



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Luciana Secches de Freitas

**Associação da Disfunção
Temporomandibular com o
Polimorfismo 102T-C do Gene do Receptor
da Serotonina – *HTR2A***

**São José do Rio Preto
2011**

Luciana Secches de Freitas

Associação da Disfunção

Temporomandibular com o

Polimorfismo102T-C do Gene do Receptor

da Serotonina – *HTR2A*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto

São José do Rio Preto
2011

de Freitas, Luciana Secches

Associação da disfunção temporomandibular com o polimorfismo
102T-C do gene do receptor da serotonina – *HTR2A* / Luciana
Venâncio Secches

São José do Rio Preto, 2011

66 p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

Coorientadora: Vânia Belintani Piatto

1. Disfunção temporomandibular; 2. Serotonina; 3. Gene *HTR2A*; 4.
Polimorfismo.

Luciana Secches de Freitas

Associação da Disfunção

Temporomandibular com o

Polimorfismo102T-C do Gene do Receptor

da Serotonina – *HTR2A*

Banca Examinadora

Dissertação para Obtenção do Grau de Doutor

Presidente e Orientador: **Prof. Dr. José Victor Maniglia**

2º Examinador: **Prof. Dr. Ana Regina Chinelato Fernandes**

3º Examinador: **Prof. Dr. Nely Silva Aragão De Marchi**

4º Examinador: **Prof. Dr. Fernando Drimel Molina**

5º Examinador: **Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos**

Suplentes: **Prof. Dr. Dorotéia Rossi Silva Souza**

Prof. Dr. Luis Fernando Landucci

São José do Rio Preto, 08/07/2011

| | |
|---|-----------|
| 3. Casuística e Método | 22 |
| 3.1. Exame Físico Específico | 24 |
| 3.2. Investigação Molecular..... | 27 |
| 3.2.1. Extração de DNA Genômico..... | 27 |
| 3.2.1.1. Protocolo de Extração de DNA a Partir de Sangue Total por Meio do Kit de Extração de DNA Genômico..... | 28 |
| 3.2.2. Detecção do Polimorfismo 102T-C..... | 30 |
| 3.2.2.1. Ampliação do Gene HTR2A pelo Teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 30 |
| 3.2.2.2. Análise de Restrição (Técnica da RFLP) do Fragmento Amplificado do Gene J-HTR2A..... | 32 |
| 3.3. Análise Estatística | 33 |
| 4. Resultados | 35 |
| 5. Discussão | 43 |
| 6. Conclusões | 52 |
| 7. Referências Bibliográficas | 54 |
| 8. Anexos | 63 |

- ✓ A Deus, que me acompanha e me orienta em todos os momentos de minha vida.

Para os que creem, Deus está no princípio das coisas.

Para os cientistas, no final de toda reflexão.

Max Planck

- ✓ Ao meu orientador **Prof. Dr. José Victor Maniglia**, pelo carinho, apoio e dedicação e principalmente pela amizade verdadeira e confiança que fez com que os laços de trabalho se tornassem muito mais prazerosos e felizes. Toda a minha admiração e respeito!

“E se tiver vontade de escrever alguma coisa sobre mim, diga apenas uma frase: “Foi meu amigo, acreditou em mim e me quis mais perto de Deus”

Vinícius de Moraes

Agradecimentos

- ✓ A minha coorientadora **Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto**, pela dedicação, paciência e confiança. A sua paixão pela ciência é um grande exemplo e motivação para continuar na busca pelas respostas diárias.

- ✓ A minha mãe **Lucia** (*in memoriam*) e meu pai **Marino**, pelo exemplo de trabalho, amor e confiança com que me ensinaram a caminhar pela vida.

- ✓ Ao meu marido **Renato**, meu maior colaborador em todos os sentidos, pelo companheirismo, amor e paciência. Saiba que seu amor me proporciona a segurança necessária para acreditar em todos os meus sonhos!

- ✓ Aos meus filhos **Otávio, Heitor e Maria Teresa**, razão de todo meu esforço e motivo de toda a minha alegria.

- ✓ A minha sogra “**Cidinha**” pelo auxílio incondicional durante todo este projeto.

- ✓ Aos meus irmãos **Lucimar, Junior, Marcos e Marlene**, que estão sempre ao meu lado me dando o apoio nos momentos de alegria e tristeza. Deus permita continuarmos sempre unidos.

- ✓ À **Prof. Dra. Zaida Aurora S. G. Soler**, grande amiga que sempre acreditou em mim.

- ✓ À **Faculdade de Medicina** e ao **Hospital de Base de São José do Rio Preto**, nas pessoas de seus diretores, pela oportunidade que tive para a realização deste trabalho.

- ✓ À **Pós-Graduação** da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, na pessoa de seu coordenador e demais colaboradores.

- ✓ A **todas as pessoas** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta investigação.

“Todos são capazes de dominar a dor, exceto quem a sente”

William Shakespeare

- Figura 1.** Esquema representando os produtos da PCR após análise de restrição pela enzima *MspI*..... 33
- Figura 2.** Fotografia do DNA genômico das amostras identificadas de 1 a 5, em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas correspondentes ao DNA de cada amostra. M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 38
- Figura 3.** Fotografia do produto da PCR - fragmento de 342 pb amplificado do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 3 - amostras do estudo. B - reação "Branca" (sem DNA). M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 38
- Figura 4.** Fotografia do produto da RFLP (digestão enzimática) - fragmentos de 342, 217 e 125 pb do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 3 – genótipos das amostras do estudo: Coluna 1: TT (homozigoto selvagem); Coluna 2: TC (heterozigoto); Coluna 3: CC (homozigoto mutante). As setas indicam os fragmentos correspondentes às amostras nas Colunas 1 a 3. M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 39

Lista de Tabelas e Quadro

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1. | Distribuição dos dados demográficos dos casos índice (n=100) em relação ao grupo controle (n=100)..... | 37 |
| Tabela 2. | Distribuição dos genótipos encontrados nos casos índice e controles para o polimorfismo 102T-C no gene <i>HTR2A</i> | 40 |
| Tabela 3. | Distribuição do gênero dos casos índice e controles em relação aos genótipos encontrados para o polimorfismo 102T-C no gene <i>HTR2A</i> | 41 |
| Tabela 4. | Relação genotípica entre casos índice e controles para o polimorfismo 102T-C no gene <i>HTR2A</i> | 41 |
| Tabela 5. | Relação alélica entre casos índice e controles para o polimorfismo 102T-C no gene <i>HTR2A</i> | 42 |
| Quadro 1. | Sequência dos "primers" para PCR do gene <i>HTR2A</i> | 30 |

Lista de Abreviaturas e Símbolos

| | |
|--------------------|---|
| 5-HT | - 5-hidroxitriptamina, serotonina |
| 5-HT _{2A} | - receptor da serotonina subtipo A |
| 5-HT _{2B} | - receptor da serotonina subtipo B |
| 5-HT _{2C} | - receptor da serotonina subtipo C |
| <i>HTR2A</i> | - gene receptor da serotonina |
| AMPA | - α amino-5-metil-4-isoxalona propionato |
| ATM | - articulação temporomandibular |
| COX | - cicloxigenase |
| dATP | - Desoxinucleotídeo trifosfato adenina |
| dCTP | - Desoxinucleotídeo trifosfato citosina |
| dGTP | - Desoxinucleotídeo trifosfato guanina |
| DNA | - Ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | - Desoxinucleotídeos trifosfato |
| DTM | - disfunção da articulação temporomandibular |
| dTTP | - Desoxinucleotídeo trifosfato timina |
| EDTA | - Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| IGF-1 | - <i>Insulin Growth Factor-1</i> |
| IL | - interleucina |
| IL-1 | - interleucina 1 |

| | |
|--------------------|---|
| IL-6 | - interleucina 6 |
| KCl | - Cloreto de potássio |
| MgCl ₂ | - cloreto de magnésio |
| <i>MspI</i> | - <i>Moraxella species I</i> |
| NK-1 | - neurocinina 1 |
| NMDA | - N-metil-D-aspartato |
| OMIM | - Online Medelian Inheritance in Man |
| pb | - pares de bases |
| PCR | - <i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase |
| PGs | - prostaglandinas |
| RFLP | - <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição |
| sP | - substância P |
| Taq DNA polimerase | - enzima polimerase do DNA <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | - Tris-Borato-EDTA |
| Tris-HCl | - Tris- Ácido Clorídrico |
| WDR | - <i>wide-dynamic-range neurons</i> - neurônios de ampla faixa dinâmica |

Introdução: A serotonina é um importante neurotransmissor no sistema nervoso central. Tem sido sugerido que a disfunção serotoninérgica é responsável pela fisiopatologia da disfunção temporomandibular (DTM). Polimorfismos no gene HTR2A podem alterar o número de receptores do sistema serotoninérgico, ocasionando a dor nociceptiva e hiperalgesia na DTM.

Objetivo: Determinar a prevalência do polimorfismo 102T-C no gene HTR2A em pacientes com e sem DTM. **Casuística e Método:** Estudo em corte transversal no qual foram avaliados 100 pacientes como casos-índice e 100 indivíduos como controles, de ambos os gêneros. O DNA foi extraído dos leucócitos do sangue periférico e o local que abrange o polimorfismo foi amplificado por PCR-RFLP. **Resultados:** O gênero feminino foi significativamente maior nos casos do índice em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). O genótipo CC do polimorfismo 102T-C foi mais frequente em pacientes com DTM em comparação aos controles (OR: 2,25 IC 95%: 1,13-4,46, $p < 0,05$). **Conclusões:** O polimorfismo 102T-C no gene HTR2A está associado à DTM na população estudada.

Palavras-chave: 1. Disfunção temporomandibular; 2. Serotonina; 3. Gene HTR2A; 4. Polimorfismo.

Introduction: Serotonin is an important neurotransmitter in the central nervous system. It has been suggested that serotonergic dysfunction mediates the pathophysiology of temporomandibular dysfunction (TMD). Polymorphisms in *HTR2A* gene can alter the number of receptors in the serotonergic system, causing nociceptive pain and hyperalgesia in the TMD.

Objective: The aim of this study is to determine the prevalence of the 102T-C polymorphism of *HTR2A* in patients with and without TMD.

Casuistic and Method: This cross-sectional study examined 100 patients as index cases and 100 persons as controls, of both genders. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, and the site that encompassed the polymorphism was amplified by PCR-RFLP.

Results: There were significantly more females among index cases compared with the control group ($p < 0.05$). The CC genotype of the 102T-C polymorphism was more frequent in patients with TMD versus controls (OR: 2.25; CI 95%: 1.13-4.46; $p < 0.05$).

Conclusions: The 102T-C polymorphism of *HTR2A* gene is linked to TMD in the studied population.

Keywords: 1. Temporomandibular dysfunction; 2. Serotonin; 3. *HTR2A* gene; 4. Polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é a articulação da mandíbula com o crânio, mais especificamente com o osso temporal. Toda a articulação é envolta por uma cápsula articular fibrosa e três ligamentos a sustentam e a reforçam: o ligamento lateral, o ligamento estilomandibular e o ligamento esfenomandibular.⁽¹⁾ Os movimentos da mandíbula e da ATM, os quais incluem abaixamento e elevação, protrusão e retração e movimentos laterais da mandíbula são controlados mais pelo trabalho de músculos específicos, como o temporal, o masseter e os pterigóideos medial e lateral, do que pela forma das superfícies articulares ou dos ligamentos.⁽²⁾

Outro aspecto que merece atenção especial, por exercer enorme influência em muitas das doenças articulares, é a inervação das articulações sinoviais e, dentre essas, a ATM é a das mais intensamente inervada por fibras nervosas sensitivas e autonômicas, especialmente na cápsula articular, nos ligamentos intra-articulares e na periferia do disco articular.^(3,4)

O nervo trigêmeo fornece a inervação aferente (sensitiva), a qual é formada pelos prolongamentos centrais dos neurônios sensitivos situados no gânglio trigeminal enquanto que, os prolongamentos periféricos desses neurônios formam, distalmente ao gânglio, os três ramos trigeminiais – nervos oftálmico, maxilar e mandibular, responsáveis pela sensibilidade somática geral dessa região da face, por meio de fibras que conduzem impulsos exteroceptivos (temperatura, dor, pressão e tato) e proprioceptivos (localização espacial do corpo e da força exercida pelos músculos, sem necessitar da

visão). A raiz eferente (motora) do nervo trigêmeo é constituída por fibras que acompanham o nervo mandibular, distribuindo-se aos músculos da mastigação.⁽³⁾ Essas fibras nervosas estão acopladas a terminações nervosas livres, abundantes na ATM, e promovem o monitoramento nociceptivo (percepção de estímulo potencialmente lesivo aos tecidos) da articulação.⁽⁴⁾

A ATM também apresenta inervação autonômica, representada por grande contingente de fibras simpáticas e discreta quantidade de fibras parassimpáticas. Nas articulações sinoviais, a inervação simpática parece estar envolvida com: a) vasomotricidade influenciando, portanto, a produção do líquido sinovial; b) regulação do extravasamento plasmático na vigência de processo inflamatório agudo; c) suposto papel modulador na atividade funcional de terminações nervosas sensoriais. A inervação parassimpática parece atuar exclusivamente ao nível da vasculatura.⁽⁵⁾

A inervação sensorial da ATM, além da típica função aferente, responsável pelo monitoramento nociceptivo, apresenta também uma efetiva função eferente, uma vez que os receptores sensoriais (principalmente as terminações nervosas livres) liberam neuromediadores na matriz extracelular dos tecidos componentes da articulação, sendo que, essa liberação encontra-se bastante alterada em determinadas doenças articulares. A inervação autonômica, além de promover a liberação dos neuromediadores clássicos, como acetilcolina (parassimpático) e noradrenalina (simpático), também libera neuromediadores, principalmente neuropeptídeos, na matriz extracelular, tanto em condições fisiológicas como patológicas. Os neuromediadores liberados nos tecidos da articulação exercem inúmeras funções, especialmente a de

potencializar ou até mesmo modular o processo inflamatório local. Esses dados suportam a correlação existente entre o suprimento nervoso da ATM com a homeostase articular e a etiopatogenia de algumas doenças articulares.⁽⁵⁾

Dentre as afecções que ocasionam dor orofacial a mais prevalente é decorrente de alterações da articulação temporomandibular. A maioria dos pacientes com disfunção da ATM apresenta dor articular com a característica de ser localizada e afetar, principalmente, os músculos da mastigação.⁽⁶⁾ O espasmo desses músculos é o principal responsável pela sintomatologia dolorosa na disfunção da ATM (DTM) podendo ser desencadeado por distensão, contração ou fadiga muscular, fatores que, geralmente, são causados pela hiperatividade muscular, a qual corresponde a 80% da etiologia da DTM.⁽⁶⁾

Evidências indicam que, além de mecanismos centrais vários mediadores inflamatórios nos tecidos da articulação e craniofacial profundo têm papel crítico na indução e manutenção da dor na DTM.⁽⁶⁾ Neurotransmissores do sistema nervoso central e periférico estão associados não somente à contratilidade muscular durante a mastigação, como a outras alterações neurobiológicas. O sistema serotoninérgico está envolvido em várias funções neurofisiopatológicas, inclusive na disfunção temporomandibular.⁽⁷⁾

Vias serotoninérgicas provenientes do tronco encefálico à coluna dorsal da medula espinal são essenciais para os mecanismos do controle descendente da dor. No entanto, dependendo das condições, a serotonina pode inibir ou facilitar as respostas nociceptivas na medula espinal. Sendo assim, alterações na eficácia do controle endógeno da dor, especialmente por

alterações moleculares decorrentes do polimorfismo 102T-C no gene receptor da serotonina (*HTR2A*), têm sido implicadas na fisiopatologia da dor miofascial na DTM.⁽⁷⁻⁹⁾

1.1. Objetivos

1.1.1. Gerais

- ✓ realizar avaliações geral, otorrinolaringológica e odontológica em pacientes encaminhados ao Ambulatório de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), com e sem queixa de dor na articulação temporomandibular.
- ✓ selecionar os pacientes com diagnóstico de disfunção na articulação temporomandibular.

1.1.2. Específicos

- ✓ determinar a prevalência do polimorfismo 102T-C no gene *HTR2A*, com o teste da Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Polimerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR/RFLP*), em amostra de pacientes com e sem diagnóstico de disfunção da articulação temporomandibular.
- ✓ colaborar para o diagnóstico molecular da disfunção da articulação temporomandibular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Disfunção Temporomandibular – Definição

A disfunção temporomandibular (DTM) representa um grupo de condições dolorosas que envolvem a articulação temporomandibular e o tecido craniofacial profundo, incluindo a musculatura mastigatória. São consideradas dores do tipo somática, profunda, músculo-esquelética que se exacerbam com a função (mastigar, falar e palpação muscular ou da própria ATM). Como os sintomas dolorosos da DTM são de origem trigeminal, frequentemente geram confusão no diagnóstico, pois muitas dores faciais interagem com a sintomatologia temporomandibular.^(6,10,11)

O desequilíbrio em um ou mais componentes do sistema estomatognático pode provocar sintomas dolorosos ou inflamatórios que geram modificações funcionais refletindo nas atividades diárias do paciente. Essas desordens provocam ruídos articulares (estalidos), dor na região da ATM, desvios, dificuldade para abrir a boca, alterações postural e corporal.⁽¹²⁾ Como a DTM envolve mais sinais e sintomas relacionados à ATM e à musculatura mastigatória, dificilmente esses ocorrem isolados, ou seja, exclusivamente musculares ou articulares. Essas características são fundamentais para se obter o correto diagnóstico e posterior tratamento.⁽¹³⁾

2.1.1. Epidemiologia

A dor facial relacionada à ATM tem sido relatada em 4% a 12% da população geral com maior frequência e gravidade da DTM nas mulheres em relação aos homens. De fato, a DTM é vista como sendo até quatro vezes mais prevalente nas mulheres, pois as mesmas tendem a buscar tratamento em frequência muito maior que os homens.^(14,15) Os sinais e sintomas são mais frequentes em pacientes com idade entre 20 a 40 anos.⁽¹⁵⁾ É rara a evolução para dor grave ou crônica, acima de seis meses e, quando ocorre, está associada a distúrbios psicológicos.^(16,17)

A prevalência de DTM estimada em crianças e adolescentes varia de 6% a 68%, dependendo dos diferentes critérios de diagnóstico usados e dos diferentes exames clínicos. Na faixa etária entre 12 e 18 anos de idade, 7% foram diagnosticados com DTM, com a prevalência sendo significativamente mais alta no gênero feminino.^(15,18) Pacientes geriátricos apresentam sons articulares em 38% dos casos e dor muscular em 12%. Isso contrasta com pacientes adultos jovens, que apresentam estalidos em somente 7% dos casos, mas os sintomas como dor muscular e articular em frequências, respectivamente de 25% e 16%, muito mais altas em relação ao estalido.^(15,19)

2.1.2. Etiologia

Devido à complexidade da DTM, não existe fator etiológico único que possa ser responsabilizado por essa disfunção. A sintomatologia clínica

fornece a nítida sensação que a etiologia da DTM abrange importantes elementos funcionais, anatômicos e psicossociais, ilustrando a complexa interação entre mecanismos biológicos, condições e traços psicológicos, condições ambientais, macro e microtraumas, alterações dentais e oclusais. A patogenia, portanto, é multifatorial.^(15,20)

Na dor da musculatura mastigatória, a sobrecarga (hábitos parafuncionais, apertamento), microtrauma ou inflamação local dos músculos promovem a liberação de neurotransmissores que sensibilizam o sistema nervoso periférico e central. Em conjunto com alterações dos mecanismos reguladores da dor, tal sensibilização pode levar à dor muscular localizada ou difusa. A artralgia da ATM pode ser resultado de traumas ou de sobrecargas intrínsecas e extrínsecas da articulação (como o ranger dos dentes), podendo ultrapassar a capacidade adaptativa dos tecidos da articulação.⁽²¹⁻²³⁾

Alternativamente, essa capacidade adaptativa da ATM pode ser reduzida tanto por fatores intrínsecos como pela diminuição de aporte sanguíneo e nutrição. A produção de radicais livres, neuropeptídeos proinflamatórios e nociceptivos, enzimas, proteínas morfogenéticas ósseas e fatores de crescimento levam à inflamação, dor e mudanças teciduais progressivas. Recentemente, fatores genéticos têm sido implicados no desenvolvimento da dor na musculatura mastigatória, especialmente os relacionados a polimorfismos no gene receptor da serotonina (*HTR2A*).⁽⁷⁻⁹⁾

2.1.2.1. Fatores Genéticos na Disfunção da ATM

Para a compreensão das consequências de fatores genéticos que atuam no processo de modulação da dor há necessidade da descrição dos mecanismos fisiopatológicos da dor miofascial, do sistema de analgesia, apresentando a atuação do sistema serotoninérgico pela expressão do gene receptor da serotonina e sua implicação na DTM.

2.1.2.1.1. Mecanismos da Dor

Interações altamente complexas de vários sistemas e estruturas centrais e periféricas, da superfície da pele ao córtex cerebral, estão envolvidas no processamento da dor. Quando um estímulo potencialmente nocivo é aplicado a uma área sensível do corpo, como a pele, inicia-se uma cadeia de sinais que resulta na identificação do estímulo como doloroso, devido à existência de nervos aferentes primários específicos para a sinalização desses estímulos nocivos.^(24,25)

Os nociceptores são ativados por alguma forma de energia (mecânica, térmica ou química) e a convertem em impulsos elétricos (potencial de ação), que são conduzidos através dos axônios dos nervos até o cérebro. A resposta reflexa e o relato subjetivo da dor, associados ao estímulo nocivo resultam do processamento dos sinais na medula espinal, tronco cerebral, diencéfalo e córtex superior de numerosos nociceptores aferentes primários que foram ativados pelo estímulo. Sendo assim, o processo pelo qual ocorre a dor pode

ser por fatores periféricos (nocicepção aumentada) ou centrais (inibição da dor diminuída) ou a combinação de ambos.^(26,27)

A transmissão aferente primária é feita pelo aferente primário nociceptivo que é o neurônio periférico da transdução (potencial de ação). O corpo neuronal localiza-se no gânglio da raiz dorsal dos nervos espinais e no gânglio do nervo trigêmeo. Seu prolongamento periférico ou longo é constituído por fibras A-delta (fibras finas mielinizadas) e C (fibras finas não-mielinizadas) que se unem às demais fibras dos nervos periféricos e terminam na periferia, em forma de terminações nervosas livres, denominadas nociceptores, os quais são receptores para diversas substâncias algogênicas como histamina, serotonina, bradicinina, tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas.⁽²⁸⁾

O prolongamento curto ou central da fibra nervosa finaliza-se no terminal pré-sináptico, localizado junto ao corno posterior da medula espinal, onde faz sinapses com numerosos neurônios de conjugação ali existentes. Seu núcleo produz diversas substâncias denominadas receptores de membrana e neurotransmissores excitatórios e inibitórios, como o receptor opióide, a substância P (sP) e o glutamato que, uma vez produzidos, caminham pelo prolongamento curto ou central e são estocados no terminal pré-sináptico. O glutamato é o mais importante neurotransmissor excitatório da medula espinal.^(29,30)

Quando persistentemente estimulados, os nociceptores apresentam aumento da sensibilidade e redução do limiar de estimulação, levando ao aumento e prolongamento das respostas aos estímulos nociceptivos. Esse fenômeno constitui a sensibilização periférica aos estímulos nocivos e dá

origem à inflamação. A agressão aos tecidos rompe a membrana celular e seus fosfolipídios são lançados no meio intersticial. Os fosfolipídios sofrem a ação enzimática da fosfolipase A-2, que os transforma em ácido araquidônico iniciando-se, assim, a “cascata do ácido araquidônico”, a qual apresenta duas vias metabólicas: a da ação enzimática da lipoxigenase, que o transforma em leucotrienos e a da cicloxigenase (COX), tendo como produtos finais os tromboxanos e as prostaglandinas (PGs). As prostaglandinas reduzem o limiar de sensibilidade dos nociceptores e deflagram o fenômeno da sensibilização periférica.⁽³¹⁾

Várias outras substâncias algogênicas como o K⁺, H⁺, a bradicinina proveniente dos vasos sanguíneos, a histamina dos mastócitos e a serotonina das plaquetas, são liberadas nos tecidos inflamados, formando o “coquetel inflamatório” ou “sopa inflamatória”, que produz vasodilatação regional e os sinais clássicos da inflamação (edema, rubor, calor e dor). Desse modo, é produzido o fenômeno da hiperalgesia ou sensibilização primária, caracterizada por resposta aumentada aos estímulos nociceptivos.^(32,33)

Esses impulsos nociceptivos, chegando ao corno posterior da medula espinal, passam através de numerosas sinapses até chegarem aos neurônios multirreceptivos ou neurônios de ampla faixa dinâmica (*wide-dynamic-range neurons, WDR*). Na membrana do terminal pós-sináptico dos neurônios medulares de associação localizam-se três receptores de membrana: a neurocinina 1 (NK-1), o receptor para a sP e os receptores para o glutamato, denominados receptores α amino-5-metil-4-isoxalona propionato (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA). Os impulsos nociceptivos ao chegarem ao terminal

pré-sináptico do aferente primário promovem a despolarização da membrana, a sP cruza a fenda sináptica, alcança a membrana do terminal pós-sináptico acopla-se à NK-1, enquanto o glutamato cruzando a mesma fenda, acopla-se aos receptores NMDA, e os potenciais de ação sobem em direção ao córtex cerebral.^(34,35)

O terminal pós-sináptico contém enzimas cálcio-dependentes, isto é, são normalmente inativas porque dependem da presença do cálcio para se tornarem ativas. As principais enzimas são a óxido nítrico-sintase, as cicloxigenases e as fosfolipases. Diante de lesão tecidual, os impulsos nociceptivos repetitivos e intensos, conduzidos pelas fibras C, originam potenciais lentos e elevados no nível sináptico, os quais fazem com que os receptores NMDA percam seu bloqueio de magnésio (Mg^{++}), tornando-se, assim, permeáveis à entrada de cálcio (Ca^{++}). Alta concentração de Ca^{++} penetra através da membrana pós-sináptica e atua no sistema óxido nítrico-sintase que produz grandes quantidades de óxido nítrico. O óxido nítrico recém produzido transpõe a membrana pós-sináptica, alcança a fenda sináptica e, agindo como segundo mensageiro, atua na membrana pré-sináptica estimulando-a a liberar novas quantidades de glutamato que vão novamente fixar-se aos receptores NMDA. Origina-se, assim, um sistema de retroalimentação (*biofeedback*) que mantém em atividade as sinapses medulares, levando ao fenômeno da sensibilização central e consequente hiperalgesia.^(34,36)

Os impulsos nervosos ao chegarem ao terminal pré-sináptico do aferente primário nociceptivo, seguem três diferentes caminhos: 1. Passam do corno

posterior para o corno lateral da hemi-medula homóloga, onde fazem sinapses com os neurônios simpáticos ali existentes, descem pelas fibras simpáticas e levam impulsos para os vasos sanguíneos na região da dor produzindo, por via reflexa, vasoconstrição e hipóxia regionais; 2. Passam do corno posterior para o corno anterior da hemi-medula homóloga, onde fazem sinapses com os alfanerônios motores ali existentes, cujas fibras motoras caminham para a periferia, levando impulsos para os músculos esqueléticos da região da dor produzindo, por via reflexa, vasoconstrição e contratura desses músculos com consequente hipóxia local e liberação de novas substâncias algogênicas, eclodindo o círculo vicioso dor–espasmo–dor, fato comum nas dores crônicas; 3. Passando pelas sinapses nas lâminas medulares, chegam aos neurônios multirreceptivos ou neurônios de ampla faixa dinâmica (*WDR*) cujas fibras, ao nível da comissura branca anterior, cruzam para o quadrante anterolateral da hemi-medula oposta onde se fletem cranialmente formando as vias ascendentes nociceptivas centrais que alcançam o tálamo e, finalmente, o córtex cerebral.⁽³⁷⁾

As vias nociceptivas ascendentes são constituídas por numerosos tratos sendo que os principais são o espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, via pós-sináptica da coluna dorsal, via espinocervical, sistema trigeminal e sistema propriospinal. O mais representativo é o trato espinotalâmico, por ser constituído por grande número de fibras cujos núcleos localizam-se nas lâminas medulares. É subdividido em dois feixes, o neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico. O feixe neoespinotalâmico, filogeneticamente mais recente, é direto, devido suas fibras nervosas subirem

diretamente da medula para os núcleos do tálamo, onde fazem sinapses com neurônios de terceira ordem terminando, por fim, no córtex somatossensorial (somestésico) no giro pós-central do lobo temporal. Nesse, há o processamento da percepção, da discriminação e da decodificação temporoespacial da dor. O feixe paleoespinal também termina nos núcleos do tálamo, por meio de sinapses com neurônios de terceira ordem, mas as fibras alcançam o córtex frontal, via sistema límbico, a fim de que essa interação proporcione respostas de reação à dor originando o fenômeno fundamental e mais importante da dor: o sofrimento.⁽³⁷⁾

Nas conexões sinápticas dessas vias ocorrem alterações no mecanismo central da dor, que pode ser secundária à disfunção de neurotransmissores por duas maneiras: 1- deficiência de neurotransmissores inibitórios em níveis medulares ou supra-medulares (serotonina, encefalina, noraepinefrina), principalmente pela diminuição da serotonina (vasodilatadora) e 2- hiperatividade de neurotransmissores excitatórios (substância P, encefalina, bradicinina), especialmente pela hiperatividade da sP (vasoconstrictora). Em decorrência disso, há diminuição do fluxo sanguíneo ao tálamo, núcleo caudado e regiões pré-frontais, pois a diminuição da serotonina leva ao aumento da substância P no córtex cerebral e na medula, aumentando assim a sensação dolorosa. Esses baixos níveis serotoninérgicos estimulam a atividade da cicloxigenase-2 com aumento na produção de prostanóides e consequente aumento na síntese de interleucinas (IL) algogênicas, especialmente as IL-1 e IL-6. Além disso, há diminuição da secreção do Fator do Crescimento Semelhante à Insulina 1 (*Insulin Growth Factor* - IGF-1) ou somatomedina

(metabólito do hormônio do crescimento que regula o crescimento das células musculares) o que acarreta alterações na capacidade de reparação celular com consequente fadiga muscular e lesões tendinosas.^(33,38)

Numerosas outras fibras do feixe paleoespinotalâmico, em seu trajeto ascendente, antes de alcançar o tálamo, formam colaterais que terminam em várias sinapses localizadas principalmente em núcleos do tronco encefálico como a substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, a substância cinzenta periventricular, o núcleo magno da rafe, o *locus ceruleus* e o núcleo gigantocelular que se interconectam para formar fibras descendentes que, através do trato dorsolateral, constituem o sistema analgésico central descendente.^(39,40)

2.1.2.1.2. Sistemas de Analgesia

Os sistemas de analgesia são constituídos por dois mecanismos – o segmentar e o suprasegmentar.

O sistema segmentar ou medular (Sistema da Teoria das Comportas)⁽⁴¹⁾ é o mecanismo analgésico que fornece o fundamento anatomofisiofarmacológico para o fenômeno de modulação da dor: “Impulsos aferentes conduzidos pelas fibras grossas mielinizadas A-beta inibem, ao nível do corno posterior da medula espinal, a transmissão dos impulsos aferentes nociceptivos conduzidos pelas fibras finas A-delta e C”. Ocorre após massagem no local da lesão, pois a mesma estimula as fibras aferentes A-beta que, por sua vez, propiciam a analgesia no local dolorido.⁽⁴¹⁾

O sistema suprasegmentar é o mecanismo que ocorre pela via analgésica central descendente. O trato paleoespinotalâmico, antes de alcançar o tálamo, emite numerosas fibras colaterais que fazem conexões sinápticas ao nível bulbar e mesencefálico, os quais, por sua vez, estão intimamente interconectados entre si. Essas conexões sinápticas, estimulando a substância cinzenta periaquedutal e periventricular do mesencéfalo fazem com que haja produção de encefalinas, que agem sobre o núcleo magno da rafe e o *locus ceruleus* na ponte, produzindo serotonina e sobre o núcleo paragigantocelular no bulbo, produzindo noradrenalina.^(39,40)

As fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas transmitem os impulsos pelo sistema analgésico central descendente, representado pelo trato dorsolateral e, respectivamente, estimulam o interneurônio inibitório encefalinérgico e inibem o neurônio aferente da dor, ambos localizados no corno posterior da medula espinal, que também produz encefalinas. Essas, por sua vez, acoplam-se aos receptores opióides da membrana do terminal pré-sináptico do aferente primário nociceptivo, fazendo com que ocorra a inibição pré-sináptica, por hiperpolarização da membrana do aferente primário, ocasionando o bloqueio da liberação de sP e glutamato para a fenda sináptica com consequente diminuição da intensidade e da resposta à dor (analgesia).^(39,40)

2.1.2.1.3. Fatores Genéticos Relacionados à Serotonina na Modulação da Dor

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), neurotransmissor no sistema nervoso central, está envolvida na regulação de várias funções viscerais e fisiológicas, tais como o sono, apetite, termorregulação, percepção da dor, secreção hormonal e comportamento sexual. Anormalidades do sistema serotoninérgico têm sido implicadas em grande número de doenças humanas como depressão, cefaleia, epilepsia, comportamento obsessivo-compulsivo, distúrbios afetivos, síndrome da apneia do sono e disfunção temporomandibular.^(8,9,42)

A 5-HT é considerada como o mais importante neurotransmissor envolvido no controle do mecanismo endógeno da dor.^(43,44) Conforme descrito anteriormente, há evidências do mecanismo periférico como a causa da dor muscular crônica. A sobrecarga mecânica e consequente hipóxia muscular, além de distúrbios da microcirculação têm sido associados como causadores da mialgia crônica devido à sensibilização e ativação dos nociceptores musculares pelas substâncias algogênicas.⁽⁴⁵⁾ Essas evidências indicam que a 5-HT no tecido craniofacial profundo contribui para a indução da sensibilização periférica levando ao desenvolvimento de respostas nociceptivas hiperálgicas tendo, também, importante papel no desenvolvimento e manutenção da dor crônica orofacial na disfunção da ATM.^(8,9) Sendo assim, esse neurotransmissor está envolvido na modulação da dor nociceptiva e na hiperalgesia por ambos os mecanismos - central e periférico.^(8,46-48)

Como outros neurotransmissores, a serotonina é liberada na fenda sináptica e exerce seus efeitos em receptores específicos na membrana pós-sináptica. A 5-HT atua por meio de uma família de sete receptores, dos quais os denominados 5-HT₂ compreendem três subtipos, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, que são semelhantes em termos de estrutura molecular, farmacologia e padrões dos sinais de transdução. Embora poucas dessas respostas excitatórias tenham sido analisadas usando-se seletivos agentes dos subtipos de receptores, evidências sugerem que, em alguns desses casos, as respostas são mediadas pelos receptores 5-HT_{2A} enquanto outras envolvem os receptores 5-HT_{2C}.^(49,50) Alguns subtipos de receptores têm sido identificados no tecido nervoso periférico e central estando envolvidos na modulação da dor. Os receptores 5-HT_{2A} encontrados nos terminais pós-sinápticos são responsáveis pela hiperalgesia induzida pela serotonina e estão relacionados na potencialização da dor inflamatória nas diversas doenças relacionadas à disfunção do sistema serotoninérgico, especialmente na DTM.^(8,9)

A característica de todos os genes da família dos receptores 5-HT₂ (denominados gene *HTR2*) é a presença de dois introns (no caso dos genes *HTR2A* e *HTR2B*) ou três (gene *HTR2C*) na sequência codificante estando todos acoplados, positivamente, à fosfolipase C e mobilizam Ca²⁺ intracelular. O gene *HTR2A* está localizado no cromossomo 13 (13q14-q21) (OMIM – 182135) e a proteína codificada do receptor 5-HT_{2A} é constituída por uma sequência de aminoácidos relativamente alta (471), do mesmo modo que a sequência do receptor 5-HT_{2C} (460 aminoácidos), mas ambas as sequências menores quando comparadas à do receptor 5-HT_{2B} (481 aminoácidos).^(49,50)

Polimorfismos no gene *HTR2A* estão associados a várias doenças, inclusive à disfunção temporomandibular, por afetarem o sistema serotoninérgico. Sendo assim, alterações nos neurotransmissores serotoninérgicos podem ocasionar distúrbios no tônus muscular. A deficiência central de serotonina é importante para o desenvolvimento da mialgia crônica, o que é comprovado pelos baixos níveis séricos de triptofano e 5-HT e pelo baixo índice de transporte de triptofano pela barreira hematoencefálica encontrados em pacientes com dor crônica.^(51,52)

Recentemente, foi identificado um polimorfismo silencioso no gene *HTR2A*, o qual é definido pela substituição T->C na posição nucleotídica 102, no exon 1, em 36,5% de pacientes com disfunção temporomandibular, sendo de herança autossômica recessiva.⁽⁷⁾ A troca de um nucleotídeo pode ocasionar a codificação de um diferente aminoácido e conseqüente alteração na estrutura protéica. Entretanto, não é o que ocorre no polimorfismo 102T-C no gene *HTR2A*, onde ambas as sequências TCT (selvagem) ou TCC (mutante) codificam a serina, no códon 34. Por esse motivo, esse polimorfismo é denominado silencioso, pois não altera a sequência do aminoácido não tendo, portanto, influência na proteína dos receptores.⁽⁷⁾

Entretanto, também é considerado como polimorfismo funcional, uma vez que os alelos T ou C determinam diferente expressão gênica, ou seja, a ocorrência do alelo C, em comparação ao alelo T, determina diminuição na expressão gênica e conseqüente diminuição na quantidade de receptores 5-HT_{2A}.⁽⁵³⁾ Com a diminuição da quantidade de receptores pós-sinápticos ocorre aumento da concentração de serotonina na fenda sináptica e, portanto,

aumento da recaptção da mesma para o terminal pré-sináptico acarretando, assim, a diminuição dos níveis de serotonina pós-sináptica. Esses baixos níveis serotoninérgicos não são, então, suficientes para estimular o sistema analgésico central descendente desencadeando, portanto, a sensação dolorosa ou hiperalgesia na DTM.⁽⁷⁻⁹⁾

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (CEP- FAMERP), sob Parecer nº393/2008 (Anexo 1).

No período de Outubro de 2009 a Dezembro de 2010 foi realizado estudo em corte transversal, no qual foram avaliados indivíduos consecutivos, de ambos os gêneros, encaminhados por demanda espontânea ao Serviço de Cirurgia Craniomaxilofacial do Ambulatório de Otorrinolaringologia da FAMERP. Foram selecionados para o estudo 100 indivíduos com queixa de dor na ATM e 100 que não referiam qualquer sintomatologia na referida articulação. Após assinatura do Termo de Consentimento, todos foram submetidos à anamnese e exame físico geral, pelo médico responsável do Serviço.

A avaliação para o estudo foi feita pelo próprio pesquisador por meio de um instrumento de coleta de dados na forma de questionário (Anexo 2) e exame físico específico, o qual é baseado nos dados da Tabela de Procedimentos de Exame Físico para a DTM (Anexo 3). Ambos os métodos estão de acordo com o protocolo da Academia Americana de Dor Orofacial.⁽¹¹⁾ Os indivíduos foram então subdivididos, após o exame físico específico, em dois grupos distintos: Grupo com disfunção da ATM (Grupo DTM - Casos índice) e grupo sem disfunção da ATM (Grupo Controle).

A idade e gênero foram documentados de todos pacientes do Grupo DTM, os quais obedeceram aos seguintes critérios de inclusão concomitantes:

1) presença de dor muscular ou articular há mais de trinta dias e não superior a seis meses; 2) presença de ruído (estalido) articular; 3) movimentos assimétricos da articulação mandibular. Os pacientes com doenças somáticas, especialmente as reumatológicas, neurológicas, psiquiátricas, retardo mental, dependência de drogas e alcoolismo foram excluídos.

Os voluntários do Grupo Controle foram incluídos de acordo com os seguintes critérios, também concomitantes: 1) ausência de dor muscular ou articular; 2) ausência de ruído (estalido) articular; 3) movimentos simétricos da articulação mandibular. Do mesmo modo, a idade e gênero foram documentados de todos os indivíduos, sendo também excluídos aqueles com retardo mental, dependência de drogas, alcoolismo, doenças somáticas, reumatológicas, neurológicas, psiquiátricas.

A fim de melhor caracterização etária, os pacientes de ambos os grupos foram distribuídos na seguinte classificação: adolescência (11 a 17 anos), adulto jovem (18 a 40 anos), adulto (41 a 65 anos) e idoso (> 65 anos).⁽⁵⁴⁾

Os pacientes e controles são da mesma etnia e da mesma área geográfica - Estado de São Paulo.

3.1. Exame Físico Específico

Para o exame físico específico foram usados quatro procedimentos básicos para diagnóstico de DTM: avaliação da amplitude e simetria dos movimentos mandibulares; palpação articular e da musculatura facial para identificar a origem anatômica da dor; ausculta da articulação durante os

movimentos funcionais para determinar a presença de ruídos articulares e análise da oclusão.⁽¹¹⁾ A análise da simetria facial foi realizada para complementar os procedimentos básicos.

Durante a avaliação clínica, os indivíduos de ambos os Grupos permaneceram sentados em uma cadeira com encosto, com os pés apoiados no chão, sendo então realizados os procedimentos:

1) Medidas dos movimentos mandibulares – foram realizados com o auxílio de régua odontológica milimetrada Jon[®], da seguinte maneira:

- ✓ abertura mandibular máxima: foi considerada a distância da face incisal dos dentes incisivos superiores aos inferiores, durante a abertura bucal máxima no limite indolor, acrescida da medida do trespasse vertical;
- ✓ lateralidade: foi solicitado o deslocamento máximo da mandíbula para a direita e medida a distância horizontal entre a linha que passa entre os incisivos centrais superiores e os incisivos centrais inferiores ou entre os freios labiais. O mesmo procedimento foi utilizado para a medida de excursão lateral esquerda.

2) Palpação da Articulação Temporomandibular –

O exame da articulação temporomandibular foi sempre realizado simultaneamente (lados esquerdo e direito) nos estados de repouso e nos de movimento dos músculos mastigatórios (abertura e fechamento). Quando da realização dos movimentos mandibulares foi analisada a trajetória cônica (movimentos incoordenados ou não do cônica), presença ou não de dor e

estalidos e/ou saltos articulares, e se estes são uni ou bilaterais, além da presença de crepitação durante a avaliação dos movimentos de lateralidade.

3) Palpação da Musculatura Facial –

a) Músculo Temporal

O músculo temporal foi palpado, bilateralmente, em sua quase totalidade, desde sua origem até sua inserção ampla, em forma de leque, na fossa do osso temporal.

b) Músculo Masseter

Para palpar ambos os músculos masseter os dedos indicador e polegar, em forma de pinça, foram posicionados na bochecha na direção ântero-posterior ao nível da zona média do ventre do músculo intra e extra bucal.

4) Análise da Oclusão –

No exame da oclusão dentária foram avaliados os aspectos morfológicos da oclusão, por meio de inspeção clínica, com auxílio de espátulas e luvas descartáveis. Foi investigada a classificação de Angle⁽⁵⁵⁾ na qual se enquadram o paciente e os padrões transversais (mordida cruzada) e longitudinais (mordida aberta ou sobremordida):

- ✓ **Classe I** - (posição fisiológica) - Normocclusão – os dentes inferiores devem estar circunscritos pelos dentes superiores, em intercuspidação máxima, os incisivos superiores devem recobrir um terço dos incisivos inferiores (normocclusão).
- ✓ **Classe II** - recuo relativo da mandíbula, os molares superiores e inferiores perdem a distância normal de meio dente de defasagem.
- ✓ **Classe III** - avanço da mandíbula para frente.

5) Exame da Simetria Facial –

No exame da simetria facial foram analisados os seguintes aspectos: a posição dos olhos, das orelhas e a da superfície inferior da mandíbula; os lados faciais a fim de caracterizar se um lado é recessivo e outro mais dominante em relação às estruturas ósseas maxilares e mandibulares e musculares subjacentes; postura anteriorizada da cabeça.

3.2. Investigação Molecular

Para os procedimentos de investigação molecular, foram coletados 4,0 ml de sangue periférico, dos pacientes de ambos os Grupos, sendo armazenado em tubos Vacutainer[®] contendo o anticoagulante (EDTA), homogeneizado logo em seguida e estocado a 4°C por até 3 dias.

Para evitar viés na observação molecular e nos resultados finais, todas as amostras de DNA foram analisadas sem o conhecimento das informações obtidas de cada paciente do estudo.

3.2.1. Extração de DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue estocadas usando-se o Kit de extração *GE Illustra - Blood Genomicprep Mini Spin Kit™ (GE Healthcare UK Limited)*, de acordo com o protocolo do fabricante, e o procedimento realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em

Imunomorfologia (LAEPI) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (FAMERP).

3.2.1.1. Protocolo de Extração de DNA a Partir de Sangue Total, por Meio do Kit de Extração de DNA Genômico

1ª ETAPA - Lise das Células Sanguíneas:

- 1) Identificar microtubos de 1,5 ml.
- 2) Adicionar 20 µl de Proteinase K.
- 3) Adicionar 200 µl da amostra de sangue.
- RNA-ase opcional.
- 4) Adicionar 400 µl da *Lysis Solution* (Solução de Lise): 1ª vez.
- 5) Agitar no Vórtex por 15 segundos para misturar as soluções.
- 6) Incubar em Temperatura Ambiente por 10 minutos com agitações esporádicas no Vórtex para auxiliar a lise celular.
- 7) Visualizar coloração ao final do estágio de vermelha para marrom escura.

2ª ETAPA - Montagem e Ligação

- 1) Colocar a mini-coluna no tubo coletor para cada amostra.
- 2) Abrir a tampa da coluna e colocar cerca de 640 µl do lisado (Fase 1) no centro da mesma.
- 3) Fechar a tampa da coluna e colocar na centrífuga.

- 4) Centrifugar por 1 minuto a 14000 rpm.
- 5) Descartar o fluido do tubo coletor que passou pela coluna sem tocar na base da mesma.
- 6) Colocar a coluna de volta no tubo coletor.

3ª ETAPA - Wash 1

- 1) Adicionar 500 µl da *Lysis Solution* (Solução de Lise): 2ª vez.
- 2) Centrifugar por 1 minuto a 14000 rpm.
- 3) Descartar o fluido do tubo coletor que passou pela coluna sem tocar na base da mesma.
- 4) Colocar a coluna de volta no tubo coletor.

4ª ETAPA - Wash 2

- 1) Adicionar 500 µl da *Wash Buffer* (Tampão de Lavagem).
 - 2) Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm (Se o tempo estiver úmido - aumentar centrifugação para 5 minutos).
- Pré-aquecer o *Elution Buffer* (Tampão de Eluição) a 70°C.
- 3) Descartar o fluido do tubo coletor que passou pela coluna sem tocar na base da mesma.

5ª ETAPA - Eluição

- 1) Colocar cada coluna em microtubos de 1,5 ml, ambos corretamente identificados.

- 2) Adicionar 200 µl do *Elution Buffer* (Tampão de Eluição) já pré-aquecido a 70°C.
- 3) Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 4) Centrifugar por 1 minuto a 14000 rpm.
- 5) Descartar a coluna.
- 6) Estocar o DNA a 4°C ou -20°C.

3.2.2. Detecção do Polimorfismo 102T-C⁽⁷⁾

3.2.2.1. Amplificação do Gene *HTR2A* pelo Teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para se detectar o polimorfismo 102T-C, o fragmento do DNA genômico, que abrange a região do polimorfismo, no exon 1 do gene *HTR2A*, foi amplificado pela técnica da PCR. Para esta reação, foi utilizado um par de iniciadores ou "primers", que são oligonucleotídeos sintéticos, identificados como HTR2A (F) e HTR2A (R). A partir destes, os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) são incorporados, iniciando a amplificação do DNA, respeitando-se a complementaridade de bases (A-T/C-G) sendo obtida, por fim, a amplificação do fragmento do gene *HTR2A*. As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados e o tamanho (em pares de bases - pb) do fragmento amplificado pelo par de "primers" são descritos no Quadro 1. (Acesso OMIM - NM_000621.3).

Quadro 1. Sequência dos "primers" para PCR do gene *HTR2A*.⁽⁷⁾

| "Primer" | Sequência 5'→3' | Tamanho (pb) |
|-----------|----------------------|--------------|
| HTR2A (F) | TCTGCTACAAGTTCTGGCTT | 342 |
| HTR2A (R) | CTGCAGCTTTTTCTCTAGGG | |

F ("Forward" - direto); R ("Reverse" - inverso), pb (pares de bases)

A reação da PCR, utilizando-se os "primers" HTR2A (F) e HTR2A (R) foi processada em termociclador (*Bioer Technology*[®], Modelo TC-XPG), em reações de 25 µL de volume final, contendo:

- 1) DNA (200-300 ng),
- 2) *primers* - 10 pmoles de cada [direto (F) e inverso (R)],
- 3) Conjunto de Reagentes *FideliTaq*TM PCR MasterMix (2X) (*GE HEALTHCARE*[®]) composto por: tampão de PCR 1X [Tris-HCl - 30 mM (pH 8.4), cloreto de potássio (KCl) - 50 mM], cloreto de magnésio (MgCl₂) - 1,5 mM, dNTPs - 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato adenina, timina, citosina, guanina (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e Taq DNA polimerase - 1,25 U. Protocolo utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Descrição do Ciclo da PCR identificado como "5HTR2A-DTM": inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 4 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 35 ciclos repetidos de 60 segundos a 94°C para desnaturação, 60 segundos a 60°C para anelamento e 2 minutos a 72°C para extensão e, após os ciclos, 10 minutos a 72°C para extensão final das cadeias.

Os produtos da PCR foram adicionados ao azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, por 2

horas a 105 V. Após término da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/ml, submetido à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação, e fotodocumentado.

3.2.2.2. Análise de Restrição (Técnica da RFLP) do Fragmento Amplificado do Gene *HTR2A*

Pela PCR (Ciclo 5HTR2A-DTM) foi amplificado, como produto da reação, um fragmento de 342 pb o qual, posteriormente, foi submetido à análise de restrição (RFLP) utilizando-se 10 U da enzima *MspI* – *Moraxella species I* (New England Biolabs)[®], a 37°C, por 2h30min para detecção do polimorfismo 102T-C.

Quando o polimorfismo está presente em ambos os alelos (amostra homocigota mutante), o produto da PCR é digerido pela enzima *MspI* em fragmentos de 217 e 125 pb, devido o reconhecimento do sítio de restrição enzimático pela substituição das bases nitrogenadas T->C, na posição 102 do gene *HTR2A*. Quando o polimorfismo está presente em apenas um alelo (amostra heterocigota), o produto da PCR do alelo mutante é digerido em dois fragmentos de 217 e 125 pb e o do alelo normal não é digerido, apresentando este um fragmento de 342 pb. Na ausência do polimorfismo, em ambos os alelos (homocigoto selvagem), o produto da PCR não é digerido, apresentando apenas o fragmento de 342 pb, pois não há o reconhecimento do sítio de restrição da enzima *MspI* (Figura 1).

Os produtos da análise de restrição (RFLP) foram adicionados ao azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, por 3 horas a 105 V. Após término da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/ml, submetido à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação, e fotodocumentado.

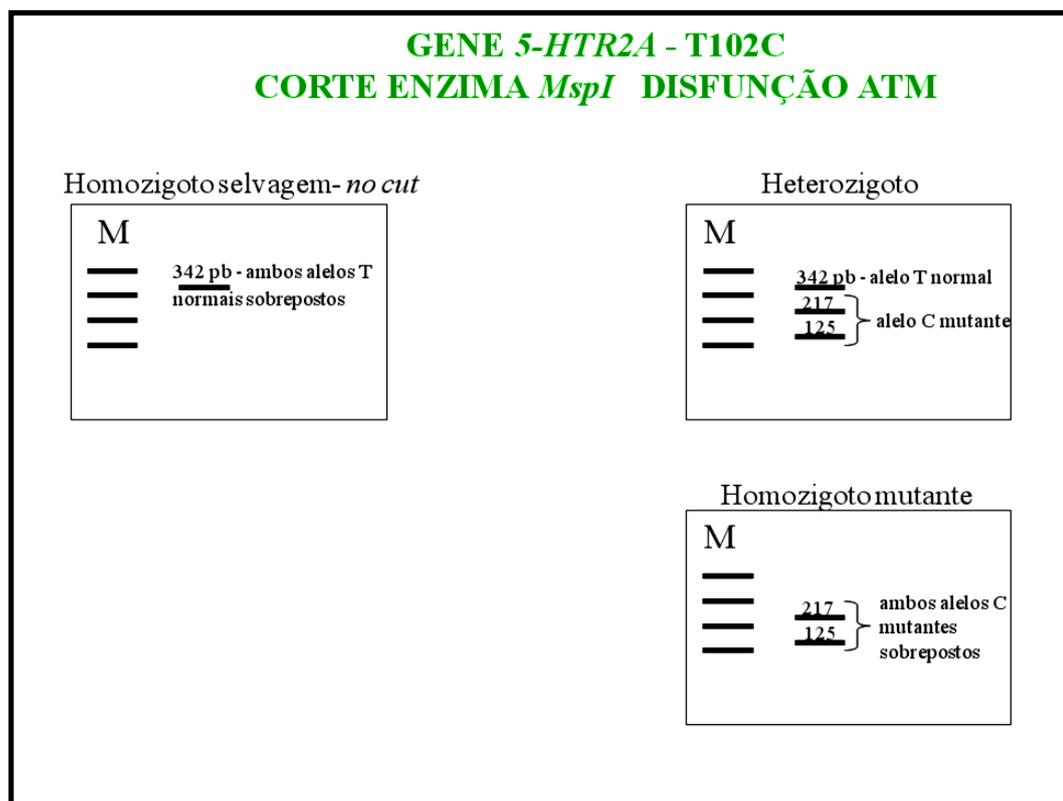


Figura 1. Esquema representando os produtos da PCR após análise de restrição pela enzima *MspI*.

3.3. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos previamente à estatística descritiva para determinação da normalidade. Foram utilizados os testes de *Mann-Whitney*

para amostras com distribuição não normal, do Qui-quadrado para comparação entre as variáveis e *odds ratio* com intervalo de confiança de 95% (IC-95%). O nível de significância foi estabelecido em 5%. Foi realizada análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para a distribuição genotípica.

Os resultados foram expressos em porcentagens (%), média (M) e desvio padrão (DP). Os testes estatísticos foram realizados usando o programa GraphPad InStat version 3.00, GraphPad Software Inc, San Diego California USA.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Do total de 100 pacientes com DTM (casos índice), 44 (44%) são do gênero masculino e 56 (56%) do gênero feminino. Em relação à faixa etária, a idade variou de 15 a 76 anos para o gênero masculino (M-37,9 anos; DP±12,8) e para o gênero feminino de 18 a 68 anos, (M-34,4 anos; DP±12,8).

Dos 100 pacientes do grupo controle, 78 (78%) são do gênero masculino e 22 (22%) são do gênero feminino. A faixa etária variou de 18 a 63 anos (M-35,4 anos; DP±11,6) para o gênero masculino e de 19 a 54 anos (M-32,5 anos; DP±11,6) para o feminino.

Considerando os dados demográficos dos 100 casos índice e dos 100 controles, houve maior prevalência do gênero feminino (56%) nos casos índice e o gênero masculino foi o predominante no grupo controle em 78% dos casos, sendo esta relação significativa ($p < 0,0001$). Ambos os grupos, casos índice e controle, tiveram maior prevalência nas classificações etárias de adulto jovem e adulto, perfazendo o total de 97% e 100%, respectivamente. Não houve pacientes adolescentes e idosos nos controles. A análise estatística para esta variável demográfica não mostrou significância entre os grupos ($p > 0,05$). Da mesma forma, os valores médios da idade entre casos índice e controles não foram significantes ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos dados demográficos dos casos índice (n=100) em relação ao grupo controle (n=100).

| Variáveis | Casos índice | Controles | p |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Gênero | n (%) | n (%) | |
| Masculino | 44 (44) | 78 (78) | <0,0001* |
| Feminino | 56 (56) | 22 (22) | |
| Classificação Etária | n (%) | n (%) | |
| Adolescente | 01 (01) | 00 (00) | 0,9080 [†] |
| Adulto jovem | 65 (65) | 69 (69) | |
| Adulto | 32 (32) | 31 (31) | |
| Idoso | 02 (02) | 00 (00) | |
| Idade | M ± DP | M ± DP | |
| Anos | 35,9 ± 12,9 | 34,7 ± 11,6 | 0,5808 [‡] |

* Teste qui-quadrado para amostras independentes: 22,8; df=1

† Teste qui-quadrado para amostras independentes: 0,55; df=3

‡ Teste de *Mann-Whitney*.

M ± DP: Média ± Desvio Padrão.

Foi possível a extração do DNA genômico, a partir de leucócitos de sangue periférico, de todas as amostras de ambos os grupos do estudo (n=200 - 100%) (Figura 2).

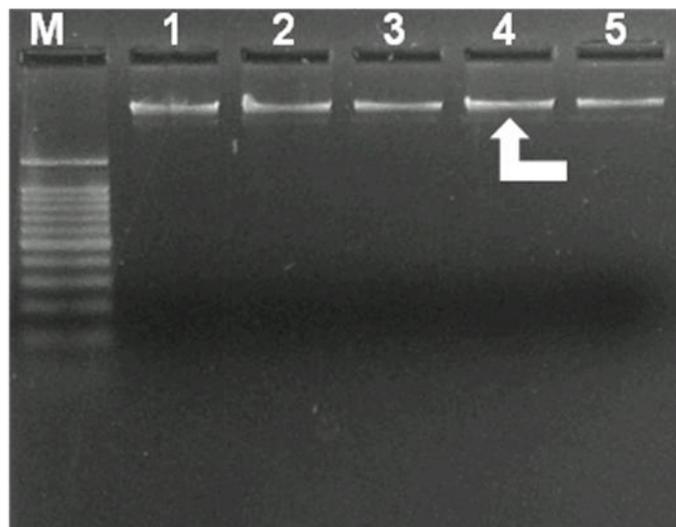


Figura 2. Fotografia do DNA genômico das amostras identificadas de 1 a 5, em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas correspondentes ao DNA de cada amostra. M- marcador 100 pb (Ladder®).

A reação da PCR permitiu a amplificação do fragmento de 342 pb do gene *HTR2A*, que abrange a região do polimorfismo, em todas as amostras analisadas (n=200 - 100%) (Figura 3).

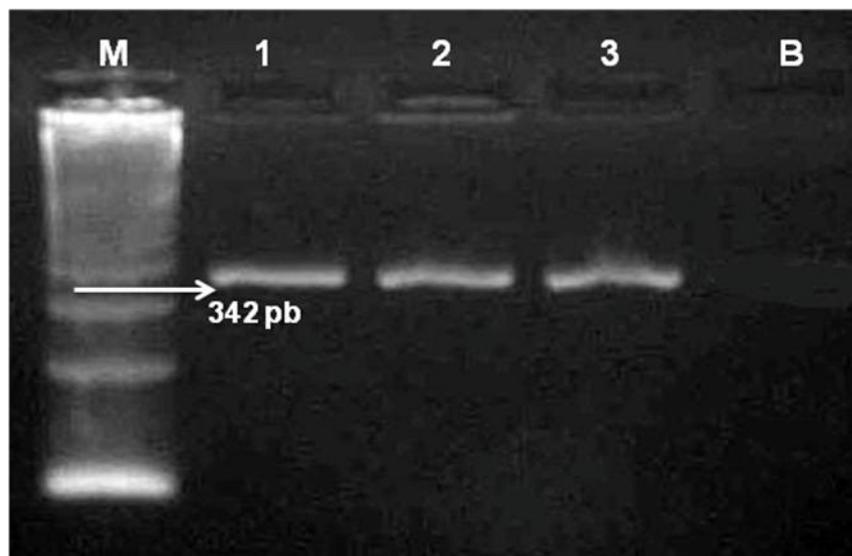


Figura 3. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 342 pb amplificado do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 3 - amostras do estudo. B - reação "Branca" (sem DNA). M- marcador 100 pb (Ladder®).

Após a digestão enzimática para identificação do polimorfismo 102T-C (Figura 4), os resultados obtidos expressam os seguintes genótipos para ambos os grupos analisados:

TT – Homozigoto selvagem

TC – Heterozigoto

CC – Homozigoto mutante

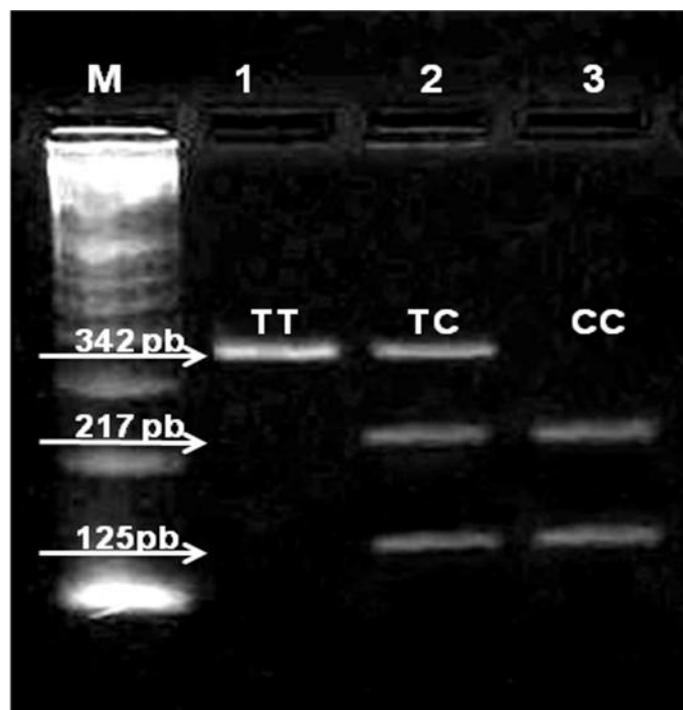


Figura 4. Fotografia do produto da RFLP (digestão enzimática) - fragmentos de 342, 217 e 125 pb do gene *HTR2A*, em gel de agarose 2%. Colunas 1 a 3 – genótipos das amostras do estudo: Coluna 1: TT (homozigoto selvagem); Coluna 2: TC (heterozigoto); Coluna 3: CC (homozigoto mutante). As setas indicam os fragmentos correspondentes às amostras nas Colunas 1 a 3. M- marcador 100 pb (Ladder[®]).

Em relação às frequências genotípicas, o genótipo TT (selvagem) foi mais frequente no grupo controle (37%) e o genótipo CC (mutante) nos casos índice (30%), sendo a diferença entre os genótipos do polimorfismo 102T-C, encontrados em ambos os grupos, considerada significativa ($p=0,015$) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos genótipos encontrados nos casos índice e controles para o polimorfismo 102T-C no gene *HTR2A*.

| Genótipo | Casos índice | Controles | p^* |
|----------|--------------|-----------|---------------|
| | n (%) | n (%) | |
| TT | 16 (16) | 37 (37) | |
| TC | 54 (54) | 47 (47) | 0,0015 |
| CC | 30 (30) | 16 (16) | |

*Teste do qui-quadrado para amostras independentes – 13,06; $df=2$

O gênero feminino foi mais frequente (44%) nos casos índice e o masculino (67%) nos controles com os genótipos TT/TC, mas em relação ao genótipo CC o gênero masculino foi o mais frequente em ambos os grupos, 18% e 11%, respectivamente, sendo esta diferença significativa ($p=0,0015$) (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição do gênero dos casos índice e controles em relação aos genótipos encontrados para o polimorfismo 102T-C no gene *HTR2A*.

| Genótipo | Casos índice | | Controles | | <i>p</i> * |
|-----------|--------------|----------|-----------|----------|---------------|
| | Masculino | Feminino | Masculino | Feminino | |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | |
| TT | 07 (07) | 09 (09) | 27 (27) | 10 (10) | |
| TC | 19 (19) | 35 (35) | 40 (40) | 07 (07) | 0,0015 |
| CC | 18 (18) | 12 (12) | 11 (11) | 05 (05) | |

*Teste do qui-quadrado para amostras independentes: 21,56; df=6

Os casos índice apresentaram ocorrência significativamente menor do genótipo TT em relação aos controles ($p=0,0014$), mas em relação ao genótipo CC, os casos índice apresentaram ocorrência maior do genótipo mutante que o grupo controle, sendo esta diferença significativa ($p=0,0289$). Não houve diferença significativa da ocorrência do genótipo TC em relação a ambos os grupos ($p>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Relação genotípica entre casos índice e controles para o polimorfismo 102T-C no gene *HTR2A*.

| Genótipo (Casos x Controles) | <i>Odds ratio</i> (OR) | IC 95% | <i>chi-square</i> | <i>p</i> |
|------------------------------------|---------------------------|-----------|-------------------|---------------|
| TT (16 x 37) | 0,32 | 0,16-0,63 | 10,27 | 0,0014 |
| TC (54 x 47) | 1,32 | 0,76-2,31 | 0,72 | 0,3961 |
| CC (30 x 16) | 2,25 | 1,13-4,46 | 4,77 | 0,0289 |

IC - intervalo de confiança de 95%

Em relação às frequências alélicas, os casos índice apresentaram menor ocorrência do alelo T (selvagem) e maior do alelo C (mutante), sendo esta diferença estatisticamente significativa em relação aos controles ($p=0,0007$) (Tabela 5).

Tabela 5. Relação alélica entre casos índice e controles para o polimorfismo 102T-C no gene *HTR2A*.

| Alelos (Casos x Controles) | Odds ratio (OR) | IC 95% | chi-square | p |
|---|----------------------------|---------------|-------------------|---------------|
| T (86 x 121) | 0,49 | 0,33-0,73 | 11,57 | 0,0007 |
| C (114 x 79) | 2,03 | 1,36-3,02 | | |

IC - intervalo de confiança de 95%

Ambos os grupos foram testados para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em relação aos cálculos obtidos, as frequências alélicas T e C para os casos índice foram T=0,43 e C=0,57 e para os controles foram T=0,60 e C=0,40. Não houve diferença significativa entre os valores genotípicos observados e esperados tanto dos casos índice ($\chi^2=1,03$; $df=1$; $p=0,31$) quanto dos controles ($\chi^2=0,03$; $df=1$; $p=0,87$) para o polimorfismo analisado. Sendo assim, a população do estudo está em equilíbrio.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A base molecular da disfunção temporomandibular (DTM) é, em grande parte, ainda desconhecida e digna de investigações científicas. Fatores genéticos, especialmente os relacionados a polimorfismos no gene receptor da serotonina (*HTR2A*) têm sido associados ao desenvolvimento da dor na musculatura mastigatória, ocasionando a dor miofascial do sistema estomatognático.^(8,9) O receptor 5-HT_{2A} é um componente essencial do sistema serotoninérgico, estando sua expressão sob controle gênico. Assim, polimorfismos nos genes que codificam o receptor podem afetar o estado funcional do mesmo e, por sua vez, a atividade serotoninérgica ocasionando distúrbios no tônus muscular.⁽⁴⁹⁾

Até o presente momento, não há dados na literatura brasileira sobre a análise molecular do gene *HTR2A* com a finalidade de verificar a prevalência do polimorfismo 102T-C em pacientes com e sem DTM, havendo somente uma referência na literatura internacional que relata a frequência deste polimorfismo e a associação com a DTM.⁽⁷⁾

Para avaliação de resultados de associação genética, é importante que os grupos de pesquisa e os controles tenham a mesma étnica (ou cor de pele) e mesma origem geográfica, pois as bases genéticas de doenças, como a configuração polimórfica, podem diferir entre várias regiões e entre populações,^(7,56-59) o que foi considerado no presente estudo, pois apesar da intensa miscigenação brasileira, foram incluídos pacientes e controles de mesma aparente origem étnica e de mesma área geográfica.

É amplamente aceito que a DTM é mais prevalente no gênero feminino e na faixa etária de 20 a 40 anos.⁽¹⁵⁾ Na população brasileira, um estudo epidemiológico também constatou alta prevalência do gênero feminino entre os pacientes estudados com DTM tendo, a maioria, entre 21 a 30 anos.⁽⁶⁰⁾ Apesar de as mulheres tenderem buscar tratamento em frequência muito maior que os homens, foram feitas tentativas para explicar essas diferenças no gênero, em termos de aspectos comportamentais, psicossociais, hormonais e constitucionais embora, até o presente momento, não se tenha obtido qualquer resultado conclusivo.^(15,17) Os resultados do presente estudo estão de acordo com os da literatura devido ao predomínio do gênero feminino no grupo com DTM, na proporção de 1,2:1; no grupo controle, predominou o gênero masculino, na proporção de 3,5:1, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Em relação à faixa etária, a idade média feminina do grupo DTM (34,4 anos) e do grupo controle (32,5 anos) foi pouco acima da descrita na literatura brasileira,⁽⁶⁰⁾ mas está dentro da faixa da literatura internacional,^(15,17) não havendo diferença significativa entre os grupos.

Em relação ao exame físico específico, este constitui um fator diagnóstico importante para a realização do diagnóstico diferencial no campo das DTM. Considerando que tais problemas fazem parte de um grupo de dores denominado de dores musculoesqueléticas, entende-se que deve ocorrer dor ou exacerbação dos sintomas quando a palpação é realizada sob pressão. Essa é uma característica típica e de extrema importância quando da realização de exames de dores faciais. Esse fato reforça a importância da necessidade de exames efetivos de palpação como meios de diagnóstico

diferencial. Apesar de a algometria gerar dados numéricos úteis como meio paramétrico e linear de se mensurar a resposta do paciente à palpação muscular, a inspeção manual continua sendo o procedimento mais amplamente utilizado pelos profissionais, em todo o mundo.⁽⁶¹⁾

A alta especificidade encontrada na palpação para os valores propostos para os diferentes músculos, praticamente garante que as respostas positivas à palpação apresentem alta confiabilidade, devido à baixa possibilidade de falso-positivos. Quando devidamente capacitados, profissionais da área odontológica são capazes de executar tais procedimentos de maneira bastante confiável.^(61,62) A anamnese ainda continua sendo o passo mais importante na formulação de uma impressão diagnóstica inicial. Mas, o exame físico específico, constituído por palpação da musculatura e da ATM, mensuração da movimentação mandibular ativa e análise de ruídos articulares, quando executado por profissionais treinados e capacitados, é um instrumento de grande validade no diagnóstico,⁽⁶²⁾ conforme realizado no presente estudo.

O seguimento rigoroso da metodologia realizada no presente estudo, objetivando o mínimo de interferências ou viés, é que permitiu a obtenção dos resultados considerados confiáveis, por terem sido realizados de acordo com os da literatura. A composição dos grupos de participantes foi determinada à partir da presença ou não de sinais e sintomas de DTM. O protocolo de identificação da DTM,⁽¹¹⁾ pelo exame físico específico utilizado neste estudo, permitiu a diferenciação dos participantes caracterizando-os em seus respectivos grupos – com DTM (casos índice) e sem DTM (controles). Assim, a caracterização de presença ou não de DTM, para a presente pesquisa, levou

em consideração os dados clínicos obtidos pelo exame físico específico e, essencialmente, a rigorosidade seguida para os critérios de inclusão e exclusão.

A dor, como queixa principal, constitui-se fundamentalmente em importante advertência do organismo modulando respostas motoras para que comportamentos e funções sejam modificados na tentativa de minimizar a sensação desagradável, e por isso é considerada como o principal critério de inclusão para grupos com DTM.⁽¹⁵⁾ No presente estudo, a presença de dor foi considerada como critério de inclusão, mas associada aos outros critérios descritos e não isoladamente. Pois, os critérios referentes à sintomatologia dolorosa são altamente subjetivos e de difícil precisão em decorrência das inúmeras variáveis interferentes tais como: tipo de acometimento, limiar individual da percepção e incômodo, atenção, atitude e aspectos emocionais associados ao problema e sua repercussão.⁽¹⁵⁾

Há pouca correlação entre a gravidade da queixa da dor relacionada à DTM e evidências de definitiva doença tecidual. Isso tem levado ao conceito que a dor em alguns pacientes com DTM pode resultar de alterações no processamento da mesma no SNC e, além disso, essa alteração no processamento pode ser atribuída à transmissão hereditária de genes específicos. Alterações psicológicas são também consideradas em contribuírem para o desenvolvimento e cronicidade da dor, quando por mais de seis meses, relacionada a DTM, particularmente na musculatura mastigatória.^(6,63) É bem conhecido que, devido à herança genética da sensibilidade nociceptiva e analgésica, fatores psicológicos podem afetar os

resultados de estudos genéticos relacionado à DTM, pois a ansiedade, o estresse e outros distúrbios emocionais podem exacerbar os sintomas da DTM, especialmente em pacientes com dor crônica.^(17,63)

No presente estudo, foram realizados questionamentos sobre o estado emocional dos pacientes e controles para evitar este inconveniente. Os indivíduos incluídos no estudo não apresentavam alterações psicológicas nem faziam uso de drogas psiquiátricas. Desse modo, foi tentado eliminar, ao máximo possível, a interferência ou efeito de fatores psicológicos no estudo. Além disso, os pacientes foram incluídos no grupo DTM pela presença de dor e mialgia localizada, além de sensibilidade à palpação muscular, persistentes há mais de trinta dias e não mais que seis meses, evitando-se assim a influência psicológica na cronicidade da dor.^(11,23)

A discordância entre os sintomas subjetivos dos pacientes e os sinais clínicos objetivos encontrados durante um determinado exame físico é interessante, sendo atribuída às diferenças individuais, ainda que a natureza dessas seja desconhecida. Um dos principais determinantes das diferenças individuais pode ser a herança genética. Com a recente identificação de polimorfismos nos genes, têm-se compreendido melhor a base das doenças e as diferenças individuais, em termos de sintomatologia e resposta ao tratamento.⁽⁶³⁾

Atualmente, os testes genéticos estão sendo realizados para investigação das mais diversas doenças, não apenas por serem considerados não invasivos, mas também pela alta sensibilidade e especificidade para estudo molecular, conforme realizado no presente estudo.

No estudo internacional de referência que relacionou o polimorfismo 102T-C no gene receptor *5-HT_{2A}* à DTM,⁽⁷⁾ foram analisados 63 pacientes e 54 controles, de ambos os gêneros, sendo encontrada a prevalência do genótipo CC (mutante) em 36,5% dos pacientes com DTM e do genótipo TT (selvagem) em 27,8% dos controles. Da mesma forma, no presente estudo foram realizadas comparações estatísticas das frequências genotípica e alélica entre os grupos de pacientes e controles. O genótipo CC (mutante) foi mais prevalente nos casos índice (30%) e o genótipo TT (selvagem) foi mais prevalente no grupo controle (37%) sendo esta diferença significativa. Consequentemente, o alelo C foi mais frequente no grupo DTM e o alelo T no grupo controle, com significância estatística.

Conforme a literatura, estes resultados podem indicar que, devido à ocorrência significativamente maior do genótipo mutante no grupo DTM assim como do alelo C, a homozigose para o alelo T pode ter um efeito protetor para a DTM enquanto que a homozigose para o alelo C pode aumentar o risco de DTM. Os genótipos variantes desse gene, por possuírem diferentes níveis de atividade, poderiam afetar ou modificar a atividade serotoninérgica, pela diminuição do número de receptores pós-sinápticos, resultando em concentração mais baixa de serotonina no espaço extracelular, ou seja, da serotonina ativa.⁽⁶⁻⁹⁾ Esses baixos níveis serotoninérgicos não são, então, suficientes para estimular o sistema analgésico central descendente desencadeando, portanto, a sensação dolorosa ou hiperalgesia na DTM. Desse modo, essas variantes genotípicas podem exercer diferentes funções moleculares na DTM ou por estarem envolvidas na sua patogênese

propriamente dita ou por determinarem predisposição genética, embora a DTM pareça não ter aspecto familiar.⁽⁶⁻⁹⁾

Apesar de o predomínio feminino no grupo DTM e masculino no grupo controle no presente estudo, a análise da distribuição do gênero em relação ao genótipo demonstrou que houve maior prevalência do gênero masculino com o genótipo CC em ambos os grupos, 17% e 11%, respectivamente, sendo esta relação significativa. No estudo de referência, apesar do predomínio masculino em ambos os grupos, não houve menção de qual gênero foi o mais prevalente para o genótipo mutante (CC),⁽⁷⁾ por isto não foi possível argumentar se estas diferenças no gênero poderiam ser a razão para os resultados encontrados em relação à distribuição genotípica.

A associação genética à DTM enfatiza a hipótese de disfunção do sistema serotoninérgico quando se considera a etiopatogenia dessa disfunção.⁽⁶⁻⁹⁾ Apesar dos resultados positivos encontrados no presente estudo os mesmos devem ser interpretados com cautela e precisam ser corroborados por estudos independentes e multicêntricos para se determinar a real prevalência do polimorfismo 102T-C no gene *HTR2A* e sua associação com a DTM na população brasileira.

A serotonina e os genes de seus receptores tem sido o foco de inúmeras pesquisas e estudos de revisão, mas somente um enfocou sua interação com a DTM.⁽⁷⁾ Maiores conhecimentos desta relação não são apenas importantes para a compreensão da fisiologia e fisiopatogenia da dor miofascial, mas também para auxiliar na descoberta das causas moleculares da DTM. O conhecimento das interações entre a biologia molecular e a DTM propicia

novas perspectivas no diagnóstico precoce e em terapias farmacológicas, além de estimular pesquisas no intuito de investigar em como o sistema serotoninérgico influencia na modulação da dor.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Polimerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism* - PCR/RFLP), com o protocolo utilizado no estudo, permitiram determinar que o polimorfismo 102T-C é responsável por cerca de 1/3 da disfunção temporomandibular na população estudada.

Os testes moleculares podem ser um valioso complemento de diagnóstico não apenas individual, mas também como método de rastreamento para estudo populacional, colaborando para a investigação molecular da DTM.

As evidências de associação entre o polimorfismo 102T-C no gene *HTR2A* e a DTM, demonstram que existem diferenças, ao nível molecular, em pacientes com e sem DTM, e a possível atuação do sistema serotoninérgico nesta disfunção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van de Graaf KM. Articulações. In: Anatomia Humana. 6ª ed. São Paulo: Manole; 2003. p. 214-5.
2. Van de Graaf KM. Articulações. In: Anatomia Humana. 6ª ed. São Paulo: Manole; 2003. p. 250-3.
3. Machado ABM. Nervos Cranianos. In: Neuroanatomia Funcional. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 98
4. Machado ABM. Terminações Nervosas. In: Neuroanatomia Funcional. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 83-8.
5. Machado ABM. Sistema Nervoso Autônomo. In: Neuroanatomia Funcional. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 105-12
6. Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain--basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. J Oral Rehabil 2010; 37(6):391-410.
7. Mutlu N, Erdal ME, Herken H, Oz G, Bayazit YA. T102C polymorphism of the -HT2A receptor gene may be associated with temporomandibular dysfunction. Oral Dis 2004;10:349-52
8. Okamoto K, Imbe H, Tashiro, Kimura A, Donishi T, Tamai Y, *et al.* The role of peripheral 5HT2A and 5HT1A receptors on ten orofacial formalin test in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. Neuroscience 2005;130:465-74.
9. Okamoto K, Imbe H, Kimura A, Donishi T, Tamai Y, Senba E. Activation of central 5HT2A receptors reduces the craniofacial nociception of rats. Neuroscience 2007;147(4):1090-102.

10. Sarlani E, Greenspan JD. Evidence for generalized hyperalgesia in temporomandibular disorders patients. *Pain* 2003;102:221-6.
11. de Leeuw R. Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis and management, 4th ed. The American Academy of Orofacial Pain. Chicago: Quintessence; 2008.
12. Pedroni CR, Oliveira AS, Guaratin MI. Prevalence study of signs and symptoms of temporomandibular disorders in university students. *J Oral Rehabil* 2003;30(3): 283-9.
13. Pallegama RW, Ranasinghe AW, Weerasinghe VS, Sitheeque MA. Influence of masticatory muscle pain on electromyographic activities of cervical muscles in patients with myogenous temporomandibular disorders. *J Oral Rehabil* 2004;31(5):423-9.
14. Karibe H, Goddard G, Gear RW. Sex differences in masticatory muscle pain after chewing. *J Dent Res* 2003;82:112-6.
15. Roda RP, Bagán JV, Fernández JMD, Bazán SH, Soriano YJ. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: Classification, epidemiology and risk factors. *Med Oral Patol Circ Bucal* 2007;12:292-8.
16. Hentschel K, Capobianco DJ, Dodick DW. Facial pain. *Neurologist* 2005;11:244-9.
17. Buescher JJ. Temporomandibular joint disorders. *Am Family Phys* 2007;76(10):1477-82.
18. Mohlin BO, Derweduwen K, Pilley R, Kingdon A, Shaw WC, Kenealy P. Malocclusion and temporomandibular disorder: a comparison of adolescents with moderate to severe dysfunction with those without signs

- and symptoms of temporomandibular disorder and their further development to 30 years of age. *Angle Orthod* 2004;74:319-27.
19. Schmitter M, Rammelsberg P, Hassel A. The prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders in very old subjects. *J Oral Rehabil* 2005;32:467-73
 20. Ferrando M, Andreu Y, Galdón MJ, Durá E, Poveda R, Bagán JV. Psychological variables and temporomandibular disorders: distress, coping, and personality. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:153-60.
 21. Cheifetz AT, Osganian SK, Allred EN, Needleman HL. Prevalence of bruxism and associated correlates in children as reported by parents. *J Dent Child* 2005;72:67-73.
 22. Glaros AG, Willims K, Lausten L. The role of parafunctions, emotions and stress in predicting facial pain. *JADA* 2005;136:451-8.
 23. Magnusson T, Egermarki I, Carlsson GE. A prospective investigation over two decades on signs and symptoms of temporomandibular disorders and associated variables. A final summary. *Acta Odontol Scand* 2005;63:99-109.
 24. Aguggia M. Neurophysiology of pain. *Neurol Sci* 2003;24(Suppl 2):S57-60.
 25. Rocha APC, Kraychete DC, Lemonica L, Carvalho LR, Barros GAM, Garcia JBS, *et al.* Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Rev Bras Anesthesiol* 2007;57(1):94-105.
 26. Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol* 2007;(177):3-28.

27. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010;120(11):3760-72.
28. Tominaga M. Nociception and TRP channels. *Handb EXP Pharmacol* 2007;179:489-505, Heppenstall PA, Lewin GR. Neurotrophins, nociceptors and pain. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2000;13:573-6.
29. Bleakman D, Alt A, Nisenbaun ES. Glutamate receptors and pain. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2006;17:592-604.
30. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review Cytology* 2004;240:281-304.
31. Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, *et al.* GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 2004;304:884-7.
32. Bouloux GF. Temporomandibular joint pain and synovial fluid analysis: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(11):2497-504.
33. Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 2010;16(11):1267-76.
34. Bennett GJ. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: Focus on the NMDA-receptor. *Journal of Pain Symptom Management* 2000;19:S2-6.
35. Wang H, Kohno T, Amaya F, Brenner GJ, Ito N, Allchorne A, *et al.* Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 2005;25:7986-92.

36. Levy D, Zochodne DW. NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Practice* 2004;4:11-8.
37. Mannion RJ, Woolf CJ. Pain mechanisms and management: a central perspective. *Clin J Pain* 2000;16:S144-56.
38. DeLeo JA, Yeziarski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 2001;90:1-6.
39. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66(6):355-474.
40. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest* 2010;120(11):3779-87.
41. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150(699):971-9.
42. Jorgensen HS. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull* 2007;54(4):266-88.
43. Ernberg M, Hedenberg-Magnusson B, Alstergren P, Kopp S. The level of serotonin in the superficial masseter muscle in relation to local pain and allodynia. *Life Sci* 1999;65:313-25.
44. Green AR. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 2006;147(Suppl 1):S145-52.
45. Oliveira MC, Pelegri-da-Silva A, Parada CA, Tambeli CH. 5-HT acts on nociceptive primary afferents through an indirect mechanism to induce hyperalgesia in the subcutaneous tissue. *Neuroscience* 2007;145(2):708-14.

46. Sommer C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Mol Neurobiol.* 2004;30(2):117-25.
47. Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(12):613-7.
48. Lopez-Garcia JA. Serotonergic modulation of spinal sensory circuits. *Curr Top Med Chem* 2006;6(18):1987-96.
49. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38:1083-152.
50. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71(4):533-54.
51. Russell IJ, Michalek JE, Vipraio GA, Fletcher EM, Javors MA, Bowden CA. Platelet 3H-imipramine uptake receptor density and serum serotonin levels in patients with fibromyalgia/fibrositis syndrome. *J Rheumatol* 1992;19:104-9.
52. Yunus MB, Dailey JW, Aldag JC, Masi AT, Jobe PC. Plasma tryptophan and other amino acids in primary fibromyalgia: a controlled study. *J Rheumatol* 1992;19:90-4.
53. Polesskaya OO, Sokolov BP. Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT_{2A} receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. *J Neurosci Res* 2002;67(6):812-22.
54. WHO. *Ageing and Health Programme Division of Health Promotion, Education and Communication.* The Hildelberg guidelines for promoting

- physical activity among older persons: guidelines series for healthy ageing
– I. Heidelberg, Germany:August, 1996.
55. Angle EH. Classification of malocclusion. *Dent Cosmos* 1899;41(3):248-64.
 56. Gürsoy S, Erdal E, Herken H, Madenci E, Alasehirli B. Association of T102C polymorphism of the 5-HT2A receptor gene with psychiatric status in fibromyalgia syndrome. *Rheumatol Int* 2001;21:58-61.
 57. Bondy B, Spaeth M, Offenbaecher M, Glatzeder K, Stratz T, Schwarz M, *et al.* The T102C polymorphism of the 5-HT2A receptor gene in fibromyalgia. *Neurobiol Dis* 1999;6:433-9.
 58. Herken H, Erdal E, Mutlu N, Barias Ö, Cataloluk O, Oz F, *et al.* Possible association of temporomandibular joint pain and dysfunction with a polymorphism in the serotonin transporter gene. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:308-13.
 59. Ojima K, Watanabe N, Narita N, Narita M. Temporomandibular disorder is associated with a serotonin transporter gene polymorphism in the Japanese population. *Biopsychosoc Med* 2007;10:1-3.
 60. Luz JG, Maragno IC, Martin MC. Characteristics of chief complaints of patients temporomandibular disorders in a Brazilian population. *J Oral Rehabil* 1997;24(3):240-3.
 61. Conti PCR, Santos CN, Lauris JRP. Interexaminer agreement for muscle palpation procedures: the efficacy of a calibration program. *Cranio* 2002; 20(4):289-94.

62. De Boever JA, Nilner M, Orthlieb JD, Steenks MH. Educational Committee of the European Academy of Craniomandibular Disorders. Recommendations by the EACD for examination, diagnosis, and management of patients with temporomandibular disorders and orofacial pain by the general dental practitioner. *J Orofac Pain* 2008;22:268–78.
63. 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;14:135-43.

8. ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (CEP- FAMERP).



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

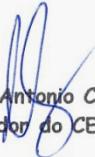
Parecer n.º 393/2008

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo nº 5575/2008 sob a responsabilidade de Luciana Venancio Secches com o título "Associação do polimorfismo T102C no gene HTR2A com disfunção temporomandibular" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 13 de outubro de 2008.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - 15090-000 - São José do Rio Preto - SP - Brasil
Tel. (17) 3201-5700 - Fax (17) 3229-1777 - www.famerp.br

Anexo 2. Modelo do QUESTIONÁRIO - Academia Americana de Dor Orofacial.¹¹

Nome:
DN:
Gênero:
Endereço:
Fone:
Data:
Identificação nº:

| Questões | Dificuldade | | Dor | |
|--|-------------|-----|-----|-----|
| | Sim | Não | Sim | Não |
| Abrir a boca | () | () | () | () |
| Bocejar | () | () | () | () |
| Mastigar | () | () | () | () |
| Falar | () | () | () | () |
| Morder | () | () | () | () |
| | Sim | Não | | |
| Deslocamento ou travamento de mandíbula | () | () | | |
| Dor mandibular | () | () | | |
| Dor ATM | () | () | | |
| Dor de ouvido | () | () | | |
| Dor na face ou bochecha | () | () | | |
| Dor nas têmporas | () | () | | |
| Estalido na ATM | () | () | | |
| Cefaleias | () | () | | |
| Uso de Prótese dentária | () | () | | |
| Trauma na cabeça/pescoço | () | () | | |
| Trauma mandibular | () | () | | |
| Ranger ou travar os dentes | () | () | | |
| Tratamento prévio | () | () | | |
| Interferência da dor no trabalho, na vida diária | () | () | | |
| Uso de medicação para dor | () | () | | |

Anexo 3. Modelo do EXAME CLÍNICO - Academia Americana de Dor Orofacial.¹¹

Nome:
 DN:
 Gênero:
 Endereço:
 Fone:
 Data Exame Físico:
 Identificação: nº

| 1. Limite dos movimentos mandibulares | Normal | Alterado | | Dor | |
|--|----------------|-----------------|-----------------|------------|------------|
| | | Moderado | Grave | Sim | Não |
| Abertura | > 40mm () | 35-40mm () | < 35mm () | () | () |
| Lateral-D | > 10mm () | 5-10mm () | <5mm () | () | () |
| Lateral-E | > 10mm () | 5-10mm () | <5mm () | () | () |
| 2. Palpação das áreas de dor | Normal | Alterado | | Dor | |
| | | | | Sim | Não |
| Pré-auricular D | () | () | () | () | () |
| Pré-auricular E | () | () | () | () | () |
| Masseter D | () | () | () | () | () |
| Masseter E | () | () | () | () | () |
| Temporal D | () | () | () | () | () |
| Temporal E | () | () | () | () | () |
| ATM D | () | () | () | () | () |
| ATM E | () | () | () | () | () |
| 3. Ausculta de sons da ATM | Ausente | | Presente | | |
| Clique (estalido) na abertura | () | () | () | () | () |
| Clique no fechamento | () | () | () | () | () |
| Clique no mov. lateral-D | () | () | () | () | () |
| Clique no mov. lateral-E | () | () | () | () | () |
| Crepitação no movimento lateral-D | () | () | () | () | () |
| Crepitação no movimento lateral-E | () | () | () | () | () |
| 4. Exame Oclusal | Ausente | | Presente | | |
| Desgaste | () | () | () | () | () |
| Dentição superior (descrever) | () | () | () | () | () |
| Dentição inferior (descrever) | () | () | () | () | () |
| Dentes anteriores em contato | () | () | () | () | () |
| Alinhamento da arcada dentária | () | () | () | () | () |
| 5. Exame Facial | Ausente | | Presente | | |
| Simetria Facial | () | () | () | () | () |
| Alinhamento Facial | () | () | () | () | () |