliva) para tubos Eppendorf de 1,5 mL

Figura 5 - Encubação da amotra a 50ºC em banho-maria por 1 hora

Figura 6 - **A)** Solução purificadora Oragene (Oragene Purifier); **B)** adição de 20 µL nos 500 µL da solução Oragene/saliva; **C)** homogeneização por vortex (5 segundos)

Figura 7 - **A)** Encubação da amostra em gelo por 10 minutos; **B)** amostra Oragene/saliva/Purifier após encubação; **C)** centrifugação a 13.000 rpm /5 min à temperatura ambiente

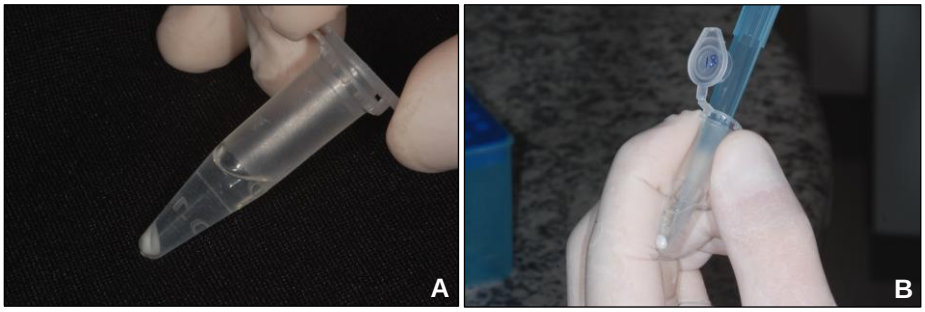

Figura 8 - **A)** Formação do pellet de impurezas; **B)** coleta do sobrenadante sem o precipitado, para um novo Eppendorf de 1,5 mL

Figura 9 - **A)** Adição de 500 µL de álcool absoluto; **B)** aguardar por 10 minutos e centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente

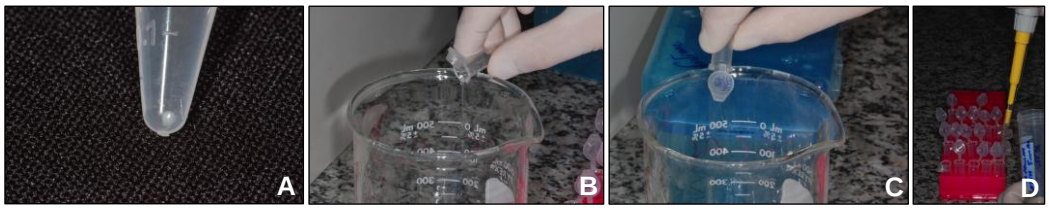

Figura 10 - A) Pellet de DNA; B) descarte do sobrenadante; **C)** adição de 250 µL de álcool a 70%; **D)** repouso de 1 minuto e novo descarte de sobrenadante

Figura 11 - A) Adição de 100 µL de solução tampão estabilizante em pH 8.0; **B)** homogeneização por vortex / 5 segundos e acondicionamento em geladeira por 48 horas

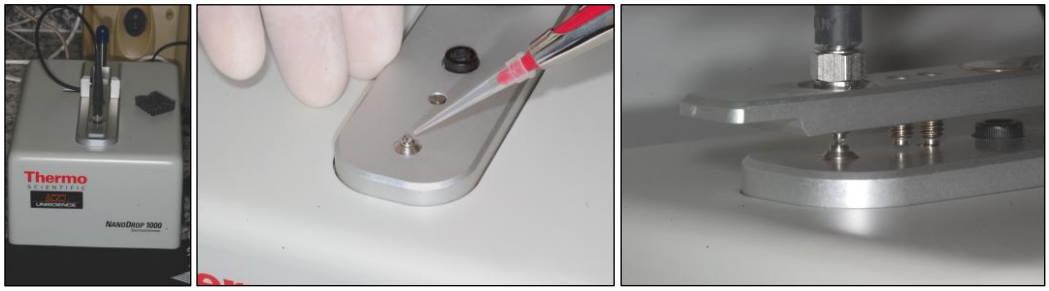

Figura 12 - Processo de quantificação de DNA - espectrofotômetro Nanodrop™ (0,5 µL da amostra)

4.2.3.2 Análise dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)

As análises dos SNPs alvo foram realizadas pelo método de discriminação alélica baseado na técnica de PCR (*polimerase chain reaction*, ou reação em cadeia da polimerase) em tempo real (Real Time PCR), com a utilização de ensaios *TaqMan™ SNP genotyping assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA), pré-padronizados e validados experimentalmente. Tal técnica permite a análise dos

alelos variantes de um SNP em um determinado segmento de DNA, consistindo de um mix já devidamente otimizado contendo, além dos reagentes caracteristicamente presentes nas reações de PCR (DNTP, Taq polimerase e *buffers* próprios), um par de oligonucleotídeos (*primers*) e um par de sondas marcadas com fluoróforos distintos (VIC e FAM) para cada um dos alelos alvo (alelo ancestral e alelo polimórfico). Enquanto os oligonucleotídeos são desenhados especificamente para as regiões adjacentes (*upstream* e *downstream*) ao sítio potencialmente polimórfico, as sondas hibridam com o DNA de acordo com o alelo presente, sofrendo, posteriormente, clivagem, pela ação exonucleásica da Taq polimerase durante o período de extensão, resultando, dessa forma, na liberação do fluoróforo da ação do *quencher* presente na sonda e emitindo fluorescência específica, captada pelo aparelho ViiA7 (Applied Biosystems, Foster City, CA). O *software* do aparelho, ao final da reação, determina, então, a partir do tipo de fluorescência emitida pela amostra, qual sonda hibridou-se em cada amostra, assim definindo o genótipo alvo. Se a mesma fluorescência é liberada por ambas as fitas de DNA, o indivíduo é determinado como homozigoto para o alelo correspondente, enquanto a emissão simultânea de fluorescências distintas caracteriza os indivíduos heterozigotos. Cabe ressaltar que, previamente, todos os ensaios foram funcionalmente testados e otimizados, e o protocolo técnico da reação foi executado de acordo com as instruções do fabricante, uma vez que tal protocolo se mostra eficiente, de acordo com nossa experiência prévia. Foram utilizados, basicamente, 10ng de DNA genômico da amostra, 1X TaqMan™ SNP *genotyping assays*, 1X TaqMan™ Universal MasterMix, H20 q.s.p. 5uL; tendo como condições de ciclagem um passo inicial de 30 seg a 60ºC; 10 min a 95ºC, seguidos de 40 ciclos de 15 seg a 92ºC e 60 seg a 60ºC, e um passo final, para leitura, de 30 seg a 60ºC.

Figura 13 - Adição de 2 µL de alíquotas de DNA, purificação com 0,25 µL de água MiliQ, 0,25 µL da solução de *primers* específicos mais sonda e 2,5 µL da solução Genotyping MasterMix (Oragene)

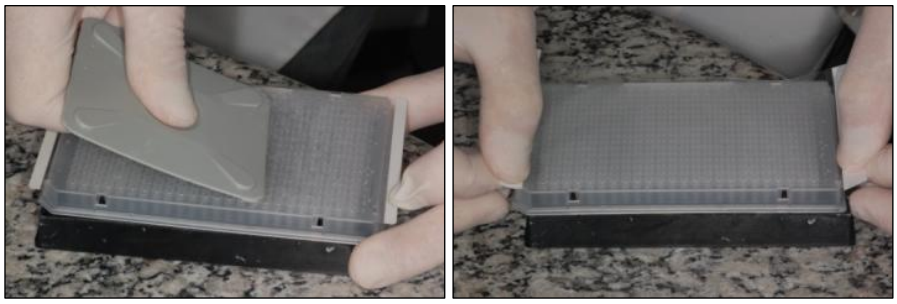

Figura 14 - Selamento da placa para homogeneização

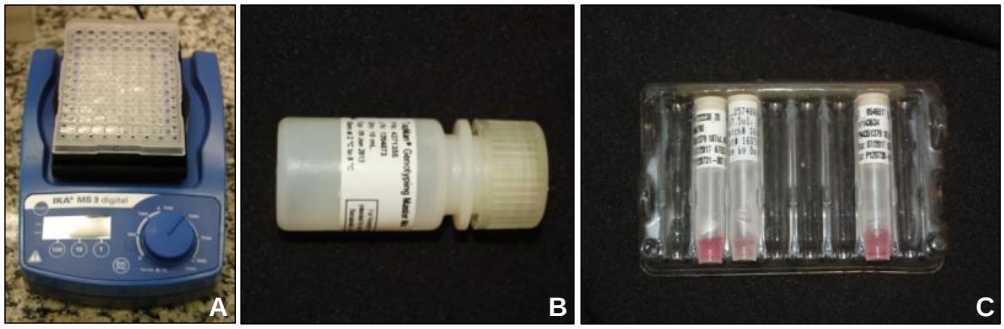

Figura 15 - A) Homogeneização em vortex específico para placas, por 10 segundos; **B)** solução Genotyping MasterMix (Oragene); **C)** *primers* específicos para detecção dos SNPs analizados

Figura 16 - A) Aparelho ViiA^{TM}7 RealTimePCR; **B)** quadro demonstrativo das etapas da PCR em tempo real

4.3 ESTATÍSTICA

As diferenças entre as frequências dos polimorfismos estudados foram avaliadas através do teste qui-quadrado (x^2), e o risco associado aos genótipos e alelos foi calculado como a razão de chances (OR), com intervalos de confiança de 95% (IC). Os valores de LDP entre os grupos foram comparados através do teste t. A análise de possíveis diferenças entre os subgrupos de genótipos com relação aos valores de LDP, EAV e tempo de dor foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, e as letras diferentes nos gráficos indicam significância estatística entre os grupos investigados. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os testes estatísticos adequados aos experimentos foram aplicados através dos programas GraphPad, InStat e Prism5 (GraphPad, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os grupos apresentaram-se compatíveis em relação à idade (p=0,354), sendo que a idade média do grupo com DTM foi de 36 anos (DP=11,00) e a idade média do grupo Controle foi de 34 anos (DP=11,47). Também observou-se compatibilidade quanto à distribuição do sexo (p=1,0000).

5.1 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E DE ALELOS DOS SNPs CANDIDATOS NOS GRUPOS CONTROLE E DTM

Não observamos associação entre o polimorfismo COMT *Val(158)Met* (rs4680) e as DTMs. A presença desse polimorfismo acometeu similarmente indivíduos saudáveis e doentes: 84,61% e 82,90%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP COMT *Val(158)Met* (rs4680) dos grupos Controle e com DTM

Genótipo	**Controle n=91 (%)**	**DTM n=152 (%)**	**p valor***		
AA	14 (15,39)	26 (17,10)			
AG	47 (51,65)	81 (53,30)	p=1,0000	IC=0,4416 – 1,950	OR=0,9280
GG	30 (32,96)	45 (29,60)	p=0,6886	IC=0,3639 – 1,793	OR=0,8077
AG + GG	77 (84,61)	129 (82,90)	p=0,8589	IC=0,4442 – 1,832	OR=0,9021
Alelos					
A	75 (41,20)	133 (43,75)			
G	107 (58,80)	171 (56,25)	p=0,6360	IC=0,6211 – 1,308	OR=0,9012

***** teste-X^2; **IC=** intervalo de confiança; **OR=** odds ratio; ***** p<0,05.

Encontramos associação entre o polimorfismo *TNFA-308* (1800629) e as DTMs. Apenas 13,18% dos indivíduos saudáveis apresentaram esse polimorfismo genético, enquanto 26,97% dos portadores de DTM o apresentaram (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *TNFA-308* (rs1800629) dos grupos Controle e com DTM

Genótipo	**Controle n=91 (%)**	**DTM n=152 (%)**	**p valor***		
GG	79 (86,81)	111 (73,02)			
GA	08 (8,79)	32 (21,05)	**p=0,0116***	**IC=1,256 – 6,569**	**OR=2,873**
AA	04 (4,4)	09 (5,93)	p=0,5649	IC=0,4804 – 5,435	OR=1,616
GA +AA	12 (13,18)	41 (26,97)	**p=0,0107***	**IC=1,212 – 4,968**	**OR=2,454**
Alelos					
G	166 (91,20)	254 (83,55)			
A	16 (8,8)	50 (16,45)	p=0,3087	IC=0,7798 – 2,612	OR=1,427

***** teste-X^2; **IC=** intervalo de confiança; **OR=** odds ratio;***** p<0,05.

A substituição de um alelo G por A foi significativamente mais prevalente no Grupo com DTM (21,05%), em comparação ao Grupo Controle (8,79%) (p=0,0116). Não houve diferença entre os grupos com relação ao número de sujeitos com ambos os alelos polimórficos (AA) (p=0,5649). Quando os genótipos polimórficos foram agrupados, observou-se que a presença de variantes polimórficas (GA ou AA) foi o dobro no Grupo com DTM (26,97%), quando comparado com o Grupo Controle (13%) (p=0,0107).

As frequências genotípicas e de alelos dos demais SNPs investigados [*IL6-174* (rs1800795); *IL-1β3954* (rs1143634); *IL10-592* (rs1800872); *MMP1-1607* (rs1799750); *TLR4* (rs4986790)] estão descritas nas Tabelas 4 a 8, respectivamente.

Tabela 4 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *IL6-174* (rs1800795) nos grupos Controle e com DTM

Genótipo	Controle n=91 (%)	DTM n=152 (%)	p valor*		
GG	40 (43,95)	81 (53,28)			
GC	45 (49,45)	53 (34,86)	p=0,0696	IC=0,3359 – 1,007	OR=0,5816
CC	06 (6,6)	18 (11,84)	p=0,4835	IC=0,5457 – 4,022	OR=1,481
GC + CC	51 (56,05)	71 (46,71)	p=0,1854	IC=0,4077 – 1,159	OR=0,6875
Alelos					
G	125 (68,68)	215 (70,72)			
C	57 (31,32)	89 (29,28)	p=0,6828	IC=0,6091 – 1,353	OR=0,9078

***** teste-X^2; **IC=** intervalo de confiança; **OR=** odds ratio; ***** p<0,05.

Tabela 5 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *IL-1β* (rs1143634) nos grupos Controle e com DTM

Genótipo	Controle n=91 (%)	DTM n=152 (%)	p valor*		
CC	56 (61,53)	104 (68,42)			
CT	34 (37,36)	45 (29,60)	p=0,2572	IC=0,4106 – 1,237	OR=0,7127
TT	01 (1,10)	03 (1,98)	p=1,0000	IC=0,1552 – 15,06	OR=1,5290
CT + TT	35 (38,46)	48 (31,58)	p=0,2079	IC=0,4044 – 1,208	OR=0,6989
Alelos					
C	146 (80,21)	253 (83,22)			
T	36 (19,78)	51 (16,78)	p=0,4634	IC=0,5095 – 1,312	OR=0,8175

***** teste-X^2; **IC=** intervalo de confiança; **OR=** odds ratio; ***** p<0,05.

Tabela 6 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *IL10-592* (rs1800872) nos grupos Controle e com DTM

Genótipo	Controle n=91 (%)	DTM n=152 (%)	p valor*		
CC	35 (38,46)	60 (39,47)			
CA	44 (48,35)	77 (50,65)	p=1	IC=0,5844 – 1,783	OR=1,021
AA	12 (13,18)	15 (9,86)	p=0,5070	IC=0,3066 – 1,734	OR=0,7292
CA + CC	56 (61,53)	92 (60,52)	p=0,8928	IC=0,5623 – 1,633	OR=0,9583
Alelos					
C	114 (62,63)	197 (64,80)			
A	68 (37,36)	107 (35,19)	p=0,6962	IC=0,6217 – 1,334	OR=0,9106

***** teste-X^2; I**C=** intervalo de confiança; **OR=** odds ratio; ***** p<0,05.

Tabela 7 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *MMP1-1607* (rs1799750) nos grupos Controle e com DTM

Genótipo	Controle n=91 (%)	DTM n=152 (%)	p valor*		
1G/1G	24 (26,37)	42 (27,63)			
1G/2G	42 (46,15)	69 (45,39)	p=0,8736	IC=0,4992– 1,765	OR=0,9388
2G/2G	25 (27,48)	41 (26,98)	p=1,0000	IC=0,4624 – 1,899	OR=0,9371
1G/2G + 2G/2G	67 (73,62)	110 (72,36)	p=0,9382	IC=0,5219 – 1,686	OR=0,8822
Alelos					
1G	90 (49,45)	153 (50,33)			
2G	92 (50,55)	151 (49,67)	p=0,9253	IC=0,6686 – 1,394	OR=0,9655

***** teste-X^2; **IC=** intervalo de confiança; **OR=** odds ratio; ***** p<0,05.

Tabela 8 - Comparação das frequências genotípicas e de alelos do SNP *TLR4* (rs4986790) nos grupos Controle e com DTM

Genótipo	Controle n=91 (%)	DTM n=152 (%)	p valor*		
AA	87 (95,6)	145 (95,4)			
AG	04 (4,40)	06 (3,95)	p=1,0000	IC=0,2470 – 3,280	OR=0,900
GG	-	01 (0,65)	p=1,0000	IC=0,0726 – 44,81	OR=1,804
AG + GG	04 (4,40)	07 (4,60)	p=1,0000	IC=0,2987 – 3,691	OR=1,050
Alelos					
A	178 (97,8)	296 (97,4)			
G	04 (2,20)	08 (2,60)	p=1,0000	IC=0,3569 – 4,053	OR=1,203

***** teste-X^2; **IC =** intervalo de confiança; **OR =** odds ratio; ***** p<0,05.

5.2 SENSIBILIDADE DOLOROSA MECÂNICA NOS GRUPOS CONTROLE E DTM

Os valores de LDP para a ATM, temporal anterior (TA) e masseter (M) foram mais baixos para o grupo com DTM, quando comparado com o grupo Controle. Já o LDP para o tendão de Aquiles (TAQ) não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 17).

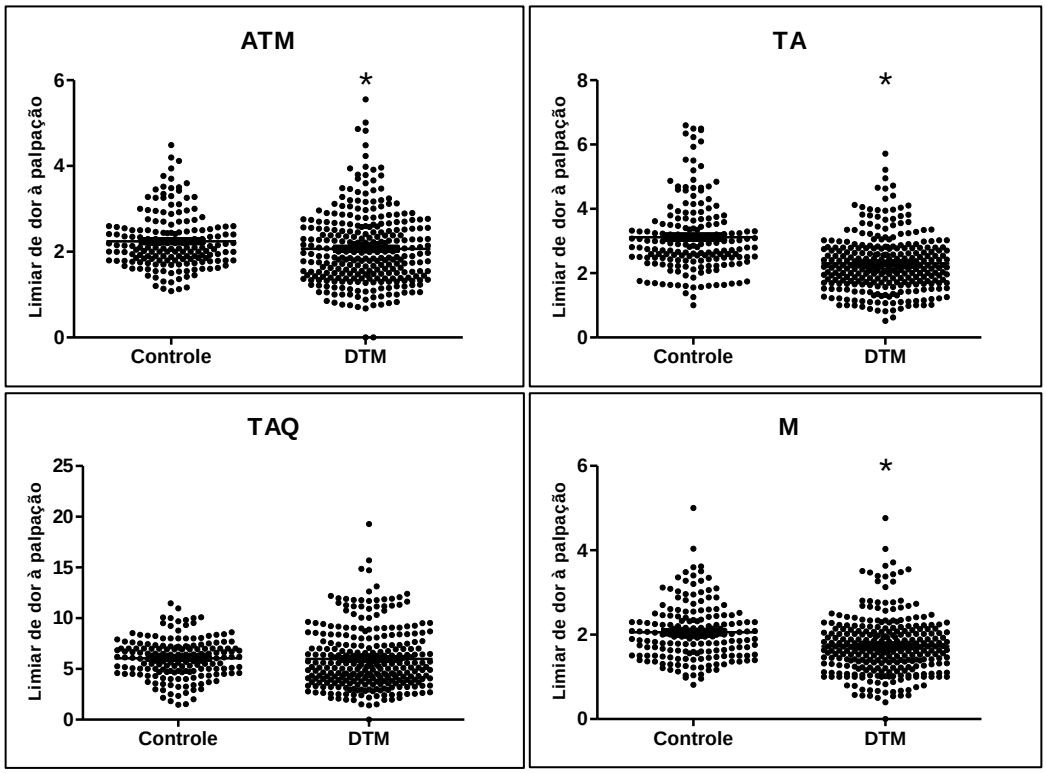

Figura 17 - Comparação dos valores de LDP entre os grupos Controle e com DTM. No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles

5.3 OS SNPs CANDIDATOS E A SENSIBILIDADE DOLOROSA MECÂNICA

A comparação dos valores de LDPs entre os diferentes genótipos dos indivíduos com DTM demonstrou que o SNPs COMT *Val(158)Met* e *IL6-174* estão associados à maior sensibilidade dolorosa. Os indivíduos portadores de pelos menos um alelo polimórfico - COMT *Val(158)Met* - apresentaram valores menores de LDP para ATM e masseter; e indivíduos com dois alelos polimórficos apresentaram maior sensibilidade à palpação do tendão de Aquiles (Figura 18).

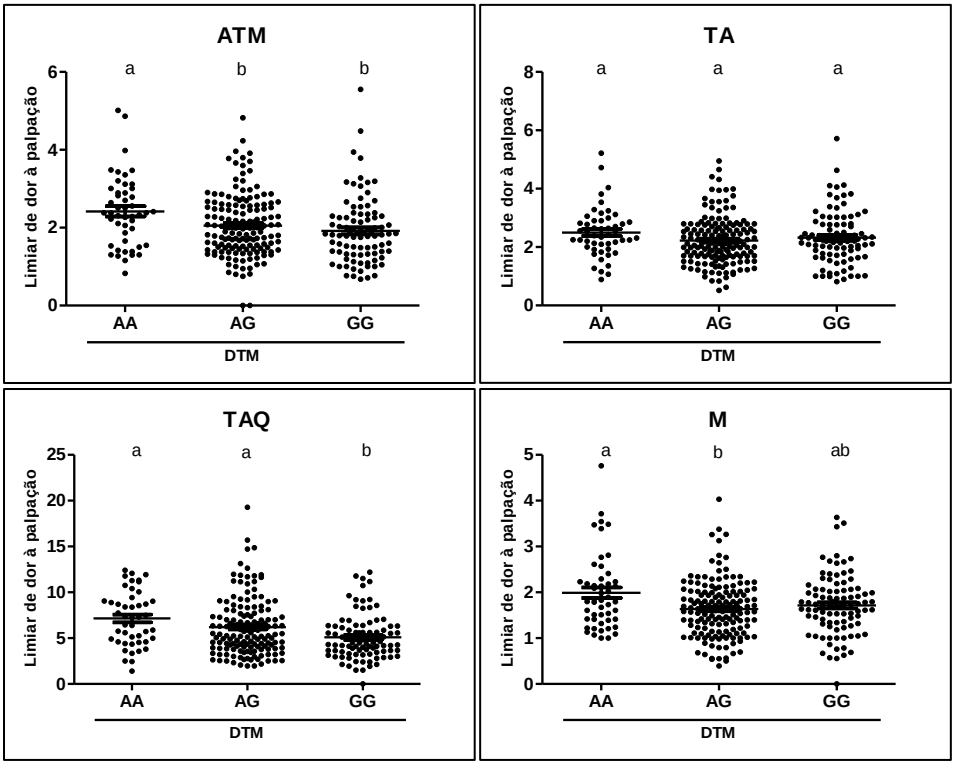

Figura 18 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP COMT *Val(158)Met* (rs4680). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles

Pacientes portadores de dois alelos *TNFA-308* polimórficos apresentaram-se menos sensíveis em todos os sítios avaliados. Já os indivíduos com um alelo polimórfico apresentaram-se menos sensíveis à pressão no temporal anterior do que aqueles com nenhum polimorfismo (Figura 19).

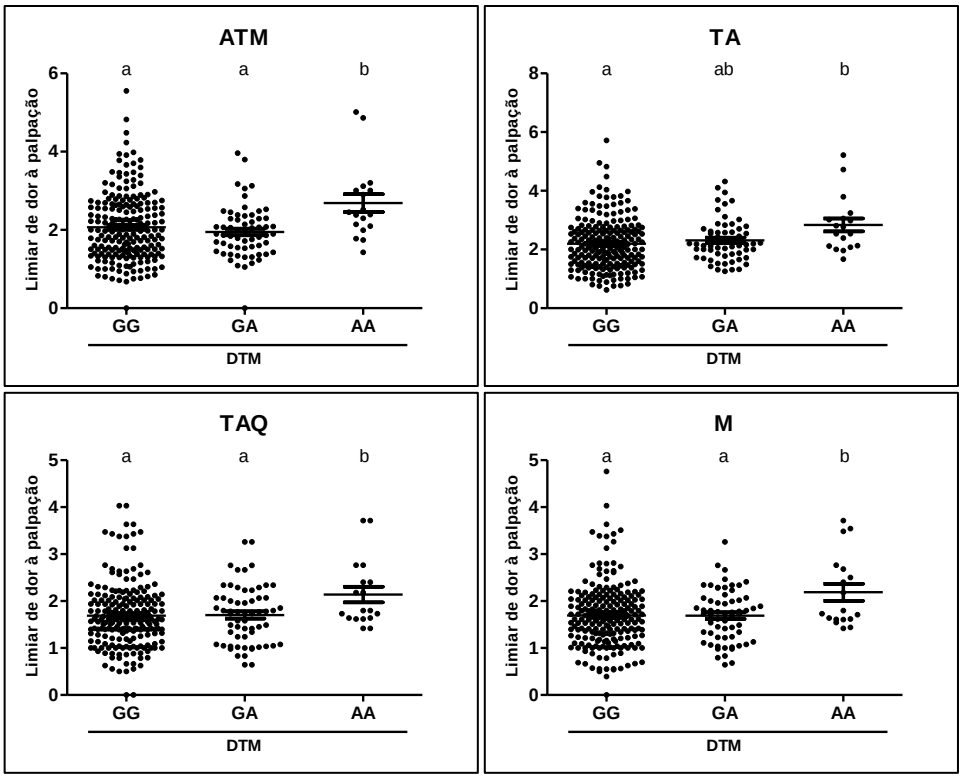

Figura 19 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *TNFA-308* (rs1800629). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles

Com relação ao SNP *IL6-174*, indivíduos não portadores de alelos polimórficos apresentaram maiores valores de LDP para ATM e tendão de Aquiles (Figura 20).

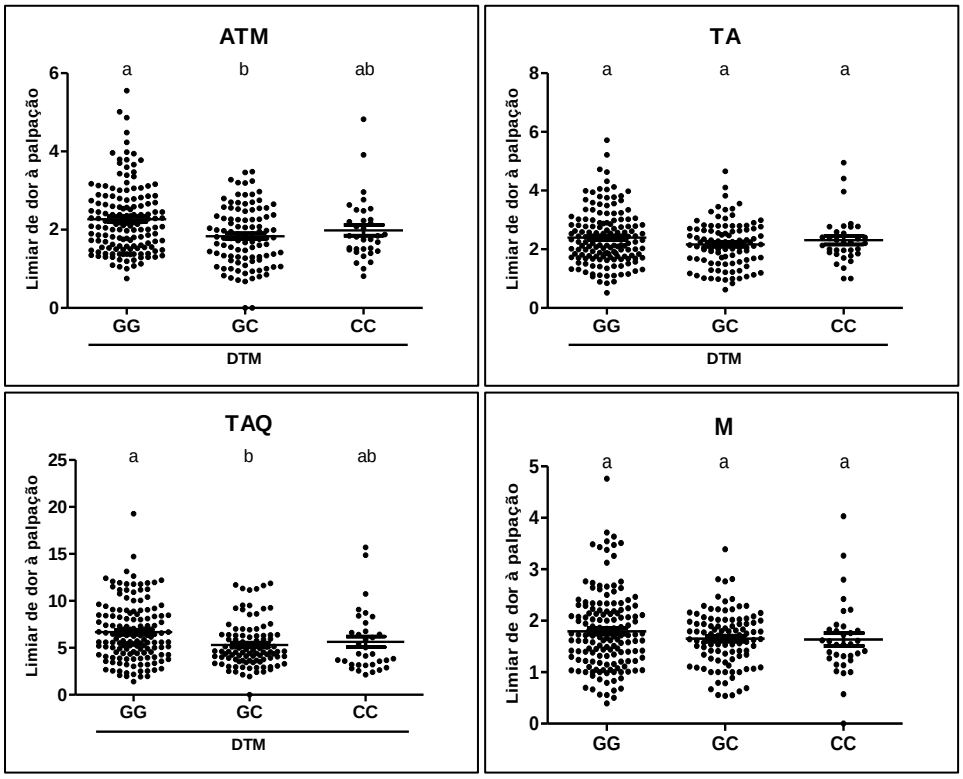

Figura 20 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *IL6-174* (rs1800795). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles

Os pacientes portadores de dois alelos *IL-1β-3954* polimórficos apresentaram-se menos sensíveis à pressão na ATM, masseter e tendão de Aquiles. Portadores de um alelo polimórfico também apresentaram menor sensibilidade à pressão no tendão de Aquiles do que indivíduos sem polimorfismo (Figura 21).

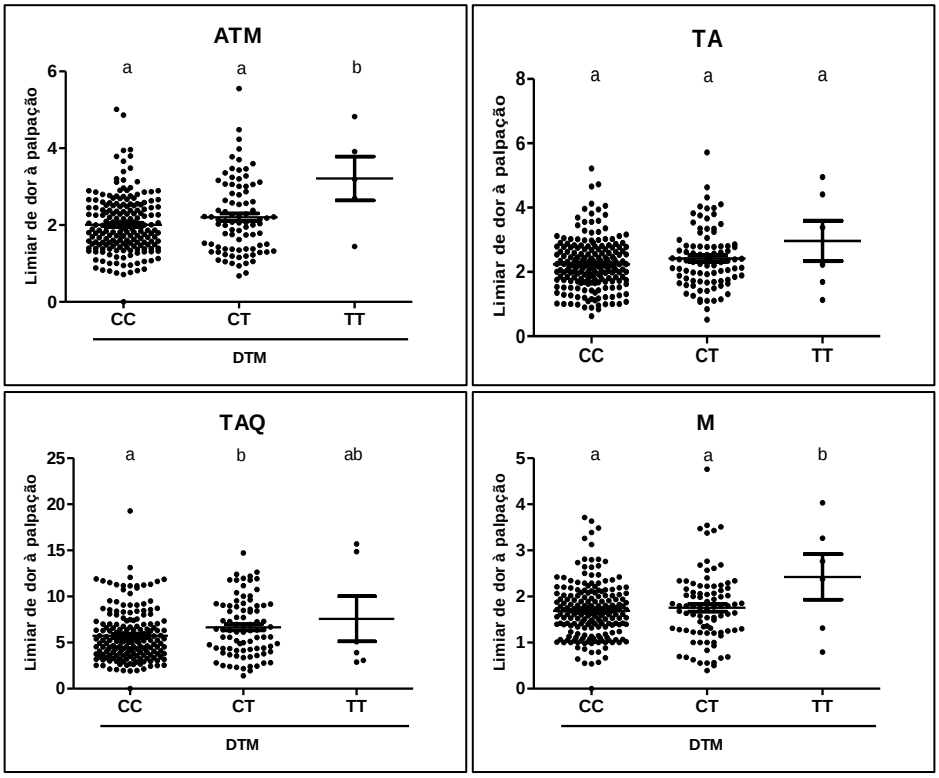

Figura 21 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *IL-1β-3954* (rs1143634). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles

Os SNPs *IL10-592* e *MMP1-1607* não influenciaram a sensibilidade dolorosa mecânica em nenhuma região pesquisada (ATM, temporal anterior, masseter, tendão de Aquiles) (Figuras 22 e 23).

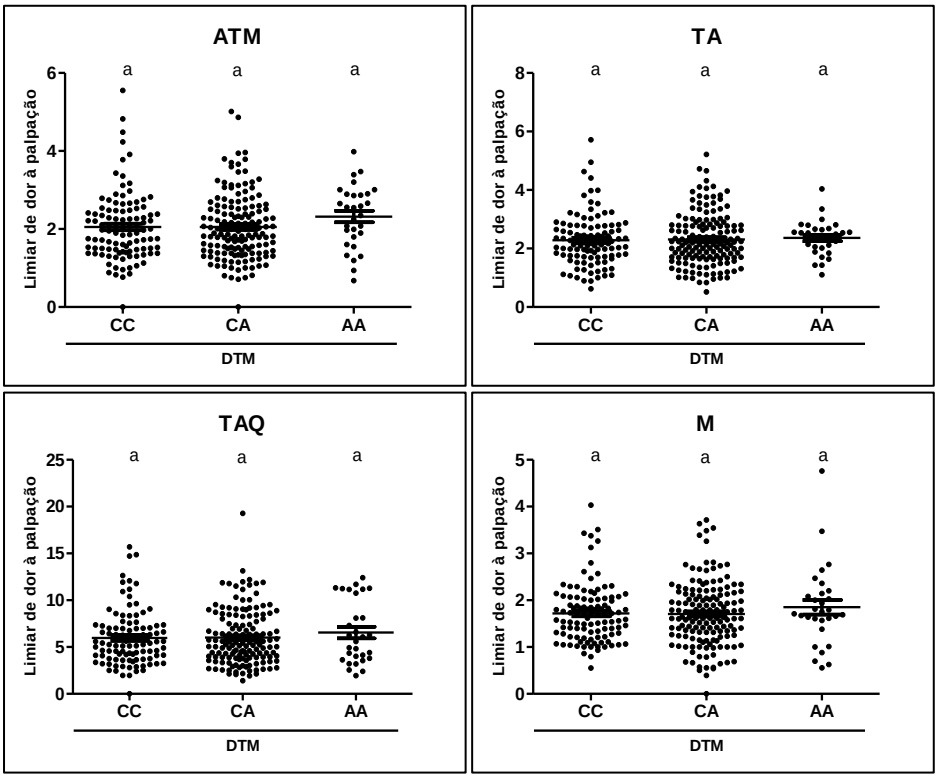

Figura 22 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *IL10-592* (rs1800872). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles

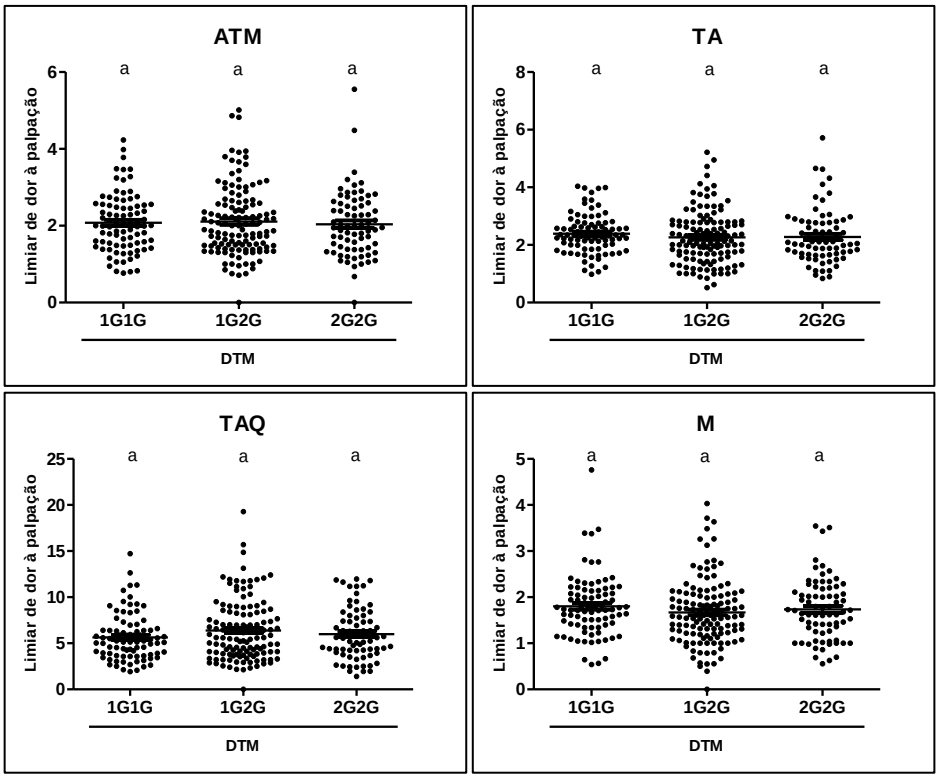

Figura 23 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *MMP1-1607* (rs1799750). No sentido horário, os valores de LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles

Os portadores de dois SNPs *TLR4-896* polimórficos apresentaram uma tendência generalizada a menor sensibilidade mecânica em todas as áreas avaliadas, sendo essa diferença estatisticamente significativa para o tendão de Aquiles (Figura 24).

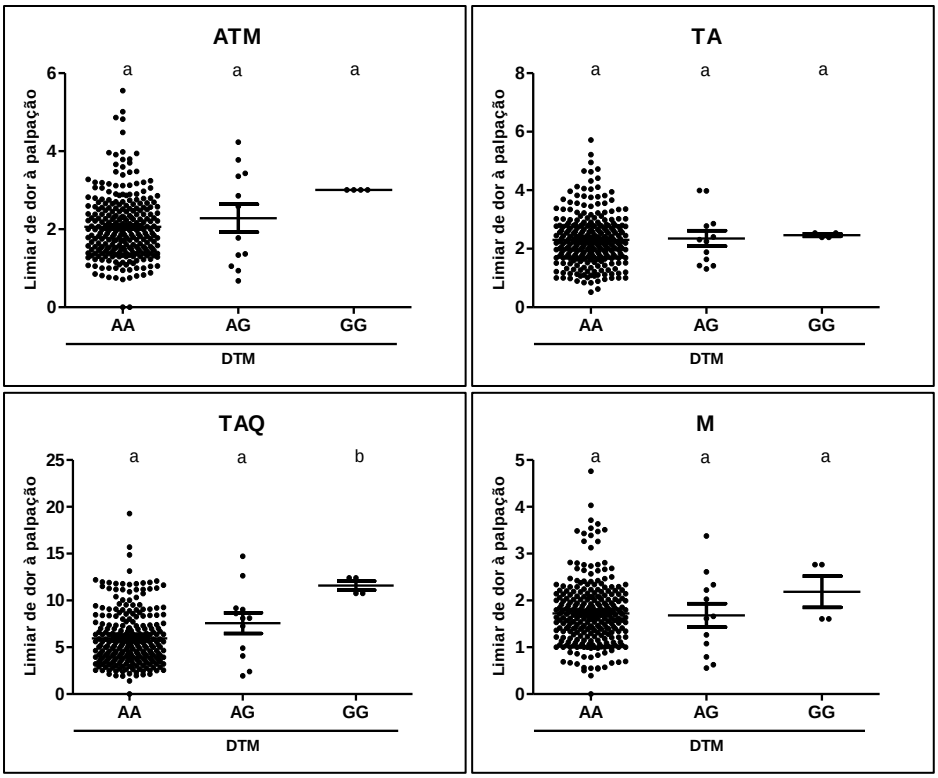

Figura 24 - Sensibilidade dolorosa mecânica entre os diferentes genótipos do SNP *TLR4-896* (rs4986790). No sentido horário, os valores do LDP da ATM, temporal anterior, masseter e tendão de Aquiles

5.4 OS SNPs CANDIDATOS, A INTENSIDADE E O TEMPO DE DOR

A presença ou não dos SNPs avaliados não influenciou significativamente nos valores das três EVAs (dor atual, pior dor nos últimos 30 dias, média de dor dos últimos 30 dias), nem o tempo de dor, entre os indivíduos portadores de DTM.

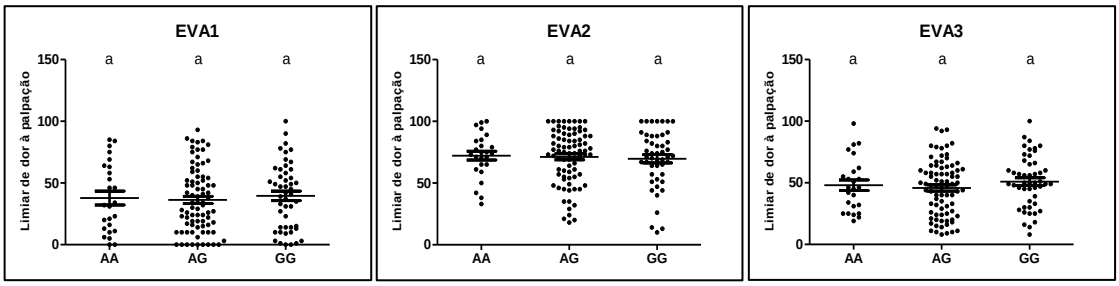

Figura 25 - Teste de associação entre o SNP COMT *Val(158)Met* (rs4680) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3

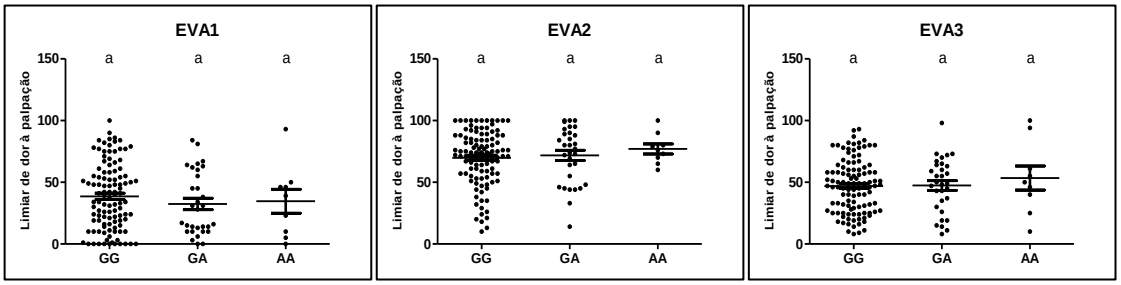

Figura 26 - Teste de associação entre o SNP *TNFA-308* (rs1800629) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3

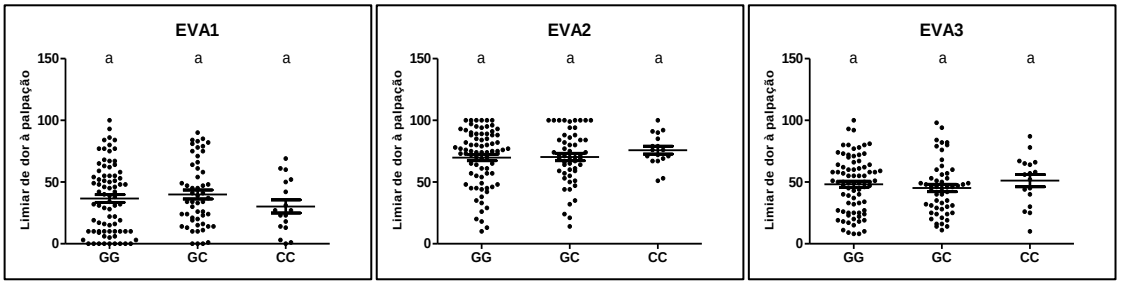

Figura 27 - Teste de associação entre o SNP *IL6-174* (rs1800795) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3

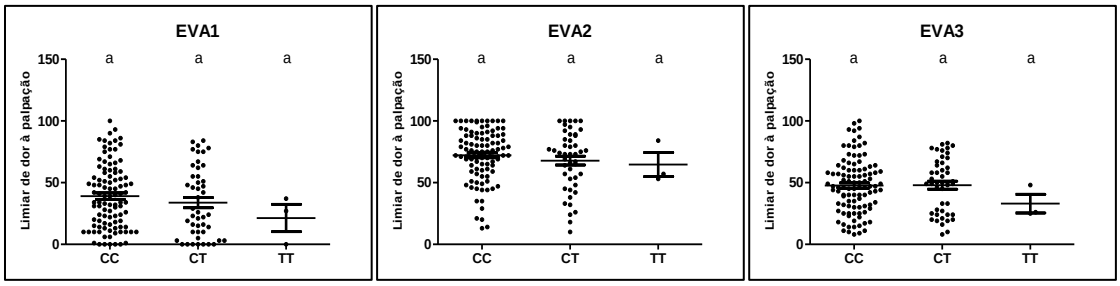

Figura 28 - Teste de associação entre o SNP *IL-1β* (rs1143634) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3

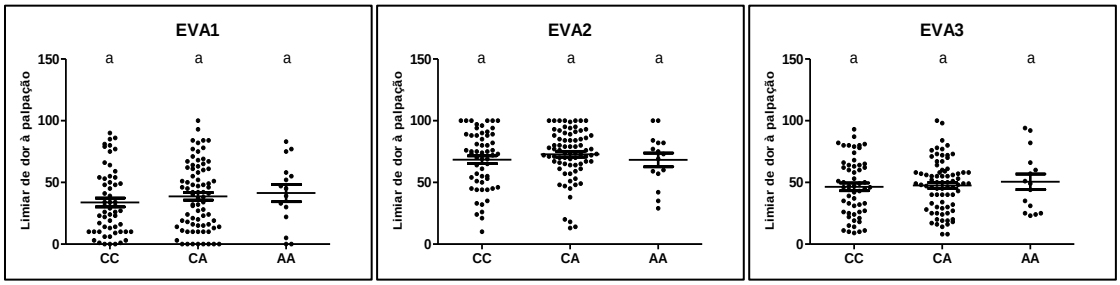

Figura 29 - Teste de associação entre o SNP *IL10-592* (rs1800872) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3

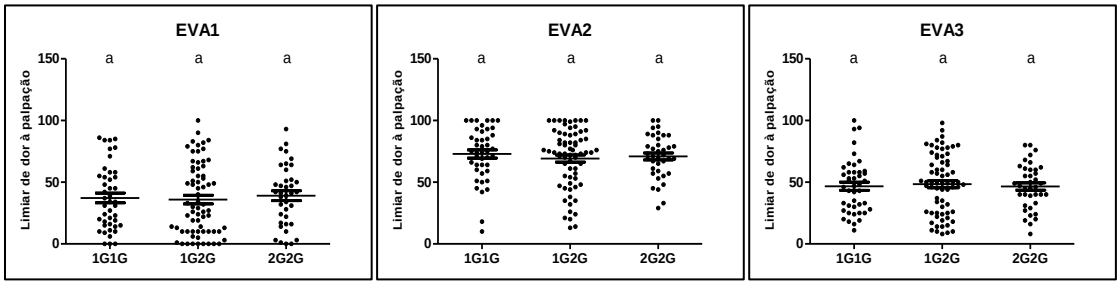

Figura 30 - Teste de associação entre o SNP *MMP1-1607* (rs1799750) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3

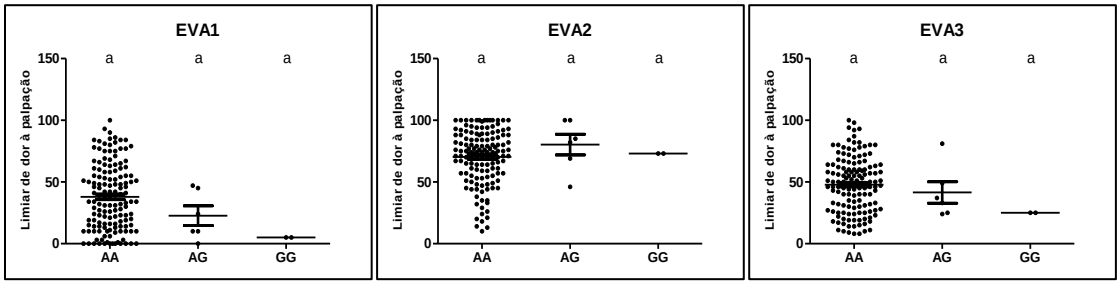

Figura 31 - Teste de associação entre o SNP *TLR4* (rs4986790) e a intensidade de dor. Da esquerda para a direita, os valores das EVA1, EVA2 e EVA3

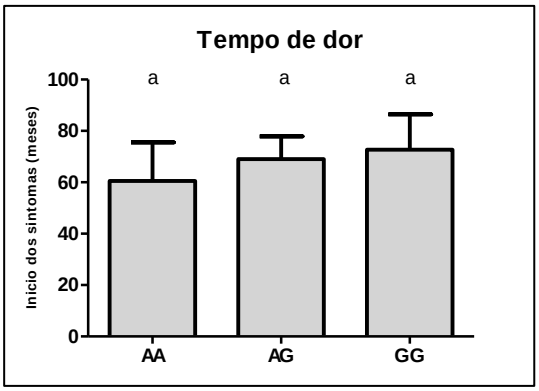

Figura 32 - Teste de associação entre o SNP COMT *Val(158)Met* (rs4680) e o tempo de dor

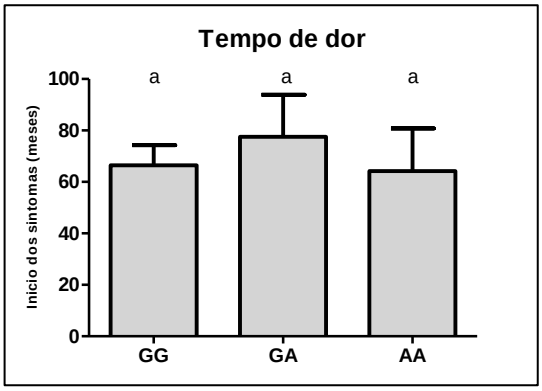

Figura 33 - Teste de associação entre o SNP *TNFA-308* (rs1800629) e o tempo de dor

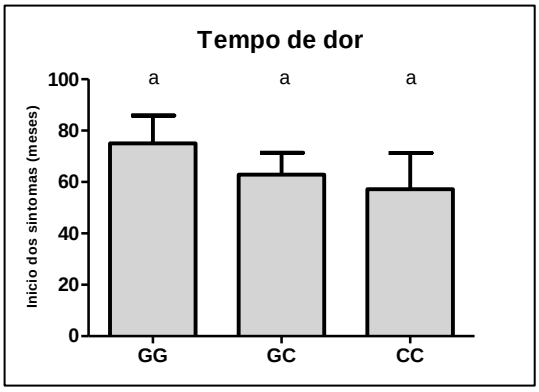

Figura 34 - Teste de associação entre o SNP *IL6-174* (rs1800795) e o tempo de dor

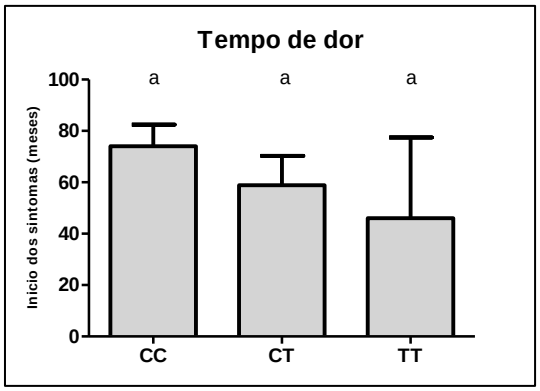

Figura 35 - Teste de associação entre o SNP *IL-1β* (rs1143634) e o tempo de dor

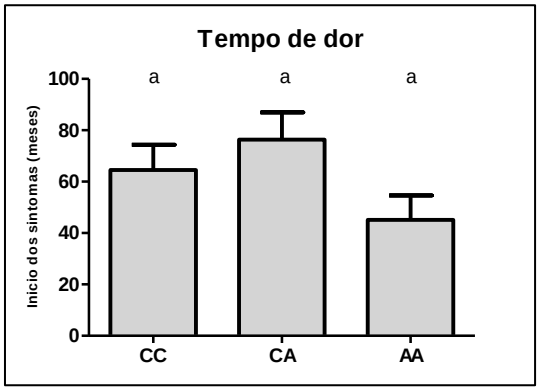

Figura 36 - Teste de associação entre o SNP *IL10-592* (rs1800872) e o tempo de dor

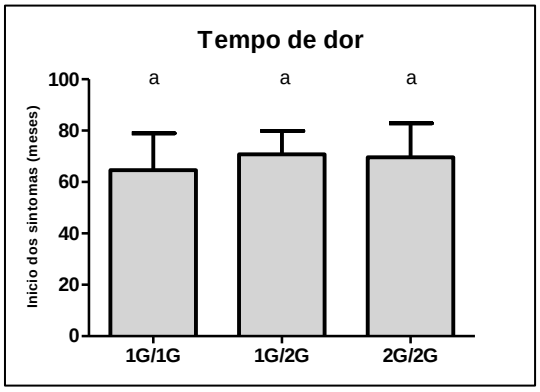

Figura 37 - Teste de associação entre o SNP *MMP1-1607* (rs1799750) e o tempo de dor

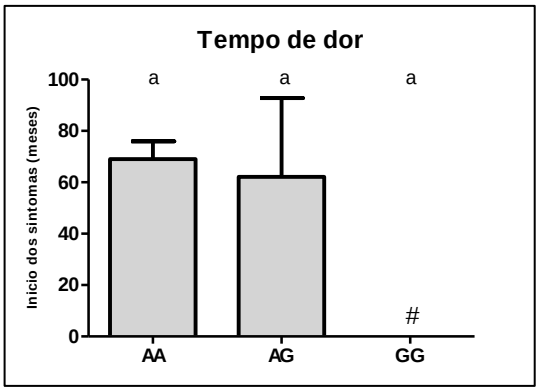

Figura 38 - Teste de associação entre o SNP *TLR4* (rs4986790) e o tempo de dor

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A hipótese nula foi rejeitada, uma vez que houve diferença entre as frequências genotípicas do SNP *TNFA-308* entre os grupos, estando o polimorfismo *TNFA-308* (1800629) associado às DTMs. Além do *TNFA-308*, os SNPs COMT *Val(158)Met*, *IL6-174*, *IL-1β-3954* e *TLR4-896* foram capazes de influenciar a sensibilidade dolorosa mecânica em indivíduos doentes, o que pode ser entendido como uma diminuição da capacidade de tolerar pressão, gerando sinais, apesar de não configurarem sintomas clássicos dolorosos das DTMs.

O polimorfismo funcional do gene COMT *Val(158)Met* (rs4680), que codifica uma substituição de valina por metionina, produz uma enzima COMT com menor estabilidade térmica, resultando na diminuição de sua atividade enzimática (LOTTA et al., 1995; ZUBIETA et al., 2003). Tem sido aceito que a variabilidade genética no códon 158 seja a fonte primária da variabilidade individual da atividade da COMT em humanos (MÄNNISTÖ; KAAKKOLA, 1999). O SNP COMT *Val(158)Met* está significativamente associado à fibromialgia e à dor crônica generalizada. Já no caso das condições dolorosas musculoesqueléticas, uma meta-análise envolvendo quatro estudos demonstrou não haver tal associação (TAMMIMÄKI; MÄNNISTÖ, 2012). Da mesma forma, o presente estudo demonstrou que o SNP COMT *Val(158)Met* não foi mais prevalente no grupo com DTMs do que no grupo Controle.

Foi sugerida, por Shifman et al. (2002); Bray et al. (2003); Diatchenko et al., (2005) a construção de haplótipos para investigações da relação entre o polimorfismo da COMT e desordens afetivas ou dolorosas em humanos, uma vez que, em muitos casos, a associação observada, levando em consideração apenas o SNP COMT *Val(158)Met,* é relativamente modesta. Diatchenko et al. (2005) descreveram 3 haplótipos comuns capazes de predizer a sensibilidade dolorosa. Esses haplótipos foram chamados de LPS (*low pain sensitivity*), APS (*average pain sensitivity)* e HPS (*high pain sensitivity*). Demonstraram que a presença de apenas um haplótipo LPS diminui em 2,3 vezes a chance de desenvolvimento de DTM muscular. Foi também demonstrado que o tratamento ortodôntico pode ser considerado um fator de risco para as DTMs em portadores de haplótipos COMT

sensíveis à dor, o que não foi visto nos portadores de haplótipos resistentes à dor. Baseado nesses resultados foi sugerido o uso dos haplótipos da COMT como marcadores de risco para DTM em pacientes submetidos ao tratamento ortodôntico (SLADE et al., 2008).

De maneira interessante, Marbach e Levitt (1976) relataram que pacientes com dores faciais, comparáveis à DTM, apresentaram níveis urinários aumentados para os metabólitos de catecolaminas e expressão diminuída da atividade eritrocitária da COMT, sugerindo sua participação nessa condição persistente de dor.

Apesar de não termos encontrado associação direta entre o SNP COMT *Val(158)Met* e a DTM, observamos que, dentro do grupo de indivíduos com DTM, aqueles portadores do SNP COMT *Val(158)Met* apresentaram LDP significativamente menor, sendo, portanto, mais sensíveis ao estímulo mecânico causado pela pressão. Esse resultado está de acordo com aquele apresentado por Mobascher et al. (2010), onde indivíduos homozigotos para o alelo *Met(158)* apresentaram, no exame de ressonância magnética funcional, maior resposta no córtex cingulado anterior ao estímulo doloroso provocado por *laser*.

O polimorfismo COMT *Val(158)Met* pode afetar o processamento da dor de várias maneiras. Por exemplo, diminuindo o metabolismo da epinefrina, também envolvida na modulação da dor. Khasar, McCarter e Levine (1999) demonstraram que a epinefrina, mesmo na ausência de injúria neuronal, induz a hiperalgesia em ratos através da estimulação de receptores β2-adrenérgicos. De forma consistente com essa hipótese, foi demonstrado que a inibição farmacológica da COMT, com um inibidor seletivo da COMT (OR486), produziu uma rápida e profunda hiperalgesia mecânica, que foi bloqueada por antagonistas não seletivos β-adrenérgico (Propanolol) (NACKLEY et al., 2006). Ademais, foi observado que indivíduos com haplótipos que determinam atividade enzimática menor da COMT e maior sensibilidade à dor, também foram beneficiados com o tratamento com o Propanolol (TCHIVILEVA et al., 2010).

O genótipo do SNP COMT *Val(158)Met* também está envolvido na resposta autonômica e na recuperação após estresse psicossocial. Crianças submetidas ao estresse agudo, quando portadoras de pelos menos um alelo Met, apresentaram menor aumento da frequência cardíaca (FC), recuperação mais lenta

da FC e maior diminuição da variabilidade da FC (VFC) do que aquelas portadoras de dois alelos Val. Teoricamente, esse polimorfismo regularia para baixo (*downregulation*) a resposta do sistema nervoso autônomo simpático (SNS), podendo impactar regiões cerebrais responsáveis por iniciar as reações ao estresse (MUELLER et al., 2012). Além da menor reação autonômica ao estresse, os maiores níveis de catecolaminas associados à presença do alelo *Met(158)* também estão envolvidos com menor modulação de dor mediada pelo sistema opioide.

É notório que a dopamina pode modular a atividade do sistema opioide endógeno, indiretamente, através da regulação das encefalinas neuronais (GEORGE; KERTESZ, 1987; CHEN; ALOYO; WEISS, 1993; ZUBIETA et al., 2003). Indivíduos homozigotos para o alelo *Met(158)* (*met/met*), quando submetidos à dor experimental (injeção da solução hipertônica no músculo masseter), apresentaram menores respostas do sistema opioide regional, em comparação com indivíduos heterozigotos. Esses efeitos foram acompanhados por avaliações sensorial e afetiva da dor mais elevada e a um estado afetivo mais negativo. Efeitos opostos foram observados em indivíduos homozigotos para o alelo *Val(158) (val/val*). Portanto, a hiperatividade crônica do sistema dopaminérgico induzida pelo SNP COMT *Val(158)Met* está associada a uma menor capacidade de ativar a neurotransmissão opioide sob provocação, em função do menor conteúdo neuronal de encefalinas (ZUBIETA et al., 2003; RAKVAG et al., 2008).

Heinz e Smolka (2006) observaram as respostas dos diferentes genótipos do SNP COMT *Val(158)Met* durante tarefas cognitivas e estímulos afetivos. Curiosamente, observaram que o alelo *Met(158)* parece beneficiar a execução de tarefas relacionadas à atenção ou memória, enquanto o alelo *Val(158)* parece ser vantajoso durante o processamento de estímulos emocionais aversivos. O mesmo grupo, em outro estudo, observou que o genótipo do COMT *Val(158)Met* não teve impacto sobre a ativação cerebral após estímulos agradáveis; no entanto, estava relacionado com a resposta neural após estímulos desagradáveis. O aumento da ativação límbica e pré-frontal provocada por estímulos desagradáveis em indivíduos com mais alelos *Met(158)* poderia contribuir para a baixa resiliência emocional contra estados negativos de humor (SMOLKA et al., 2005). Dessa forma, pode ser que o SNP COMT *Val(158)Met* afete a atividade cerebral, em resposta aos estímulos

dolorosos, de forma vaga, agindo em diferentes domínios cognitivos (MOBASCHER et al., 2010).

Corroborando essa hipótese, Olsson et al. (2005) demonstraram que a ansiedade episódica persistente (pânico/fobia) é duas vezes mais frequente em indivíduos portadores do genótipo *Met(158)Met*. Uma vez que os genótipos *Val/Met* e *Met/Met* comprometem a atividade da enzima COMT, imitando a ação dos medicamentos antidepressivos modernos, poderíamos esperar que portadores desses genótipos apresentariam uma diminuição do risco para distúrbios de humor, e não o contrário. Contudo, diferentes estudos contradizem essa hipótese, mostrando um aumento do risco entre portadores do alelo *Met(158)*. A explicação para esse fato é parecida com aquelas já apresentadas para o SNA e sistema opioide, o nível elevado de aminas cerebrais pode afetar a sua disponibilidade durante períodos críticos do desenvolvimento neurológico da infância até a adolescência (ENOCH et al., 2003; OLSSON et al., 2005).

A frequência de variações genéticas relacionadas com a atividade enzimática diminuída da COMT é maior em pacientes portadores de fibromialgia e, entre os fibromiálgicos, os portadores de genótipo met/met apresentaram maior sensibilidade à dor térmica e mecânica (MARTINEZ-JAUAND et al., 2013). Enoch et al. (2003) apresentam evidências de uma associação entre o alelo *Met(158)* e um possível indicador de sensibilização neural – o eletroencefalograma em repouso tipicamente de baixa voltagem (caracterizado pelo "estado de repouso" mínimo, uma forma de onda). Outra prova do envolvimento do SNP COMT *Val(158)Met* no processo de sensibilização central foi apresentada por Diatchenko et al. (2006b), uma vez que demonstraram que esse desempenha papel primordial na variabilidade do processo de somação temporal da dor. Indivíduos homozigotos met/met apresentaram maior grau de somação temporal do que indivíduos homozigotos val/val. Evidências apontam para o protagonismo dos receptores adrenérgicos *β*2 e *β*3 (integrantes das fibras nociceptivas) no processo de sensibilização, através da ativação de proteínas quinases (NACKLEY et al., 2007).

Recentemente, tem-se reconhecido o papel dos mediadores pró-inflamatórios, incluindo as citocinas (TNF-α, IL-6 e IL-1β), prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio, na mediação da sensibilidade dolorosa (MAIMONE et al., 1993; BURÝSEK; HOUSTEK, 1997; SOMMER; KRESS, 2004; MARCHAND;

PERRETTI; MCMAHON, 2005). Observou-se que a ativação dos receptores adrenérgicos *β*2 nas células na periferia (FROST; NYSTROM; LANG, 2004) ou do sistema nervoso central (MAIMONE et al., 1993) promove a síntese e liberação de IL-6. Além disso, a ativação de receptores adrenérgicos em adipócitos estimula a transcrição de IL-6 (BURÝSEK; HOUSTEK, 1997). Extrapolando-se esses resultados, foi demonstrado em ratos que a inibição sistêmica da enzima COMT aumenta os níveis plasmáticos de TNF-α, IL-6 e IL-1β por meio dos receptores adrenérgicos *β*2 e *β*3 (NACKLEY et al., 2005 apud NACKLEY et al., 2007). Se, por um lado, a inibição da COMT aumenta os níveis plasmáticos de TNFA, foi também demonstrado que o TNFA, por sua vez, é capaz de regular para baixo a transcrição proteica da COMT, por meio da ativação canônica (clássica) do fator de transcrição NF-κB (TCHIVILEVA et al., 2009). Com base nesses resultados, acreditamos que seria pertinente a investigação futura da relação entre as variantes dos genes COMT e TNFA.

O presente estudo apresenta, de forma pioneira, a associação entre o SNP *TNFA-308* e as DTMs. Pacientes portadores de DTMs mostram 2,87 vezes mais chance de apresentar o genótipo GA do polimorfismo *TNF-308* do que os indivíduos controle. Essa associação já havia sido definida em outras patologias inflamatórias crônicas, como a doença periodontal, a artrite reumatoide, a síndrome do intestino irritável, a doença de Crohn e as migrâneas (CORREA; GOMEZ; ANAYA, 2004; FERREIRA et al., 2005; RODRIGUEZ-CARREON et al., 2005; VAN DER VEEK et al., 2005; LONGONI; FERRARESE, 2006; LEE; JI; SONG, 2007; SCHURKS et al., 2009; TROMBONE et al., 2009; BOECHAT et al., 2013).

O fato de o SNP *TNFA-308* estar associado às DTMs e a outras comorbidades dolorosas crônicas levanta a discussão do envolvimento do TNFA no processo de sensibilização central (ANDRADE et al., 2011). No sistema nervoso, quando uma lesão periférica ocorre, produz ativação da microglia no corno dorsal da medula espinhal (KREUTZBERG, 1996; INOUE, 2006). Esse processo inclui a ativação dos receptores P2X4, seguida pelo influxo de Ca^{2+} e liberação de TNFA, que se difunde modificando a excitabilidade neuronal e, consequentemente, a percepção da dor (HIDE et al., 2000; SUZUKI et al., 2004). Acredita-se que a dor miofascial temporomandibular represente uma desordem neurosensorial com envolvimento da sensibilização periférica e central dos nociceptores musculares. É

muito provável que a dor referida, sinal patognomônico da dor miofascial, ocorra secundariamente a fenômenos centrais, como a convergência e a ativação dos neurônios de segunda ordem adjacentes no subnúcleo caudal do tronco encefálico. Isso explicaria a expansão do campo receptivo, a redução do limiar de estimulação e a alodinia associada aos pontos de gatilho ativos (MERRILL, 2007). O processo de sensibilização central da dor miofascial pode explicar o insucesso das terapias periféricas no tratamento dessas condições (WOOLF; SALTER, 2000; KOH; ROBINSON, 2004; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

Além de alterações microscópicas, como o aumento da frequência das correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias (KAWASAKI et al., 2008), o TNF-α pode provocar alterações macroscópicas, observadas durante exames de ressonância magnética funcional. Os alelos A do SNP *TNFA-308 G/A* foram associados a um hipocampo de menor volume em indivíduos saudáveis. Um dos integrantes do sistema límbico, o hipocampo desempenha papel crucial na manutenção das funções cognitivas, na regulação do sono e da dor (EMAD et al., 2008). O TNF-α atua através de dois receptores de superfície celular distintos: o TNFR1 (neurodegenerativo) e o TNFR2 (neuroproliferativo). No hipocampo, a razão entre a afinidade dos receptores parece ser deslocada para TNFR1, assim exercendo maior efeito neurodegenerativo. Dessa forma, o volume reduzido do hipocampo em indivíduos portadores dos alelos A do polimorfismo *TNFA-308 G/A* pode ser explicado uma vez que esses produzem níveis mais elevados de TNF-α, que exerce efeito neurodegenerativo nessa região do cérebro (BAUNE et al., 2012). Em ratos, o TNF-α sensibilizou outras áreas cerebrais reativas ao estresse, como o hipotálamo e a amígdala; sendo passível, portanto, de influenciar na resposta a agressões traumáticas ou imunológicas, e ser relevante nas patologias comportamentais (HAYLEY et al., 2001).

Essas evidências poderiam explicar o fato de a influência do polimorfismo *TNFA-308 G/A* não estar restrita às DTMs articulares, com etiopatogenia inflamatória, mas também abranger as desordens musculares com etiopatogenia mais complexa e relacionada à cognição, ao estresse, ao sono e à percepção da dor (SMITH; HAYTHORNTHWAITE, 2004; AYESH; JENSEN; SVENSSON, 2008; VAN SELMS et al., 2008; WEISSMAN-FOGEL et al., 2011; STAUD, 2012).

Em acordo com os resultados do presente estudo, o SNP *TNFA-308* foi previamente associado com o transtorno somatoforme múltiplo (TSM). Quando a origem orgânica de uma dor crônica não é detectada, mesmo após exame adequado e minucioso, os sintomas podem ser classificados como uma síndrome somática funcional (SSF), como por exemplo, a fibromialgia, a SII e a DTM. O uso do termo transtorno somatoforme múltiplo (TSM) indica um ponto de vista mais amplo, englobando a abrangente sobreposição de sintomas. Síndromes com fenótipos aparentemente diferentes apresentam, muitas vezes, a dor crônica como o principal sintoma e a sensitização central como mecanismo responsável por essa hipersensibilidade. Um estudo recente observou frequência aumentada do alelo A do polimorfismo *TNFA-308* em um grupo de 148 pacientes diagnosticados como TSM, quando comparados com o grupo Controle. Os autores, portanto, hipotetizaram que o alelo A tem um efeito de risco, enquanto o alelo G parece ter um efeito protetor no TSM (HARMS et al., 2013).

Apesar da associação encontrada entre a DTM e o SNP *TNFA-308,* esse último esteve relacionado à menor sensibilidade dolorosa mecânica experimental entre os indivíduos doentes em todos os sítios avaliados (Figura 19). Inesperadamente, observamos fenômeno similar em outros genótipos avaliados. Os resultados mostraram, de maneira contundente, a relação entre genótipos reconhecidamente associados à maior transcrição de citocinas inflamatórias e uma menor sensibilidade dolorosa mecânica. Portadores do genótipo G/G do SNP *IL6-174*, sem nenhum alelo polimórfico, apresentaram menor sensibilidade dolorosa para ATM e tendão de Aquiles (Figura 20). Ressaltamos que, no caso do SNP *IL6-174* (G/C), o alelo C implica na transcrição reduzida da IL-6, em comparação com o alelo G (FISHMAN et al., 1998). Portanto, assim como foi observado para o TNFA-308, genótipo pró-inflamatório, nesse caso, não polimórfico (G/G), esteve relacionado com menor sensibilidade dolorosa. Ainda, doentes portadores de dois alelos *IL-1β-3954* polimórficos, relacionados com maior produção dessa citocina (POCIOT et al., 1992; BUCHS et al., 2001), apresentaram menores valores de LDP para a ATM, masseter e tendão de Aquiles, quando comparados com portadores de um ou nenhum alelo polimórfico. Para o LDP do tendão de Aquiles, indivíduos heterozigotos também apresentaram menor sensibilidade do que indivíduos sem polimorfismo (Figura 21). Por fim, portadores de dois SNPs *TLR4-896* polimórficos

(Asp299Gly) apresentaram uma tendência à menor sensibilidade mecância em todos os sítios avaliados, sendo essa diferença estatisticamente significativa para o tendão de Aquiles. Foi demonstrado que a presença do alelo Asp299Gly é acompanhada por um estado pró-inflamatório, com maior produção de TNFA (FERWERDA et al., 2008), portanto, associado à propensão genética para a sinalização pró-inflamatória.

Esses resultados (contraditórios, em um primeiro momento) estão de acordo com o trabalho de Liang et al. (2006) onde foi relatado que, em ratos, a inflamação crônica foi capaz de potencializar a analgesia provocada pela morfina, sendo que essa analgesia pode variar entre as diferentes linhagens. Isso demonstra a importância da interação entre a inflamação crônica e a genética na modulação do potencial analgésico da morfina. Stein, Gramsch e Herz (1990) também demonstraram que o efeito antinociceptivo provocado pela morfina em ratos normais foi 1/4 do observado em ratos artríticos, com inflamação crônica. O mesmo grupo, em outro estudo, induziu inflamação localizada em uma das patas traseiras de ratos, por meio de injeção de adjuvante de Freund. Depois de alguns dias, os ratos foram submetidos à natação em água fria *(cold water swim)*, um estímulo ambiental conhecido por ativar vias opioides intrínsecas. Após a natação, o limiar de dor à pressão aumentou significativamente mais na pata inflamada do que na não inflamada. Esse efeito antinociceptivo foi revertido localmente, mas não sistemicamente, pelo antagonista opioide naloxona. Também observaram efeito antinociceptivo produzido pela injeção de endorfina-beta sintética, que, por sua vez, foi revertido pelo naloxona e pelos antagonistas específicos de receptores *mu* e *sigma*. Dessa forma, demonstraram ocorrer recrutamento de receptores opioides periféricos através da liberação de endorfinas-beta em situações pró-inflamatórias. (STEIN; GRAMSCH; HERZ, 1990).

Como visto acima, o sistema imune usa mecanismos de migração celular não só para combater agentes patogênicos, mas também para controlar a dor. A migração de leucócitos, em geral, acontece em várias etapas, envolvendo a ativação sequencial de moléculas de adesão localizadas nas células do sistema imunológico e do endotélio vascular. Em condições inflamatórias periféricas, células imunes contendo opioides migram para o tecido inflamado, onde elas liberaram os peptídeos opioides e, então, seguem para o linfonodo local, esgotadas de endorfina-beta

(MACHELSKA, 2007; STEIN; LANG, 2009; BUSCH-DIENSTFERTIG; STEIN, 2010). Vários fatores podem ser responsáveis pelo desencadeamento dessa liberação, incluindo estímulos ambientais como o estresse, que provoca a liberação de noradrenalina pelos neurônios simpáticos; e fatores inflamatórios locais como a IL-1β ou o fator liberador de corticotropina (BINDER et al., 2004). Adrenalina, fator liberador de corticotropina, IL-1β e quimiocinas podem ativar seus respectivos receptores na superfície celular dos leucócitos para que esses secretem peptídeos opioides. Essa secreção é dependente de cálcio, ou de elevadas concentrações extracelulares de potássio. Os peptídeos opioides liberados ativam os receptores opioides dos terminais dos neurônios sensoriais periféricos, para produzirem analgesia endógena por meio da interação com os canais iônicos e da diminuição da liberação de substância P e CGRP (CABOT et al., 1997; STEIN; LANG, 2009; HUA; CABOT, 2010).

A inflamação também facilita o acesso dos opioides aos seus receptores, por interromper a barreira perineural; e aumenta a eficácia agonista, por alterar a interação dos receptores opioides com as proteínas-G, em função do menor PH (STEIN; SCHAFER; MACHELSKA, 2003; VETTER et al., 2006). Então ocorre regulação positiva de receptores opioides sintetizados nos gânglios da raiz dorsal, e um aumento do seu transporte dirigido para a periferia axonal, estimulado por citocinas e fator de crescimento neuronal no tecido inflamado. Esse processo resulta em uma maior densidade de receptores de opioides nos terminais nervosos periféricos (STEIN; SCHAFER; MACHELSKA, 2003; MOUSA et al., 2007).

A aplicação sistêmica e local dos receptores agonistas *mu*, *kappa* e *delta*, assim como os peptídeos opioides liberados endogenamente, provocam um efeito analgésico maior em tecidos lesionados do que não lesionados, não apenas em animais, mas também em humanos (STEIN; SCHAFER; MACHELSKA, 2003; STEIN; ZOLLNER, 2009). Durante os estágios iniciais da resposta inflamatória (várias horas), receptores periféricos e centrais estão envolvidos; em processos crônicos, a analgesia endógena é predominantemente mediada por receptores opioides periféricos (MACHELSKA et al., 2003). Assim, mecanismos de controle da dor opioides periféricos tornam-se mais prevalentes, com maior duração e gravidade da inflamação (STEIN; SCHAFER; MACHELSKA, 2003; BAAMONDE et al., 2005; OBARA et al., 2007).

O presente estudo é o primeiro a mostrar que genótipos pró-inflamatórios influenciam na sensibilidade dolorosa experimental (LDP). Novos trabalhos que avaliem outros testes dolorosos experimentais, como o de sensibilidade térmica, somatização temporal e controle inibitório nóxico difuso (DNIC), podem trazer avanço na compreensão desse tema. Também encorajamos estudos futuros que comprovem, de maneira mais assertiva e direta, se esse fenômeno pode, de fato, ser explicado em razão da regulação positiva periférica do sistema opioide por citocinas ou, ainda, se outros mecanismos estão envolvidos.

Diferentementemente dos SNPs COMT *Val(158)Met*, *TNFA-308*, *IL6-174*, *IL-1β-3954* e *TLR4-896*, os SNPs *IL10-592* e *MMP1-1607* não influenciaram na sensibilidade dolorosa mecânica em nenhuma região pesquisada (ATM, temporal anterior, masseter, tendão de Aquiles) (Figuras 22 e 23). Apesar de não significativo, podemos observar que indivíduos homozigóticos para o SNP *IL10-592* polimórfico apresentaram maiores valores de LDP. Uma vez que o SNP *IL10-592* está associado a baixos níveis de expressão de RNA mensageiro (CLAUDINO et al., 2008) e à diminuição da síntese de IL-10 (CRAWLEY et al., 1999; BERGLUNDH et al., 2003), sendo essa última considerada uma citocina anti-inflamatória, podemos concluir que existe uma coerência com os resultados previamente discutidos (*TNFA-308*, *IL6-174*, *IL-1β-3954* e *TLR4-896*), onde observou-se associação entre variantes genéticas pró-inflamatórias e a menor sensibilidade mecânica. Esse mesmo fenômeno não foi observado no caso das metaloproteinases de matriz (*MMP1-1607*), o que pode denotar uma incapacidade dessas enzimas em influenciar a percepção dolorosa.

Diferentemente do que foi observado para a sensibilidade dolorosa mecânica experimental, nenhum dos SNPs avaliados (COMT *Val(158)Met*, *TNFA-308*, *IL6-174*, *IL-1β-3954*, *IL10-592*, *MMP1-1607* ou *TLR4-896*) foi capaz de influenciar nos relatos de intensidade de dor (dor atual, pior dor nos últimos 30 dias, média de dor dos últimos 30 dias) ou do tempo de dor, entres os indivíduos doentes. Como demonstrado anteriormente, nem sempre existe coerência entre os valores de LDP e EAV (CONTI et al., 2012; DE MORAES MAIA et al., 2012). Embora seja uma das maneiras mais comuns de se mensurar a intensidade da dor, a EAV pode sofrer interferências das experiências de dor passadas, fatores psicológicos (depressão,

ansiedade, dependência) e fatores sociodemográficos (trabalho, nível educacional, estado civil) (MROZ et al., 2011).

O tamanho da amostra representou um grande desafio para a realização desse trabalho, principalmente a seleção do grupo Controle, de modo que fosse compatível com o grupo experimental no que diz respeito à idade, sexo e acesso aos cuidados odontológicos. Mesmo assim, o tamanho da amostra representa uma das principais limitações do estudo. Portanto, a seleção de maiores grupos populacionais, em pesquisas futuras, seria imprescindível antes de se descartar a influência dos SNPs COMT *Val(158)Met*, *IL6-174*, *IL-1β-3*954, *IL10*-592, *MMP1-1607* e *TLR4-896* nas DTMs. Também encorajamos pesquisas futuras com objetivo de esclarecer a relação entre os genótipos pró-inflamatórios, a menor sensibilidade dolorosa mecânica e o possível envolvimento do sistema opioide nesse processo.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O presente estudo apresenta, pela primeira vez, a associação entre o polimorfismo *TNFA-308* (1800629) e as DTMs. As variantes genéticas COMT *Val(158)Met*, *TNFA-308*, *IL6-174*, *IL-1β-3954* e *TLR4-896* foram capazes de influenciar na sensibilidade dolorosa mecânica. Encorajamos estudos futuros que elucidem a associação entre genótipos pró-inflamatórios e menor sensibilidade dolorosa mecânica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abou-Atme YS, Zawawi KH, Melis M. Prevalence, intensity, and correlation of different TMJ symptoms in Lebanese and Italian subpopulations. J Contemp Dent Pract. 2006 Sep;7(4):71-8.

Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol. 1993;54:1-78.

Ali S, Tamboli CP. Advances in epidemiology and diagnosis of inflammatory bowel diseases. Curr Gastroenterol Rep. 2008 Dec;10(6):576-84.

Andrade P, Visser-Vandewalle V, Hoffmann C, Steinbusch HW, Daemen MA, Hoogland G. Role of TNF-alpha during central sensitization in preclinical studies. Neurol Sci. 2011 Oct;32(5):757-71.

Arnold BS, Alpers GW, Suss H, Friedel E, Kosmutzky G, Geier A, et al. Affective pain modulation in fibromyalgia, somatoform pain disorder, back pain, and healthy controls. Eur J Pain. 2008 Apr;12(3):329-38.

Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. Science. 1984 May;224(4648):452-9.

Ayesh EE, Jensen TS, Svensson P. Effects of intra-articular ketamine on pain and somatosensory function in temporomandibular joint arthralgia patients. Pain. 2008 Jul;137(2):286-94.

Baamonde A, Lastra A, Juárez L, García V, Hidalgo A, Menéndez L. Effects of the local administration of selective mu-, delta-and kappa-opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005 Nov;372(3):213-9.

Baune BT, Konrad C, Grotegerd D, Suslow T, Ohrmann P, Bauer J, et al. Tumor necrosis factor gene variation predicts hippocampus volume in healthy individuals. Biol Psychiatry. 2012 Oct;72(8):655-62.

Belmonte L, Beutheu Youmba S, Bertiaux-Vandaele N, Antonietti M, Lecleire S, Zalar A, et al. Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. PLoS One. 2012;7(8):e42777.

Berglundh T, Donati M, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the -1087 IL 10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. J Clin Periodontol. 2003 Mar;30(3):249-54.

Berman SM, Naliboff BD, Suyenobu B, Labus JS, Stains J, Ohning G, et al. Reduced brainstem inhibition during anticipated pelvic visceral pain correlates with enhanced brain response to the visceral stimulus in women with irritable bowel syndrome. J Neurosci. 2008 Jan;28(2):349-59.

Binder W, Mousa SA, Sitte N, Kaiser M, Stein C, Schafer M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. Eur J Neurosci. 2004 Jul;20(1):92-100.

Birnboim H. DNA stability with Oragene™. Ottawa: DNA Genotek, Inc.; 2004.

Boechat AL, Boechat Nde O, Ogusku MM, Alencar MR, Abensur Tda C, Cardoso Neto J, et al. The influence of a TNF gene polymorphism on the severity of rheumatoid arthritis in the Brazilian Amazon. Cytokine. 2013 Feb;61(2):406-12.

Bragdon EE, Light KC, Costello NL, Sigurdsson A, Bunting S, Bhalang K, et al. Group differences in pain modulation: pain-free women compared to pain-free men and to women with TMD. Pain. 2002 Apr;96(3):227-37.

Bray NJ, Buckland PR, Williams NM, Williams HJ, Norton N, Owen MJ, et al. A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain. Am J Hum Genet. 2003 Jul;73(1):152-61.

Brinckerhoff CE. Joint destruction in arthritis: metalloproteinases in the spotlight. Arthritis Rheum.1991 Sep;34(9):1073-5.

Brookes AJ. The essence of SNPs. Gene. 1999 Jul;234(2):177-86.

Bruehl S, Chung OY. Interactions between the cardiovascular and pain regulatory systems: an updated review of mechanisms and possible alterations in chronic pain. Neurosci Biobehav Rev. 2004 Jul;28(4):395-414.

Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. Genes Immun. 2001 Jun;2(4):222-8.

Buckingham RB, Braun T, Harinstein DA, Oral K, Bauman D, Bartynski W, et al. Temporomandibular joint dysfunction syndrome: a close association with systemic joint laxity (the hypermobile joint syndrome). Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991 Nov;72(5):514-9.

Burstein R, Yamamura H, Malick A, Strassman AM. Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. J Neurophysiol. 1998 Feb;79(2):964-82.

Burýsek L, Houstek J. beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. FEBS Lett. 1997 Jul;411(1):83-6.

Busch-Dienstfertig M, Stein C. Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain--basic and therapeutic aspects. Brain Behav Immun. 2010 Jul;24(5):683-94.

Buskila D. Genetics of chronic pain states. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2007 Jun;21(3):535-47.

Butterworth JC, Deardorff WW. Psychometric profiles of craniomandibular pain patients: identifying specific subgroups. Cranio. 1987 Jul;5(3):225-32.

Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, Zhang Q, Schafer M, Loeffler JP, et al. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. J Clin Invest. 1997 Jul;100(1):142-8.

Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain--basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. J Oral Rehabil. 2010 May;37(6):391-410.

Capasso M, Avvisati RA, Piscopo C, Laforgia N, Raimondi F, de Angelis F, et al. Cytokine gene polymorphisms in Italian preterm infants: association between interleukin-10 -1082 G/A polymorphism and respiratory distress syndrome. Pediatr Res. 2007 Mar;61(3):313-7.

Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nat Genet. 1999 Jul;22(3):231-8.

Carlson CR, Okeson JP, Falace DA, Nitz AJ, Curran SL, Anderson D. Comparison of psychologic and physiologic functioning between patients with masticatory muscle pain and matched controls. J Orofac Pain. 1993 Winter;7(1):15-22.

Chalaye P, Goffaux P, Bourgault P, Lafrenaye S, Devroede G, Watier A, et al. Comparing pain modulation and autonomic responses in fibromyalgia and irritable bowel syndrome patients. Clin J Pain. 2012 Jul;28(6):519-26.

Chen JF, Aloyo VJ, Weiss B. Continuous treatment with the D2 dopamine receptor agonist quinpirole decreases D2 dopamine receptors, D2 dopamine receptor messenger RNA and proenkephalin messenger RNA, and increases mu opioid receptors in mouse striatum. Neuroscience. 1993 Jun;54(3):669-80.

Chung EY, Liu J, Zhang Y, Ma X. Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. Genes Immun. 2007 Oct;8(7):577-89.

Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB, Jr., Martins W, Jr., Assis GF, et al. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. J Leukoc Biol. 2008 Dec;84(6):1565-73.

Conti PC, de Alencar EN, da Mota Correa AS, Lauris JR, Porporatti AL, Costa YM. Behavioural changes and occlusal splints are effective in the management of masticatory myofascial pain: a short-term evaluation. J Oral Rehabil. 2012 Oct;39(10):754-60.

Conti PC, Ferreira PM, Pegoraro LF, Conti JV, Salvador MC. A cross-sectional study of prevalence and etiology of signs and symptoms of temporomandibular disorders in high school and university students. J Orofac Pain. 1996 Summer;10(3):254-62.

Correa PA, Gomez LM, Anaya JM. [Polymorphism of TNF-alpha in autoimmunity and tuberculosis].Biomedica. 2004 Jun;24 Supp 1:43-51.

Covelli V, Munno I, Pellegrino NM, Di Venere A, Jirillo E, Buscaino GA. Exaggerated spontaneous release of tumor necrosis factor-alpha/cachectin in patients with migraine without aura. Acta Neurol. 1990 Aug;12(4):257-63.

Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999 Jun;42(6):1101-8.

Cumming P, Brown E, Damsma G, Fibiger H. Formation and clearance of interstitial metabolites of dopamine and serotonin in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. J Neurochem. 1992 Nov;59(5):1905-14.

de Abreu TC, Nilner M, Thulin T, Vallon D. Office and ambulatory blood pressure in patients with craniomandibular disorders. Acta Odontol Scand. 1993 Jun;51(3):161-70.

De Boever JA, Van Wormhoudt K, De Boever EH. Reasons that patients do not return for appointments in the initial phase of treatment of temporomandibular disorders. J Orofac Pain. 1996 Winter;10(1):66-72.

De Kanter RJ, Truin GJ, Burgersdijk RC, Van 't Hof MA, Battistuzzi PG, Kalsbeek H, et al. Prevalence in the Dutch adult population and a meta-analysis of signs and symptoms of temporomandibular disorder. J Dent Res.1993 Nov;72(11):1509-18.

de Leeuw R. American Academy of Orofacial Pain Guidelines for Assessment, Diagnosis, and Management. 4th ed. Chicago: Quintessence; 2008a.

de Leeuw R. Dor orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento. São Paulo: Quintessence; 2010.

de Leeuw R. Internal derangements of the temporomandibular joint. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2008b May;20(2):159-68.

De Leo JA, Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML. The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. Pain. 2006 May;122(1-2):17-21.

de Moraes Maia ML, Ribeiro MA, Maia LG, Stuginski-Barbosa J, Costa YM, Porporatti AL, et al. Evaluation of low-level laser therapy effectiveness on the pain and masticatory performance of patients with myofascial pain. Lasers Med Sci. In press 2012.

de Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. Int Endod J. 2007 Jul;40(7):563-72.

Diatchenko L, Anderson AD, Slade GD, Fillingim RB, Shabalina SA, Higgins TJ, et al. Three major haplotypes of the beta2 adrenergic receptor define psychological profile, blood pressure, and the risk for development of a common musculoskeletal pain disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006a Jul;141B(5):449-62.

Diatchenko L, Nackley AG, Slade GD, Bhalang K, Belfer I, Max MB, et al. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms are associated with multiple pain-evoking stimuli. Pain. 2006b Dec;125(3):216-24.

Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. Hum Mol Genet. 2005 Jan;14(1):135-43.

DNA Genotek I. Long-term storage of Oragene™ samples. Ottawa: DNA Genotek, Inc.; 2004a.

DNA Genotek I. Oragene™ DNA self-collection kit. Ottawa: DNA Genotek, Inc.; 2004b.

Dodić S, Stanisić -Sinobad D, Vukadinović M, Milic A, Sinobad V. [The prevalence of craniomandibular disorders in the military population of the Republic of Serbia]. Med Pregl. 2006 May-Jun;59(5-6):259-64.

Dworkin BR, Elbert T, Rau H, Birbaumer N, Pauli P, Droste C, et al. Central effects of baroreceptor activation in humans: attenuation of skeletal reflexes and pain perception. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 5;91(14):6329-33.

Dworkin S. Personal and societal impact of orofacial pain. Orofacial pain and temporomandibular disorders. New York: Raven Press; 1995. p. 15-32.

Eder T, Mayer R, Langsenlehner U, Renner W, Krippl P, Wascher TC, et al. Interleukin-10 [ATA] promoter haplotype and prostate cancer risk: a population-based study. Eur J Cancer. 2007 Feb;43(3):472-5.

Edwards RR, Smith MT, Kudel I, Haythornthwaite J. Pain-related catastrophizing as a risk factor for suicidal ideation in chronic pain. Pain. 2006 Dec;126(1-3):272-9.

Eggleston DW. The interrelationship of stress and degenerative diseases. J Prosthet Dent. 1980 Nov;44(5):541-4.

Emad Y, Ragab Y, Zeinhom F, El-Khouly G, Abou-Zeid A, Rasker JJ. Hippocampus dysfunction may explain symptoms of fibromyalgia syndrome. A study with single-voxel magnetic resonance spectroscopy. J Rheumatol. 2008 Jul;35(7):1371-7.

Emery P, Salmon M. The immune response. 2. Systemic mediators of inflammation. Br J Hosp Med. 1991 Mar;45(3):164-8.

Emshoff R, Puffer P, Rudisch A, Gassner R. Temporomandibular joint pain: relationship to internal derangement type, osteoarthrosis, and synovial fluid mediator level of tumor necrosis factor-alpha. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000 Oct;90(4):442-9.

Enoch MA, Xu K, Ferro E, Harris CR, Goldman D. Genetic origins of anxiety in women: a role for a functional catechol-O-methyltransferase polymorphism. Psychiatr Genet. 2003 Mar;13(1):33-41.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996;14:397-440.

Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, Canedo P, Pereira F, Regalo G, et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2005 Apr;11(4):331-9.

Ferreira SB, Jr., Trombone AP, Repeke CE, Cardoso CR, Martins W, Jr., Santos CF, et al. An interleukin-1beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphism at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. Infect Immun. 2008 Aug;76(8):3725-34.

Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Van der Meer JW, et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. Mol Med. 2008 May-Jun;14(5-6):346-52.

Figueroa A, Kingsley JD, McMillan V, Panton LB. Resistance exercise training improves heart rate variability in women with fibromyalgia. Clin Physiol Funct Imaging. 2008 Jan;28(1):49-54.

Fillingim RB, Ohrbach R, Greenspan JD, Knott C, Dubner R, Bair E, et al. Potential psychosocial risk factors for chronic TMD: descriptive data and empirically identified domains from the OPPERA case-control study. J Pain. 2011a Nov;12(11 Suppl):T46-60.

Fillingim RB, Slade GD, Diatchenko L, Dubner R, Greenspan JD, Knott C, et al. Summary of findings from the OPPERA baseline case-control study: implications and future directions. J Pain. 2011b Nov;12(11 Suppl):T102-7.

Fillingim RB, Wallace MR, Herbstman DM, Ribeiro-Dasilva M, Staud R. Genetic contributions to pain: a review of findings in humans. Oral Dis. 2008 Nov;14(8):673-82.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest. 1998 Oct;102(7):1369-76.

Flor H, Birbaumer N, Schulte W, Roos R. Stress-related electromyographic responses in patients with chronic temporomandibular pain. Pain. 1991 Aug;46(2):145-52.

Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Epinephrine stimulates IL-6 expression in skeletal muscle and C2C12 myoblasts: role of c-Jun NH2-terminal kinase and histone deacetylase activity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004 May;286(5):E809-17.

Fu K, Ma X, Zhang Z, Chen W. Tumor necrosis factor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. J Oral Maxillofac Surg. 1995a Apr;53(4):424-6.

Fu K, Ma X, Zhang Z, Pang X, Chen W. Interleukin-6 in synovial fluid and HLA-DR expression in synovium from patients with temporomandibular disorders. J Orofac Pain. 1995b Spring;9(2):131-7.

Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, Dikranian A, Alten R, Pavelka K, et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. Lancet. 2013 May;381(9877):1541-50.

Garlet GP, Giozza SP, Silveira EM, Claudino M, Santos SB, Avila-Campos MJ, et al. Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. Clin Infect Dis. 2010 Feb;50(3):e11-8.

George SR, Kertesz M. Met-enkephalin concentrations in striatum respond reciprocally to alterations in dopamine neurotransmission. Peptides. 1987 May-Jun;8(3):487-92.

Gordon C, Wofsy D. Effects of recombinant murine tumor necrosis factor-alpha on immune function. J Immunol. 1990 Mar;144(5):1753-8.

Gottenberg JE, Dayer JM, Lukas C, Ducot B, Chiocchia G, Cantagrel A, et al. Serum IL-6 and IL-21 are associated with markers of B cell activation and structural progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort. Ann Rheum Dis. 2012 Jul;71(7):1243-8.

Granot M, Granovsky Y, Sprecher E, Nir RR, Yarnitsky D. Contact heat-evoked temporal summation: tonic versus repetitive-phasic stimulation. Pain. 2006 Jun;122(3):295-305.

Greenspan JD, Slade GD, Bair E, Dubner R, Fillingim RB, Ohrbach R, et al. Pain sensitivity risk factors for chronic TMD: descriptive data and empirically identified domains from the OPPERA case control study. J Pain. 2011 Nov;12(11 Suppl):T61-74.

Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. J Clin Invest. 1989 Feb;83(2):585-92.

Guimarães AL, de Sá AR, Victoria JM, de Fátima Correia-Silva J, Gomez MV, Gomez RS. Interleukin-1beta and serotonin transporter gene polymorphisms in burning mouth syndrome patients. J Pain. 2006 Sep;7(9):654-8.

Guo LH, Schluesener HJ. The innate immunity of the central nervous system in chronic pain: the role of Toll-like receptors. Cell Mol Life Sci. 2007 May;64(9):1128-36.

Hallman DM, Lyskov E. Autonomic regulation, physical activity and perceived stress in subjects with musculoskeletal pain: 24-hour ambulatory monitoring. Int J Psychophysiol. 2012 Dec;86(3):276-82.

Harkins SJ. Extrinsic trauma and temporomandibular dysfunction. Cranio. 1986 Jan;4(1):1-2.

Harms KC, Kapitza KP, Pahl L, Tran AT, Volkmann L, Buers D, et al. Association of TNF-alpha polymorphism rs1800629 with multisomatoform disorder in a group of German patients and healthy controls: an explorative study. Cytokine. 2013 Feb;61(2):389-93.

Harness DM, Donlon WC, Eversole LR. Comparison of clinical characteristics in myogenic, TMJ internal derangement and atypical facial pain patients. Clin J Pain. 1990 Mar;6(1):4-17.

Hart TC, Pihlstrom BL, Tabak LA. Oral health research at the crossroads: translate we must! J Endod. 2004 Oct;30(10):684-8.

Hayley S, Staines W, Merali Z, Anisman H. Time-dependent sensitization of corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin and c-fos immunoreactivity within the mouse brain in response to tumor necrosis factor-alpha. Neuroscience. 2001;106(1):137-48.

Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. Cephalalgia. 2004;24 Suppl 1:9-160.

Heiberg A, Heloe B, Heiberg AN, Heloe LA, Magnus P, Berg K, et al. Myofascial pain dysfunction (MPD) syndrome in twins. Community Dent Oral Epidemiol. 1980 Dec;8(8):434-6.

Heinz A, Smolka MN. The effects of catechol O-methyltransferase genotype on brain activation elicited by affective stimuli and cognitive tasks. Rev Neurosci. 2006;17(3):359-67.

Henningsen P, Zimmermann T, Sattel H. Medically unexplained physical symptoms, anxiety, and depression: a meta-analytic review. Psychosom Med. 2003 Jul-Aug;65(4):528-33.

Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, et al. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. J Neurochem. 2000 Sep;75(3):965-72.

Holt I, Cooper RG, Denton J, Meager A, Hopkins SJ. Cytokine inter-relationships and their association with disease activity in arthritis. Br J Rheumatol. 1992 Nov;31(11):725-33.

Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. J Gastroenterol Hepatol. 2007 Nov;22(11):1760-6.

Hua S, Cabot PJ. Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. Trends Pharmacol Sci. 2010 Sep;31(9):427-33.

Hutchinson MR, Zhang Y, Brown K, Coats BD, Shridhar M, Sholar PW, et al. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). Eur J Neurosci. 2008 Jul;28(1):20-9.

Inoue K. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. Pharmacol Ther. 2006 Jan;109(1-2):210-26.

Israel HA, Ward JD, Horrell B, Scrivani SJ. Oral and maxillofacial surgery in patients with chronic orofacial pain. J Oral Maxillofac Surg. 2003 Jun;61(6):662-7.

Julien N, Goffaux P, Arsenault P, Marchand S. Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. Pain. 2005 Mar;114(1-2):295-302.

Kacena MA, Merrel GA, Konda SR, Wilson KM, Xi Y, Horowitz MC. Inflammation and bony changes at the temporomandibular joint. Cells Tissues, Organs. 2001;169(3):257-64.

Kamarainen OP, Solovieva S, Vehmas T, Luoma K, Riihimaki H, Ala-Kokko L, et al. Common interleukin-6 promoter variants associate with the more severe forms of distal interphalangeal osteoarthritis. Arthritis Res Ther. 2008;10(1):R21.

Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, et al. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. Cancer Res. 1999 Sep;59(17):4225-7.

Kaneyama K, Segami N, Nishimura M, Suzuki T, Sato J. Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. Br J Oral Maxillofac Surg. 2002 Oct;40(5):418-23.

Kaneyama K, Segami N, Sun W, Sato J, Fujimura K. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1beta, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 Mar;99(3):276-84.

Kapel L, Glaros AG, McGlynn FD. Psychophysiological responses to stress in patients with myofascial pain-dysfunction syndrome. J Behav Med. 1989 Aug;12(4):397-406.

Karimbux NY, Saraiya VM, Elangovan S, Allareddy V, Kinnunen T, Kornman KS, et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. J Periodontol. 2012 Nov;83(11):1407-19.

Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. J Neurosci. 2008 May;28(20):5189-94.

Kelemen J, Lang E, Balint G, Trocsanyi M, Muller W. Orthostatic sympathetic derangement of baroreflex in patients with fibromyalgia. J Rheumatol. 1998 Apr;25(4):823-5.

Khasar SG, McCarter G, Levine JD. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. J Neurophysiol. 1999 Mar;81(3):1104-12.

Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. J Biol Chem. 2007 May;282(20):14975-83.

Kim SE, Chang L. Overlap between functional GI disorders and other functional syndromes: what are the underlying mechanisms? Neurogastroenterol Motil. 2012 Oct;24(10):895-913.

Kindler S, Samietz S, Houshmand M, Grabe HJ, Bernhardt O, Biffar R, et al. Depressive and anxiety symptoms as risk factors for temporomandibular joint pain: a prospective cohort study in the general population. J Pain. 2012 Dec;13(12):1188-97.

Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. Science. 1992 Oct;258(5082):593-7.

Kobayashi T, Murasawa A, Ito S, Yamamoto K, Komatsu Y, Abe A, et al. Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. J Periodontol. 2009 May;80(5):792-9.

Koh H, Robinson PG. Occlusal adjustment for treating and preventing temporomandibular joint disorders. J Oral Rehabil. 2004 Apr;31(4):287-92.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. 1996 Aug;19(8):312-8.

Kubota E, Kubota T, Matsumoto J, Shibata T, Murakami KI. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. J Oral Maxillofac Surg. 1998 Feb;56(2):192-8.

Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. J Pain. 2009 Sep;10(9):895-926.

Lee YH, Bae SC, Song GG. Meta-analysis demonstrates association between TLR polymorphisms and rheumatoid arthritis. Genet Mol Res. 2013;12(1):328-34.

Lee YH, Ji JD, Song GG. Association between interleukin 1 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a metaanalysis. J Rheumatol. 2009 Jan;36(1):12-5.

Lee YH, Ji JD, Song GG. Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a metaanalysis. J Rheumatol. 2007 Jan;34(1):43-9.

Li PP, Warsh JJ, Godse DD. Formation and clearance of norepinephrine glycol metabolites in mouse brain. J Neurochem. 1984 Nov;43(5):1425-33.

Liang DY, Guo T, Liao G, Kingery WS, Peltz G, Clark JD. Chronic pain and genetic background interact and influence opioid analgesia, tolerance, and physical dependence. Pain. 2006 Apr;121(3):232-40.

Light KC, Bragdon EE, Grewen KM, Brownley KA, Girdler SS, Maixner W. Adrenergic dysregulation and pain with and without acute beta-blockade in women with fibromyalgia and temporomandibular disorder. J Pain. 2009 May;10(5):542-52.

Longoni M, Ferrarese C. Inflammation and excitotoxicity: role in migraine pathogenesis. Neurol Sci. 2006 May;27 Suppl 2:S107-10.

Lorduy KM, Liegey-Dougall A, Haggard R, Sanders CN, Gatchel RJ. The Prevalence of Comorbid Symptoms of Central Sensitization Syndrome Among Three Different Groups of Temporomandibular Disorder Patients. Pain Pract. In press 2013.

Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, et al. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. Biochemistry. 1995 Apr;34(13):4202-10.

Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. Crit Care Med. 2003 Jan;31(1):34-8.

Lv X, Li Q, Wu S, Sun J, Zhang M, Chen YJ. Psychological stress alters the ultrastructure and increases IL-1beta and TNF-alpha in mandibular condylar cartilage. Braz J Med Biol Res. 2012 Oct;45(10):968-76.

Machelska H, Schopohl JK, Mousa SA, Labuz D, Schafer M, Stein C. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. J Neuroimmunol. 2003 Aug;141(1-2):30-9.

Machelska H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. Neuropeptides. 2007 Dec;41(6):355-63.

Maimone D, Cioni C, Rosa S, Macchia G, Aloisi F, Annunziata P. Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. J Neuroimmunol. 1993 Aug;47(1):73-81.

Maixner W, Greenspan JD, Dubner R, Bair E, Mulkey F, Miller V, et al. Potential autonomic risk factors for chronic TMD: descriptive data and empirically identified domains from the OPPERA case-control study. J Pain. 2011 Nov;12(11 Suppl):T75-91.

Männistö PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. Pharmacol Rev. 1999 Dec;51(4):593-628.

Marbach JJ, Levitt M. Erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in facial pain patients. J Dent Res. 1976 Jul-Aug;55(4):711.

Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. Nat Rev Neurosci. 2005 Jul;6(7):521-32.

Martinez-Jauand M, Sitges C, Rodriguez V, Picornell A, Ramon M, Buskila D, et al. Pain sensitivity in fibromyalgia is associated with catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. Eur J Pain. 2013 Jan;17(1):16-27.

Martinez-Lavin M, Hermosillo AG. Autonomic nervous system dysfunction may explain the multisystem features of fibromyalgia. Semin Arthritis Rheum. 2000 Feb;29(4):197-9.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. N Engl J Med. 1998 Jan 15;338(3):171-9.

McNeill C, Danzig WM, Farrar WB, Gelb H, Lerman MD, Moffett BC, et al. Position paper of the American Academy of Craniomandibular Disorders. Craniomandibular (TMJ) disorders--the state of the art. J Prosthet Dent. 1980 Oct;44(4):434-7.

Meagher MW, Arnau RC, Rhudy JL. Pain and emotion: effects of affective picture modulation. Psychosom Med. 2001 Jan-Feb;63(1):79-90.

Merrill RL. Central mechanisms of orofacial pain. Dent Clin North Am. 2007 Jan;51(1):45-59.

Miller VJ, Yoeli Z, Barnea E, Zeltser C. The effect of parafunction on condylar asymmetry in patients with temporomandibular disorders. J Oral Rehabil. 1998 Sep;25(9):721-4.

Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. Nat Rev Neurosci. 2009 Jan;10(1):23-36.

Mobascher A, Brinkmeyer J, Thiele H, Toliat MR, Steffens M, Warbrick T, et al. The val158met polymorphism of human catechol-O-methyltransferase (COMT) affects anterior cingulate cortex activation in response to painful laser stimulation. Mol Pain. 2010;6:32.

Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, Fischer O, Hofmann J, Hellweg R, et al. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. Brain. 2007 Feb;130(Pt 2):502-13.

Movat HZ. Tumor necrosis factor and interleukin-1: role in acute inflammation and microvascular injury. J Lab Clin Med. 1987 Dec;110(6):668-81.

Mroz TE, Norvell DC, Ecker E, Gruenberg M, Dailey A, Brodke DS. Fusion versus nonoperative management for chronic low back pain: do sociodemographic factors affect outcome? Spine. 2011 Oct;36(21 Suppl):S75-86.

Mueller A, Strahler J, Armbruster D, Lesch KP, Brocke B, Kirschbaum C. Genetic contributions to acute autonomic stress responsiveness in children. Int J Psychophysiol. 2012 Mar;83(3):302-8.

Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). J Exp Med. 1998 Jun;187(12):2097-101.

Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, et al. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. Science. 2006 Dec;314(5807):1930-3.

Nackley AG, Tan KS, Fecho K, Flood P, Diatchenko L, Maixner W. Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both beta2- and beta3-adrenergic receptors. Pain. 2007 Apr;128(3):199-208.

Nackley AG, Tan KS, Fecho K, Flood P, Maixner W, Diatchenko L. COMT modulates pain sensitivity and cytokine production through both β2 and β3 adrenergic receptors. Washington, DC: Society for Neuroscience; 2005 apud Nackley AG, Tan KS, Fecho K, Flood P, Diatchenko L, Maixner W. Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both beta2- and beta3-adrenergic receptors. Pain. 2007 Apr;128(3):199-208.

Nicotra L, Loram LC, Watkins LR, Hutchinson MR. Toll-like receptors in chronic pain. Exp Neurol. 2012 Apr;234(2):316-29.

Nilner M. Relationships between oral parafunctions and functional disturbances in the stomatognathic system among 15- to 18-year-olds. Acta Odontol Scand. 1983 Aug;41(4):197-201.

Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K. Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. Ann Rheum Dis.2000 Nov;59 Suppl 1:i21-7.

Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Sato J, Fujimura K. Comparison of cytokine level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases in arthrocentesis of the temporomandibular joint. J Oral Maxillofac Surg. 2004 Mar;62(3):284-7; discussion 7-8.

Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Suzuki T, Miyamaru M. Proinflammatory cytokines and arthroscopic findings of patients with internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint. Br J Oral Maxillofac Surg. 2002 Feb;40(1):68-71.

Nissenbaum J, Devor M, Seltzer Z, Gebauer M, Michaelis M, Tal M, et al. Susceptibility to chronic pain following nerve injury is genetically affected by CACNG2. Genome Res. 2010 Sep;20(9):1180-90.

Normand E, Potvin S, Gaumond I, Cloutier G, Corbin JF, Marchand S. Pain inhibition is deficient in chronic widespread pain but normal in major depressive disorder. J Clin Psychiatry. 2011 Feb;72(2):219-24.

Obara I, Makuch W, Spetea M, Schutz J, Schmidhammer H, Przewlocki R, et al. Local peripheral antinociceptive effects of 14-O-methyloxymorphone derivatives in inflammatory and neuropathic pain in the rat. Eur J Pharmacol. 2007 Mar;558(1-3):60-7.

Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, et al. Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2005 Sep;44(9):1115-21.

Ogura N, Tobe M, Sakamaki H, Nagura H, Abiko Y, Kondoh T. Tumor necrosis factor-alpha increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint. J Oral Pathol Med. 2005 Jul;34(6):357-63.

Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, et al. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul;95(14):8222-6.

Olesen J, Bousser MG, Diener HC, Dodick D, First M, Goadsby PJ, et al. New appendix criteria open for a broader concept of chronic migraine. Cephalalgia. 2006 Jun;26(6):742-6.

Olsson CA, Anney RJ, Lotfi-Miri M, Byrnes GB, Williamson R, Patton GC. Association between the COMT Val158Met polymorphism and propensity to anxiety in an Australian population-based longitudinal study of adolescent health. Psychiatr Genet. 2005 Jun;15(2):109-15.

Opree A, Kress M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. J Neurosci. 2000 Aug 15;20(16):6289-93.

O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A, Rahman P. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. Pharmacogenomics J. 2009 Jun;9(3):161-7.

Ozturk A, Yildiz L. Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 1 and toll-like receptor 4 in aggressive periodontitis and in chronic periodontitis. Journal of periodontal research. 2011 Aug;46(4):475-82.

Pirhan D, Atilla G, Emingil G, Sorsa T, Tervahartiala T, Berdeli A. Effect of MMP-1 promoter polymorphisms on GCF MMP-1 levels and outcome of periodontal therapy in patients with severe chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2008 Oct;35(10):862-70.

Pitman RK, van der Kolk BA, Orr SP, Greenberg MS. Naloxone-reversible analgesic response to combat-related stimuli in posttraumatic stress disorder. A pilot study. Arch Gen Psychiatry. 1990 Jun;47(6):541-4.

Planello AC, Campos MI, Meloto CB, Secolin R, Rizatti-Barbosa CM, Line SR, et al. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration. Eur J Oral Sci. 2011 Feb;119(1):1-6.

Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. Eur J Clin Invest. 1992 Jun;22(6):396-402.

Poli F, Boschiero L, Giannoni F, Tonini M, Scalamogna M, Ancona G, et al. Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism: implications in kidney transplantation. Cytokine. 2000 Dec;12(12):1778-83.

Poveda Roda R, Bagan JV, Diaz Fernandez JM, Hernandez Bazan S, Jimenez Soriano Y. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: classification, epidemiology and risk factors. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007 Aug;12(4):E292-8.

Pullinger AG, Seligman DA, Gornbein JA. A multiple logistic regression analysis of the risk and relative odds of temporomandibular disorders as a function of common occlusal features. J Dent Res. 1993 Jun;72(6):968-79.

Raja SN, Campbell JN, Meyer RA. Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin. Brain. 1984 Dec;107 (Pt 4):1179-88.

Rakvag TT, Ross JR, Sato H, Skorpen F, Kaasa S, Klepstad P. Genetic variation in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and morphine requirements in cancer patients with pain. Mol Pain. 2008;4:64.

Randich A, Maixner W. Interactions between cardiovascular and pain regulatory systems. Neurosci Biobehav Rev. 1984 Fall;8(3):343-67.

Raphael KG, Marbach JJ, Gallagher RM, Dohrenwend BP. Myofascial TMD does not run in families. Pain. 1999 Mar;80(1-2):15-22.

Reid KI, Gracely RH, Dubner RA. The influence of time, facial side, and location on pain-pressure thresholds in chronic myogenous temporomandibular disorder. J Orofac Pain. 1994 Summer;8(3):258-65.

Reissmann DR, John MT, Schierz O, Seedorf H, Doering S. Stress-related adaptive versus maladaptive coping and temporomandibular disorder pain. J Orofac Pain. 2012 Summer;26(3):181-90.

Repeke CE, Trombone AP, Ferreira SB, Jr., Cardoso CR, Silveira EM, Martins W, Jr., et al. Strong and persistent microbial and inflammatory stimuli overcome the genetic predisposition to higher matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression: a mechanistic explanation for the lack of association of MMP1-1607 single-nucleotide polymorphism genotypes with MMP-1 expression in chronic periodontitis lesions. J Clin Periodontol. 2009 Sep;36(9):726-38.

Reyes del Paso GA, Garrido S, Pulgar A, Duschek S. Autonomic cardiovascular control and responses to experimental pain stimulation in fibromyalgia syndrome. J Psychosom Res. 2011 Feb;70(2):125-34.

Reyes Del Paso GA, Garrido S, Pulgar A, Martin-Vazquez M, Duschek S. Aberrances in autonomic cardiovascular regulation in fibromyalgia syndrome and their relevance for clinical pain reports. Psychosom Med. 2010 Jun;72(5):462-70.

Rhudy JL, Meagher MW. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. Pain. 2000 Jan;84(1):65-75.

Robinson ME, Wise EA, Gagnon C, Fillingim RB, Price DD. Influences of gender role and anxiety on sex differences in temporal summation of pain. J Pain. 2004 Mar;5(2):77-82.

Rodriguez-Carreon AA, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, Montes de Oca JV, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. J Autoimmun. 2005 Feb;24(1):63-8.

Rogers NL, Cole SA, Lan HC, Crossa A, Demerath EW. New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. Am J Hum Biol. 2007 May-Jun;19(3):319-26.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature. 2001 Feb;409(6822):928-33.

Sandler NA, Buckley MJ, Cillo JE, Braun TW. Correlation of inflammatory cytokines with arthroscopic findings in patients with temporomandibular joint internal derangements. J Oral Maxillofac Surg. 1998 May;56(5):534-43; discussion 43-4.

Schellhas KP, Pollei SR, Wilkes CH. Pediatric internal derangements of the temporomandibular joint: effect on facial development. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1993 Jul;104(1):51-9.

Schmitter M, Rammelsberg P, Hassel A. The prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders in very old subjects. J Oral Rehabil. 2005 Jul;32(7):467-73.

Schommer NC, Hellhammer DH, Kirschbaum C. Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic-adrenal-medullary system to repeated psychosocial stress. Psychosom Med. 2003 May-Jun;65(3):450-60.

Schurks M, Kurth T, Buring JE, Zee RY. A candidate gene association study of 77 polymorphisms in migraine. J Pain. 2009 Jul;10(7):759-66.

Segami N, Miyamaru M, Nishimura M, Suzuki T, Kaneyama K, Murakami K. Does joint effusion on T2 magnetic resonance images reflect synovitis? Part 2. Comparison of concentration levels of proinflammatory cytokines and total protein in synovial fluid of the temporomandibular joint with internal derangements and osteoarthrosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Oct;94(4):515-21.

Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. Minerva Anestesiol. 2005 Apr;71(4):117-36.

Shafer DM, Assael L, White LB, Rossomando EF. Tumor necrosis factor-alpha as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joints with internal derangements. J Oral Maxillofac Surg. 1994 Aug;52(8):786-91; discussion 91-2.

Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. Am J Hum Genet. 2002 Dec;71(6):1296-302.

Shin HD, Park BL, Kim YH, Cheong HS, Lee IH, Park SK. Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. Exp Mol Med. 2005 Apr;37(2):128-32.

Simons DG, Travell JG, Simons LS. Pain and dysfunction: the trigger point manual. 2. ed. Baltimore: Lipincot Williams & Wilkins; 1999.

Slade GD, Diatchenko L, Ohrbach R, Maixner W. Orthodontic Treatment, Genetic Factors and Risk of Temporomandibular Disorder. Semin Orthod. 2008 Jun;14(2):146-56.

Slade GD, Sanders AE, Bair E, Brownstein N, Dampier D, Knott C, et al. Preclinical episodes of orofacial pain symptoms and their association with health care behaviors in the OPPERA prospective cohort study. Pain. 2013 May;154(5):750-60.

Smith AJ, Basu MK, Speculand B, Kassem MA, Lloyd JM. Synovial fluid glycosaminoglycan (acid mucopolysaccharide) analysis in assessment of temporomandibular joint dysfunction. A pilot study. Br J Oral Maxillofac Surg. 1989 Oct;27(5):853-61.

Smith MT, Haythornthwaite JA. How do sleep disturbance and chronic pain inter-relate? Insights from the longitudinal and cognitive-behavioral clinical trials literature. Sleep Med Rev. 2004 Apr;8(2):119-32.

Smith SB, Maixner DW, Greenspan JD, Dubner R, Fillingim RB, Ohrbach R, et al. Potential genetic risk factors for chronic TMD: genetic associations from the OPPERA case control study. J Pain. 2011 Nov;12(11 Suppl):T92-101.

Smolka MN, Schumann G, Wrase J, Grusser SM, Flor H, Mann K, et al. Catechol-O-methyltransferase val158met genotype affects processing of emotional stimuli in the amygdala and prefrontal cortex. J Neurosci. 2005 Jan;25(4):836-42.

Solberg Nes L, Carlson CR, Crofford LJ, de Leeuw R, Segerstrom SC. Self-regulatory deficits in fibromyalgia and temporomandibular disorders. Pain. 2010 Oct;151(1):37-44.

Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. Neurosci Lett. 2004 May;361(1-3):184-7.

Staud R. Abnormal endogenous pain modulation is a shared characteristic of many chronic pain conditions. Expert Rev Neurother. 2012 May;12(5):577-85.

Stein C, Gramsch C, Herz A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. J Neurosci. 1990 Apr;10(4):1292-8.

Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. Curr Opin Pharmacol. 2009 Feb;9(1):3-8.

Stein C, Schafer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. Nat Med. 2003 Aug;9(8):1003-8.

Stein C, Zollner C. Opioids and sensory nerves. Handb Exp Pharmacol. 2009(194):495-518.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.

Stohler CS. Taking stock: from chasing occlusal contacts to vulnerability alleles. Orthod Craniofac Res. 2004 Aug;7(3):157-61.

Suma S, Veerendra Kumar B. Temporomandibular disorders and functional somatic syndromes: deliberations for the dentist. Indian J Dent Res. 2012 Jul-Aug;23(4):529-36.

Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. J Neurosci. 2004 Jan;24(1):1-7.

Takahashi T, Kondoh T, Fukuda M, Yamazaki Y, Toyosaki T, Suzuki R. Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998 Feb;85(2):135-41.

Takeuchi Y, Zeredo JL, Fujiyama R, Amagasa T, Toda K. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. Neurosci Lett. 2004 Jan;354(2):172-4.

Tammimäki A, Männistö PT. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and chronic human pain: a systematic review and meta-analysis. Pharmacogenet Genomics. 2012 Sep;22(9):673-91.

Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. J Dent Res. 2008 Apr;87(4):296-307.

Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr;102(16):5856-61.

Tchivileva IE, Lim PF, Smith SB, Slade GD, Diatchenko L, McLean SA, et al. Effect of catechol-O-methyltransferase polymorphism on response to propranolol therapy in chronic musculoskeletal pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover pilot study. Pharmacogenet Genomics. 2010 Apr;20(4):239-48.

Tchivileva IE, Nackley AG, Qian L, Wentworth S, Conrad M, Diatchenko LB. Characterization of NF-kB-mediated inhibition of catechol-O-methyltransferase. Mol Pain. 2009;5:13.

Tenenbaum HC, Mock D, Gordon AS, Goldberg MB, Grossi ML, Locker D, et al. Sensory and affective components of orofacial pain: is it all in your brain? Crit Rev Oral Biol Med. 2001;12(6):455-68.

Thompson SW, Woolf CJ, Sivilotti LG. Small-caliber afferent inputs produce a heterosynaptic facilitation of the synaptic responses evoked by primary afferent A-fibers in the neonatal rat spinal cord in vitro. J Neurophysiol. 1993 Jun;69(6):2116-28.

Torrance GW, Feeny D, Furlong W. Visual analog scales: do they have a role in the measurement of preferences for health states? Med Decis Making. 2001 Jul-Aug;21(4):329-34.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nat Rev Immunol. 2007 Mar;7(3):179-90.

Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, de Moura-Costa LF, Vale VC, Galdino-Neto M, et al. P. Gingivalis HmuY-Induced Production of Interleukin-6 and IL-6 Polymorphism in Chronic Periodontitis. J Periodontol. 2013 May;84(5):650-5.

Trombone AP, Cardoso CR, Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Martins W, Jr., Campanelli AP, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308G/A single nucleotide polymorphism and red-complex periodontopathogens are independently associated with increased levels of tumor necrosis factor-alpha in diseased periodontal tissues. J Periodontal Res. 2009 Oct;44(5):598-608.

Trombone AP, Claudino M, Colavite P, de Assis GF, Avila-Campos MJ, Silva JS, et al. Periodontitis and arthritis interaction in mice involves a shared hyper-inflammatory genotype and functional immunological interferences. Genes Immun. 2010 Sep;11(6):479-89.

Tuerlings V, Limme M. The prevalence of temporomandibular joint dysfunction in the mixed dentition. Eur J Orthod. 2004 Jun;26(3):311-20.

Uchino BN, Cacioppo JT, Malarkey W, Glaser R. Individual differences in cardiac sympathetic control predict endocrine and immune responses to acute psychological stress. J Pers Soc Psychol. 1995 Oct;69(4):736-43.

United States Department of Health and Human Services. National Center for Health Statistics. National Ambulatory Medical Care Survey, 1979. ICPSR08048-v1. Ann Arbor, MI: Inter-university Consortium for Political and Social Research [distributor], 1983 apud Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. Hum Mol Genet. 2005 Jan;14(1):135-43.

van der Veek PP, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW, Masclee AA. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. Am J Gastroenterol. 2005 Nov;100(11):2510-6.

van Selms MK, Lobbezoo F, Visscher CM, Naeije M. Myofascial temporomandibular disorder pain, parafunctions and psychological stress. J Oral Rehabil. 2008 Jan;35(1):45-52.

Verhaak PF, Kerssens JJ, Dekker J, Sorbi MJ, Bensing JM. Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature. 1998 Sep;77(3):231-9.

Vernal R, Velasquez E, Gamonal J, Garcia-Sanz JA, Silva A, Sanz M. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. Arch Oral Biol. 2008 Oct;53(10):910-5.

Vetter I, Kapitzke D, Hermanussen S, Monteith GR, Cabot PJ. The effects of pH on beta-endorphin and morphine inhibition of calcium transients in dorsal root ganglion neurons. J Pain. 2006 Jul;7(7):488-99.

Walters ET. Injury-related behavior and neuronal plasticity: an evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia, and analgesia. Int Rev Neurobiol. 1994;36:325-427.

Weissman-Fogel I, Moayedi M, Tenenbaum HC, Goldberg MB, Freeman BV, Davis KD. Abnormal cortical activity in patients with temporomandibular disorder evoked by cognitive and emotional tasks. Pain. 2011 Feb;152(2):384-96.

Wiese M, Svensson P, Bakke M, List T, Hintze H, Petersson A, et al. Association between temporomandibular joint symptoms, signs, and clinical diagnosis using the RDC/TMD and radiographic findings in temporomandibular joint tomograms. J Orofac Pain. 2008 Summer;22(3):239-51.

Williamson M. Fibromyalgia: a comprehensive approach. New York: Walker and Company; 1996.

Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science. 2000 Jun;288(5472):1765-9.

Woolf CJ, Wall PD. Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. J Neurosci. 1986 May;6(5):1433-42.

Yemm R. Neurophysiologic studies of temporomandibular joint dysfunction. Oral Sci Rev. 1976;7:31-53.

Yilmaz IA, Ozge A, Erdal ME, Edgunlu TG, Cakmak SE, Yalin OO. Cytokine polymorphism in patients with migraine: some suggestive clues of migraine and inflammation. Pain Med. 2010 Apr;11(4):492-7.

Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. Cytokine. 2005 May;30(4):188-94.

Yoshihara T, Shigeta K, Hasegawa H, Ishitani N, Masumoto Y, Yamasaki Y. Neuroendocrine responses to psychological stress in patients with myofascial pain. J Orofac Pain. 2005 Summer;19(3):202-8.

Yu XM, Sessle BJ, Haas DA, Izzo A, Vernon H, Hu JW. Involvement of NMDA receptor mechanisms in jaw electromyographic activity and plasma extravasation induced by inflammatory irritant application to temporomandibular joint region of rats. Pain. 1996 Nov;68(1):169-78.

Zarb GA, Carlsson GE. Temporomandibular disorders: osteoarthritis. Orofac Pain. 1999 Fall;13(4):295-306.

Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. Science. 2003 Feb;299(5610):1240-3.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 118/2010

Bauru, 07 de julho de 2011.

Senhor Professor,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa ***Características genéticas, ambientais e comportamentais nas disfunções temporomandibulares,*** de autoria de Bruno D'Aurea Furquin, foi novamente analisado em reunião realizada no dia **06 de julho de 2011.**

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti
Docente do Departamento de Prótese

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do trabalho: **POTENCIAL INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NAS DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES**

Autor: Bruno D'Aurea Furquim / Orientador: Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar as características dos pacientes portadores de dores na articulação da mandíbula ou nos músculos da face. Serão realizados três procedimentos distintos, todos na mesma visita, sendo eles:

1) Entrevista: será realizada uma entrevista que busca relembrar todos os fatos que possam estar relacionados com as dores na articulação ou nos músculos.

2) Exame clínico: será realizado um exame clínico dos músculos e da articulação da boca. Nesse exame, seus músculos e articulação serão palpados para vermos se eles apresentam-se doloridos. Também pediremos que você abra e feche a boca para observarmos se existe algum problema na articulação durante a fala ou mastigação

3) Por fim, será realizada a coleta de sua saliva, um procedimento rápido, simples e indolor. A saliva será usada para avaliação de seu perfil genético. Vamos avaliar informações herdadas de seus pais, presentes em suas células de saliva, e vamos investigar se essas informações poderão estar relacionadas com as dores na face.

Durante o exame clínico, se for detectada qualquer alteração, você será encaminhado para tratamento especializado na clínica de Disfunção Temporomandibular da própria Faculdade. Deve ficar claro que a realização desses exames, em nenhum momento, oferece qualquer risco à sua saúde ou vai causar qualquer dano às estruturas examinadas. Ainda, quando da publicação dos resultados dessa pesquisa em revistas especializadas, a sua identidade ficará preservada em todos os aspectos. Se, em qualquer momento, você desejar sair do estudo, não haverá qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento na instituição. Qualquer dúvida ou questionamento que surgir, antes, durante ou após os testes, pode ser esclarecida diretamente com o examinador (telefone: (14) 3235-8277, email: brunofurquim@hotmail.com) ou com o Comitê de Ética à Pesquisa desta Faculdade ((14) 3235-8356).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo para participar dessa pesquisa.

Bauru-SP, ____ de _____ de _____

_____	_____
Bruno D'Aurea Furquim Cirurgião-dentista, doutorando em Reabilitação Oral FOB-USP	assinatura Paciente ou responsável

.

ANEXO C – Classificação das Disfunções temporomandibulares proposta pela Academia Americana de Dor Orofacial

As DTMs são divididas em distúrbios da ATM e distúrbios dos músculos mastigatórios. Será apresentada a classificação diagnóstica da Sociedade Internacional de Cefaleias (IHS) e os códigos da Classificação Internacional de Doenças (Nona Revisão) (DE LEEUW 2008a).

Distúrbios articulares da ATM

Distúrbios congênitos ou de desenvolvimento (IHS 11.1.1.x)

Aplasia (IHS 11.1.1.1; ICD-9 754.0)

Hipoplasia (IHS 11.1.1.2; ICD-9 526.89)

Hiperplasia (IHS 11.1.1.3; ICD-9 526.89

Displasia (IHS 11.1.1.3; ICD-9 526.89)

Neoplasia (IHS 11.1.2.1; ICD-9 213.1 [benigna]; 170.1 [maligna]

Distúrbios de desarranjo do disco (IHS 11.7.1.1.x; ICD-9 524.63)

Deslocamento do disco com redução (IHS 11.7.1.1.1; ICD-9 524.63)

Deslocamento do disco sem redução (IHS 11.7.1.1.2; ICD-9 524.63)

Deslocamento da ATM (IHS 11.7.1.2; ICD-9 830.0)

Distúrbios inflamatórios (IHS 11.7.1.3.x)

Sinovite e capsulite (IHS 11.7.1.3.1 ICD-9 524.62 ou 726.90 ou 716.98)

Poliartrite (IHS 11.7.1.3.2; ICD-9 714.9)

Distúrbios não inflamatórios (IHS 11.7.4.x)

Osteoartrite primária (IHS 11.7.4.1; ICD-9 715.18)

Osteoartrite secundária (IHS 11.7.1.4.2; ICD-9 715.28)

Anquilose (IHS 11.7.1.5; ICD-9 524.61)

Fratura (IHS 11.7.1.6; ICD-9 802.2x fechada; ICD-9 802.3x aberta)

Distúrbios dos músculos mastigatórios

Mialgia local (IHS 11.7.2.1; ICD-9 729.1)

Dor miofascial (IHS 11.7.2.2; ICD-9 729.1)

Mialgia mediada centralmente (IHS 11.7.2.3; ICD-9 729.1)

Mioespasmo (IHS 11.7.2.4; ICD-9 728.85)

Miosite (IHS 11.7.2.5; ICD-9 728.81)

Contratura miofibrótica (IHS 11.7.2.6; ICD-9 728.9)

Neoplasia dos músculos mastigatórios (IHS 11.7.2.7; ICD-9-CM 171.0)

ANEXO D – Escalas visuais analógicas de dor

1) Indique o seu nível de *dor neste momento*, marcando com uma linha vertical a escala abaixo. A extremidade esquerda indica ausência total de dor e a extremidade direita indica a pior dor imaginável.

sem dor pior dor imaginável

2) Indique *o nível da pior dor sentida nos últimos 30 dias*, marcando com uma linha vertical a escala abaixo. A extremidade esquerda indica ausência total de dor e a extremidade direita indica a pior dor imaginável.

sem dor pior dor imaginável

3) Indique *a média de dor sentida nos últimos 30 dias*, marcando com uma linha vertical a escala abaixo. A extremidade esquerda indica ausência total de dor e a extremidade direita indica a pior dor imaginável.

sem dor pior dor imaginável