



CAROLINA BERALDO MELOTO

“CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ISOFORMA DA ENZIMA COMT
ASSOCIADA À DTM”

PIRACICABA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CAROLINA BERALDO MELOTO

“CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ISOFORMA DA ENZIMA COMT
ASSOCIADA À DTM”

Orientadora: Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutora em Clínica Odontológica, Área de Prótese Dental.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Carolina Beraldo Meloto e, orientada pela Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa.

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

M492c Meloto, Carolina Beraldo, 1983-
Caracterização de uma nova isoforma da enzima COMT associada à DTM / Carolina Beraldo Meloto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Célia Marisa Rizzatti Barbosa.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Transtornos da articulação temporomandibular. 2. Polimorfismo de nucleotídeo único. 3. RNA mensageiro. I. Rizzatti-Barbosa, Célia Marisa, 1957- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Characterization of a new COMT isoform associated with TMD

Palavras-chave em Inglês:

Temporomandibular joint disorders
Polymorphism single nucleotide
RNA messenger

Área de concentração: Prótese Dental

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Célia Marisa Rizzatti Barbosa [Orientador]
Cínara Maria Camparis
Priscila de Oliveira Serrano
Altair Antoninha Del Bel Cury
Sérgio Roberto Peres Line

Data da defesa: 21-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 21 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata CAROLINA BERALDO MELOTO aprovada.



Profa. Dra. CELIA MARISA RIZZATTI BARBOSA



Profa. Dra. CINARA MARIA CAMPARIS



Profa. Dra. PRISCILA DE OLIVEIRA SERRANO



Profa. Dra. ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY



Prof. Dr. SERGIO ROBERTO PERES LINE

Dedico este trabalho, em primeiro lugar, a Deus. As oportunidades de vida a mim concedidas por Ele me trouxeram até aqui e me fazem sentir privilegiada.

Este trabalho é também inteiramente dedicado aos meus pais, Alair e Rosana Meloto, pessoas especiais que Deus escolheu para me trazer à vida, e que tornaram possível a realização de todos os meus sonhos através do seu amor e apoio incondicionais.

Dedico ainda este trabalho ao meu irmão e cunhada, Raphael e Paula Meloto, pelo amor, segurança, e cumplicidade indispensáveis na conquista de mais um objetivo em minha vida.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, na pessoa do Diretor Professor Doutor Jacks Jorge Junior;

À coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, Professora Doutora Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia;

Ao coordenador dos Cursos de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, Professor Doutor Márcio de Moraes;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE);

Ao Dr. William Maixner, pelo aceite em me receber no Centro de Distúrbios Neurosensoriais (CDNS) da Faculdade de Odontologia da Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill (UNC-Chapel Hill), e pelo apoio durante todo o período em que lá estive;

À Coordenação da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio Pesquisa que viabilizou a realização de parte deste trabalho;

A todos os meus mestres, que me orientaram na formação como Cirurgiã-Dentista, e como professora e pesquisadora ao longo da Pós-Graduação;

Aos colegas e companheiros de Pós-Graduação da FOP/Unicamp, com os quais tive a oportunidade de conviver nos últimos oito anos e que tornaram a conquista deste sonho um caminho alegre e prazeroso.

Aos colegas e companheiros do CDNS da UNC-Chapel Hill, que fizeram de todo o período em que estive fora do país minha melhor experiência de vida até hoje;

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Professora Doutora Célia Marisa Rizzatti-Barbosa, pelo amor e respeito com que sempre conduziu nossos trabalhos e a nossa relação, e acima de tudo, pela confiança e incentivo inesgotáveis, que cultivaram em mim o amor pelo trabalho e pela ciência. Devo a você a profissional que hoje me tornei;

À Professora Doutora Altair Antoninha Del Bel Cury, pela transmissão de experiência, constante apoio e incentivo na realização de meus projetos, ao longo de toda a Pós-Graduação;

À Professora Doutora Luda Diatchenko, orientadora do meu estágio no exterior, pela paciência, acessibilidade, conhecimentos transmitidos, e principalmente, pela confiança em mim depositada, fazendo crescer em mim o amor pela pesquisa.

Aos Professores Doutores Sérgio Roberto Peres Line e Ana Paula de Souza Pardo, pela disponibilidade em ajudar na condução não só deste trabalho, mas como de muitos outros ao longo da minha Pós-Graduação;

Às amigas Luana Maria Martins de Aquino e Ana Paula Varella Brown, que foram indispensáveis na realização deste trabalho, pela convivência, e acima de tudo, pela amizade sincera;

Às amigas de uma vida – Maria Clara Biajoli, Ana Claudia Chaves, e Juliana Bulgarelli – por me apoiarem ao longo de mais uma experiência;

Às minhas amigas de graduação – Camila Boer, Fernanda Hass, Letícia Costa, Maria Fernanda Grando, Marina Pace, Tatiana Meulman, Tatiana Sanches, e Thais Emidio – pelo amor cultivado entre nós ao longo de doze anos e que sempre me faz sentir perto;

Aos amigos Wander José da Silva, Pedro Ricomini, e William Custodio, pela amizade de sempre e pelo compartilhamento de experiências em comum, que tornaram mais fácil e prazeroso o período de estágio no exterior;

A todos os amigos em Chapel Hill, em especial às pessoas que me fizeram sentir tão bem e feliz longe dos meus: Darcy Berger, Jay Hall, Sam Segall, Paulo Lopes, Nádía Andrade, Bomi Oladosu, e Raquel Burger-Calderon.

“Estamos na posição de uma criança entrando em uma enorme biblioteca cheia de livros em diversos idiomas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros. Ela não sabe como. Ela não entende as línguas em que estão escritos. A criança mal suspeita de uma misteriosa ordem no arranjo dos livros, mas não sabe qual é. Isso, me parece, é a atitude mesmo do ser humano mais inteligente diante de Deus. Vemos um universo maravilhosamente arranjado e obedecendo à certas leis, mas apenas vagamente compreendemos essas leis. Nossas mentes limitadas não conseguem compreender a força misteriosa que move as constelações.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Catecolamina-O-metiltransferase (COMT) é uma enzima com amplas funções biológicas, inclusive a modulação da dor, exercidas através da metabolização de substratos como a dopamina, adrenalina, e noradrenalina. Já é sabido que a atividade da COMT é geneticamente polimórfica em humanos, e se correlaciona com a percepção individual da dor e eficiência na sua remissão entre pacientes com disfunção temporomandibular (DTM) tratados com propranolol. Por isso, nosso primeiro objetivo foi investigar novos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que pudessem marcar para este benefício. De fato, encontramos um novo SNP, rs165774 (G>A), que se mostrou associado à DTM ou fenótipos intermediários em duas coortes diferentes. Este polimorfismo, por sua vez, se localiza em proximidade a um segundo SNP, rs165895 (T>C), ambos na região 3' não traduzida (3'UTR) de um mRNA alternativo da COMT ainda não caracterizado. Assim, também foram nossos objetivos (i) verificar a expressão deste transcrito em diferentes tecidos humanos e linhas de células, rastreando-o por RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*); (ii) predizer a estrutura cristalina da enzima codificada por ele, através de modelagem pelo método dinâmicas moleculares discretas; (iii) expressá-lo em um sistema celular e comparar sua expressão relativa e atividade enzimática às da isoforma convencional, determinando-as por RT-PCR e HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), respectivamente; e (iv) verificar o efeitos dos SNPs rs165774 e rs165895 sobre este transcrito, criando-se diferentes mutantes por mutação sítio-dirigida e observando seus efeitos sobre a expressão relativa e atividade enzimática. Nossos resultados mostraram que (i) o transcrito alternativo da COMT é expresso em diferentes tecidos humanos e sistemas celulares; (ii) a estrutura cristalina de sua enzima exibe uma região C-terminal única que é distinta da isoforma convencional; e que este transcrito é (iii) menos relativamente expresso e sua enzima menos ativa que o transcrito e a enzima convencionais, respectivamente, e (iv) sofre regulação em nível transcricional pelos SNPs rs165774 e rs165895. Com este estudo, pudemos concluir que o SNP rs165774 é um forte marcador genético para DTM; que juntamente com o SNP rs165895, localizam-se na região 3'UTR de uma forma alternativa de mRNA da COMT que, pela primeira vez, provou ser capaz de codificar para uma isoforma alternativa da enzima que exibe atividade enzimática;

e que esta isoforma alternativa de mRNA da COMT sofre efeitos regulatórios, em nível transcricional, causados por ambos os SNPs.

Palavras-chave: COMT, DTM, dor, polimorfismos, alternativo, transcrito, isoforma.

ABSTRACT

Catecholamine-O-methyltransferase (COMT) is an enzyme with broad biological functions, including pain modulation, exerted through metabolization of substrates such as dopamine, epinephrine, and norepinephrine. It is well known that COMT activity is genetically polymorphic in humans, and correlates to individual pain perception and efficiency in its remission among temporomandibular disorder (TMD) patients treated with propranolol. Thus, our first aim was to investigate new single nucleotide polymorphism (SNP) that might mark for this benefit. Indeed, we have found a new SNP, rs165774 (G>A), that was associated with TMD or intermediate phenotypes in two different cohorts. This polymorphism, in turn, is in close proximity to a second SNP, rs165895 (T>C), both in the 3' untranslated region (3'UTR) of an alternative COMT mRNA that has not yet been characterized. Therefore, we also aimed to (i) verify the expression of this transcript in different human tissues and cell systems, tracking it through RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*); (ii) predict the cristaline structure of the enzyme encoded by it, modeling it with discrete molecular dynamics; (iii) express it in a cell system and compare its relative expression and enzymatic activity to the conventional isoform, using RT-PCR and HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), respectively; and (iv) verify the effects of SNPs rs165774 and rs165895 on the transcript, criating different mutants by site-directed mutagenesis and observing their effects on the relative expression and enzymatic activity. Our findings show that (i) the alternative COMT transcript is expressed in different human tissues and cell systems; (ii) the cristaline structure of its enzyme exhibits a unique C-terminus that is distinct from the conventional isoform; and that this transcript is (iii) less relatively expressed and its enzyme is less active than the conventional transcript and enzyme, respectively, and (iv) is regulated, at transcriptional level, by the SNPs rs165774 e rs165895. With this study, we conclude that SNP SNPs rs165774 is a strong genetic marker for TMD; that along with SNPs rs165895, they are located in the 3'UTR of an alternative COMT mRNA which proved, for the first time, to be able of encoding an alternative isoform of the enzyme that exhibits enzymatic

activity; and that this alternative COMT mRNA is regulated, at transcriptional level, by both SNPs.

Key Words: COMT, TMD, pain, polymorphisms, alternative, transcript, isoform

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	-	3' <i>untranslated region</i> , região 3' não traduzida
APS	-	<i>Average pain sensitivity</i> , baixa sensibilidade à dor
cDNA	-	DNA complementar
COMT	-	Catecolamina-O-metiltransferase
DHBA	-	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DTM	-	Disfunção temporomandibular
HPS	-	<i>High pain sensitivity</i> , baixa sensibilidade à dor
kb	-	Quilo-base
kDa	-	Quilo-Dalton
LPS	-	<i>Low pain sensitivity</i> , baixa sensibilidade à dor
MB-COMT	-	Isoforma ligada à membrana da enzima COMT
mRNA	-	Ácido ribonucleico do tipo mensageiro
pb	-	Pares de base
PCR	-	<i>Polimerase chain reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
RNA	-	Ácido ribonucleico
RT-PCR	-	<i>Reverse transcriptase-PCR</i> , PCR por transcrição reversa
SAM	-	S-adenosil-metionina

- S-COMT - Isoforma solúvel da enzima COMT
- SNP - *Single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de nucleotídeo único
- β AR - *Beta adrenergic receptors*, receptores beta-adrenérgicos

SUMÁRIO

1 Introdução	1
2 Revisão de Literatura	5
3 Proposição	39
4 Material e Métodos	41
5 Resultados	51
6 Discussão	61
7 Conclusão	69
Referências	71
Apêndice 1	97
Apêndice 2	98
Apêndice 3	99
Apêndice 4	100
Apêndice 5	101
Apêndice 6	102

1 INTRODUÇÃO

A catecolamina-O-metiltransferase (COMT) é uma enzima que exibe grande variedade de funções biológicas, cujo papel principal é metabolizar catecóis tóxicos ou biologicamente ativos. Esta enzima transfere um grupo metil da S-adenosil-L-metionina (SAM, cofator enzimático) para um dos grupos hidroxila da estrutural catecol, reduzindo a atividade de catecolaminas e desativando neurotransmissores como a dopamina, norepinefrina e epinefrina (Axelrod e Tomchick, 1958).

A COMT tem, portanto, implicações em uma série de processos e distúrbios biológicos (Andersen e Skorpen, 2009) e há muito tempo já se suspeita da sua influência sobre a dor relacionada à DTM, uma vez que, ainda em 1976, níveis elevados de metabólitos de catecolaminas foram encontrados na urina de pacientes com condições de dor facial semelhante à disfunção temporomandibular [DTM; (Marbach e Levitt, 1976)].

O gene humano da COMT, localizado no cromossomo 22q11.21 (Grossman *et al.*, 1992), contém 6 éxons, sendo os dois primeiros não codificantes. Este gene é capaz de transcrever duas formas principais de mRNA, através do uso de dois promotores distintos, que são traduzidas para produzir as duas isoformas principais da enzima, uma solúvel (S-COMT) e uma ligada à membrana (MB-COMT) (Tenhunen *et al.*, 1994).

Em humanos, transcritos de pelo menos uma das isoformas principais já foram identificadas em todos os tecidos (Mannisto e Kaakkola, 1999). A MB-COMT é predominantemente encontrada no cérebro, localizada nos processos astrocíticos ao redor de sinapses, dendritos pós-sinápticos, e paredes capilares (Karhunen *et al.*, 1995). A S-COMT não apresenta parte do éxon 3 e a proteína é, de maneira geral, mais abundante que a MB-COMT, e é encontrada no citosol e envelope nuclear (Lotta *et al.*, 1995).

Já foi determinado que a atividade da COMT é geneticamente polimórfica em humanos. Isto ficou evidente em um estudo em família no qual lisados de eritrócitos mostraram distribuição trimodal de alta, média, e baixas atividades, o que é consistente com

um padrão de herança mendeliana entre dois alelos autossômicos codominantes (Boudilkova *et al.*, 1990).

Em 2005, Diatchenko *et al.*, mostraram a relação entre condições experimentais de dor e a identificação de três haplótipos funcionais da COMT, que foram designados de baixa (LPS), média (APS), e alta (HPS) sensibilidade à dor. Estes haplótipos funcionais se correlacionaram com o *z-score* de modelos experimentais de dor, além de confirmarem a relação entre COMT e DTM, sendo que indivíduos carregando o haplótipo LPS mostraram aproximadamente 2.5 vezes menos chances de desenvolver esta condição.

Em seguida, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que a estrutura do mRNA dos transcritos da COMT é mais ou menos estável em função destes haplótipos. Esta estabilidade – que se correlaciona com os níveis de proteína e eficácia enzimática – é menor para o transcrito do haplótipo LPS, enquanto o haplótipo HPS resulta no transcrito mais estável, esclarecendo como as condições genético-moleculares se relacionam com os fenótipos de baixa, média e alta sensibilidade a estímulos de dor (Nackley *et al.*, 2006).

Em 2007, Nackley *et al.* mostraram através de um estudo em ratos, a importância das vias β -adrenérgicas nas condições de dor associadas à atividade reduzida da COMT, e relataram que este fenótipo pode ser bloqueado pelo antagonista não seletivo de receptores β -adrenérgico, propranolol. Este achado, possivelmente explica uma das causas da dor persistente observada em pacientes com condições crônicas de dor, como a DTM (Nackley *et al.*, 2007).

Com base nestes achados, o mesmo grupo de pesquisa conduziu um estudo piloto no qual pacientes com DTM foram tratados com propranolol. Apesar de não terem sido observados efeitos sobre a sensibilidade à dor experimental, um efeito “dose-dependente” do número de alelos LPS da COMT na maioria das medidas de dor clínica e experimental, com uma melhora maior entre os indivíduos que não carregavam esse alelo, um efeito intermediário nos heterozigotos, e nenhum efeito benéfico nos homozigotos. (Tchivileva *et al.*, 2010).

Em função do claro efeito que os genótipos da COMT parecem exercer sobre as condições crônicas de dor, nosso grupo de pesquisa se interessou por investigar o efeito de outros polimorfismos neste gene, a fim de, em última instância, ampliar a busca por indivíduos que possam se beneficiar pelo tratamento com propranolol.

Nesta investigação, encontramos associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs165774 (G>A), e DTM e dor experimental. Este SNP está situado no íntron 5 do gene da COMT e quase exclusivamente no haplótipo APS, e não pudemos encontrar evidências conhecidas para uma potencial consequência funcional, uma vez que ele não afeta os limites de *splicing*, não se encontra numa sequência alvo de miRNAs, e não se mostrou em forte desequilíbrio de ligação com nenhum outro SNP funcional da COMT.

No entanto, identificamos que este SNP está localizado na região 3' não traduzida (3'UTR) de uma forma de mRNA resultante de *splicing* alternativo do gene da COMT (CR616943), que resulta na tradução de uma isoforma truncada da enzima, ainda não caracterizada.

Além disso, identificamos um segundo SNP – rs165895 (T>C) – também na região 3'UTR deste mRNA alternativo da COMT e apenas a 400 pares de base (pb) do primeiro, localizado numa sequência *Alu* de repetição. Por se tratarem de sequências de repetição de DNA, dados sobre a frequência destes alelos ainda não estão disponíveis, impossibilitando a busca por uma associação direta entre este SNP e DTM. No entanto, é sabido que estas sequências são frequentemente regulatórias, e podem, portanto, exercer efeitos funcionais.

Assim sendo, este estudo procurou caracterizar esta isoforma truncada da enzima COMT, bem como investigar os efeitos funcionais dos SNPs rs165774 (G>A) e rs165895 (T>C) localizados na sua região 3'UTR sobre a sua função, na tentativa de esclarecer a associação entre o SNP rs165774 e DTM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Genética das disfunções temporomandibulares

A pesquisa em disfunções temporomandibulares (DTM) vem recentemente experimentando mudanças significativas no que diz respeito a sua etiologia e tratamento. Após décadas de uma visão mecanicista, em que os problemas envolvendo dimensão vertical, mau posicionamento condilar, desarmonias oclusais, e desequilíbrios neuromusculares resultavam em tratamentos com base em uma variedade de terapias odontológicas invasivas e irreversíveis, incluindo abertura de mordida, ajustes oclusais, grandes terapias restauradoras, ortodontia, e até mesmo cirurgias, este ponto de vista etiológico estritamente mecânico e odontológico encontra-se amplamente desacreditado (Greene e Laskin, 2000). Uma série de estudos (McNamara *et al.*, 1995; Koh e Robinson, 2003; Okeson, 2008) têm consistentemente demonstrando que a oclusão e os tratamentos ortodônticos e ajustes oclusais não podem mais ser considerados isoladamente como causa e solução para DTM.

Hoje, a teoria mais bem aceita para a etiologia da DTM é baseada no modelo biopsicossocial (Engel, 1977; Dworkin e Massoth, 1994; Wright *et al.*, 2004). Resumidamente, entende-se como um problema *biológico* (isto é, a ativação de vias da dor, seja com ou sem uma condição patológica aparente) que pode ter antecedentes *psicológicos* bem como consequências comportamentais; esta situação ocorre em um contexto *social* que inclui relações interpessoais com amigos, familiares, e prestadores de cuidados com a saúde, o que quase sempre produz grandes experiências negativas tanto para os pacientes, como para suas famílias (Klasser e Greene, 2009).

Estas mudanças e novos conceitos não são puramente o resultado de pesquisas odontológicas, mas principalmente de múltiplas áreas de investigação, incluindo ortopedia, aspectos neurofisiológicos da dor, aspectos neuroanatômicos do processamento da dor, fisiopatologia molecular e celular dos músculos e articulações, e aspectos comportamentais da dor crônica, originando novas grandes áreas de investigação. Pouco a pouco,

pesquisadores e clínicos estão se tornando cada vez mais conscientes da influência que variações genéticas podem desempenhar na percepção da dor e desenvolvimento de DTM.

As relações entre variações genéticas e doença podem ser investigadas através de estudos de agregação familiar, nos quais doenças ocorrendo em membros familiares geneticamente relacionados são analisadas (Griffiths *et al.*, 2002). Porém, estes estudos não conseguiram identificar uma influência genética clara sobre a DTM até o momento, (Heiberg *et al.*, 1980; Raphael *et al.*, 1999; Michalowicz *et al.*, 2000), muito provavelmente graças ao seu pequeno poder estatístico mediante a doença: dada a natureza multifatorial e alta prevalência de DTM somada à exigência de tamanhos populacionais muito grandes para se detectar níveis de hereditariedade abaixo de 0,5, não é surpreendente que esses estudos não tenham conseguido identificar uma influência genética sobre essa disfunção. Ainda, a maioria das condições de dor, incluindo DTM, são mais bem classificadas como doenças multifatoriais complexas, que são induzidas e influenciadas tanto por fatores ambientais como por uma matriz complexa de vários polimorfismos genéticos. Esta matriz genética consiste de muitos polimorfismos altamente prevalentes, e não simples mutações raras, e que por isso, deixam de seguir os modos tradicionais de herança mendeliana. Portanto, é mais apropriado lançar mão de estudos epidemiológicos tradicionais para buscar associações alélicas, nos quais o risco para a doença é contrastado entre os subgrupos baseados nas variações alélicas comuns (Slade *et al.*, 2008).

Assim sendo, alguns estudos já buscaram investigar a associação de variações alélicas de diferentes genes e DTM. Esta seção da revisão descreve brevemente essas variações, como podem estar envolvidas na fisiopatologia da DTM, e como podem afetar o tratamento desta disfunção com base no que se sabe até agora.

O fato de que as mulheres constituem a maioria dos pacientes com DTM é amplamente documentado na literatura (Locker e Slade, 1988; Dworkin *et al.*, 1990; Goulet *et al.*, 1995; Kamisaka *et al.*, 2000), e levou à hipótese de uma possível ligação entre a patogênese da DTM e o eixo hormonal feminino. Especificamente, estudos têm implicado o gene do receptor alfa de estrógeno (ER α , do inglês *estrogen receptor alpha*) na

fisiopatologia desta condição (LeResche *et al.*, 1997; Suenaga *et al.*, 2001; Landi *et al.*, 2005).

Este gene está localizado no cromossomo 6 e várias variações na sua sequência de DNA já foram identificadas. Dois SNPs comuns, que são detectados como polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição por *PvuII* e *XbaI* (RFLP), já foram implicados nas disfunções dolorosas da articulação temporomandibular (Kang *et al.*, 2007; Ribeiro-Dasilva *et al.*, 2009).

Estes alelos parecem estar associados à sobre-regulação da transcrição do gene $ER\alpha$, resultando em elevada expressão do receptor. Uma vez que já foi demonstrado que as estruturas da articulação temporomandibular (ATM) compreendem um tecido-alvo do estrógeno (Abubaker *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 2003), indivíduos portadores destes alelos apresentariam aumento da resposta a este hormônio nestas estruturas, que parecem ser pró-inflamatórias (Abubaker *et al.*, 1993; Dao *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1999; Zubieta *et al.*, 2002; Puri *et al.*, 2005; Galal *et al.*, 2007; Galal *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2008).

Uma aplicação importante dos estudos genéticos sobre os polimorfismos no gene $ER\alpha$ está na possibilidade de se modular a resposta desencadeada pela ativação deste receptor usando moduladores seletivos. Em particular, o raloxifeno e o tamoxifeno, dois tipos diferentes de moduladores seletivos de ER, talvez possam ser indicados pessoalmente para o tratamento de DTM, com base no genótipo de cada paciente.

Alterações na função do receptor beta 2 adrenérgico ($ADR\beta 2$) já foram amplamente envolvidas em doenças psiquiátricas e distúrbios psicológicos, incluindo aqueles associados com condições crônicas de dor (Mann *et al.*, 1985; Magliozzi *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1999).

O $ADR\beta 2$ humano é um gene sem íntrons que abrange aproximadamente 5500 Kb no cromossomo 5q31-32 (Parola e Kobilka, 1994). Entre os SNPs do $ADR\beta 2$, oito exibem frequência elevada na população (> 20%) e formam três haplótipos principais (H1, H2 e H3): G-7127A, rs11958940, rs1432622, rs1432623 e rs2400707, localizados na região

promotora do gene; e rs1042713, rs1042714 e rs1042717, localizados na região codificadora. Os polimorfismos comuns não sinônimos *Arg16Gly* (rs1042713) e *Gln27Glu* (rs1042714), e o SNP sinônimo *Leu84Leu* (rs1042717), são bastante estudados (Belfer *et al.*, 2005).

Diatchenko *et al.* investigaram a contribuição destes SNPs para o risco de desenvolvimento de DTM. Como resultados, os autores descobriram que a incidência de DTM foi maior entre homozigotos H2/H2 e mais baixa entre heterozigotos H1/H2 e H1/H3, sugerindo que a presença de uma cópia do haplótipo H1 é protetora contra o desenvolvimento de DTM (Diatchenko *et al.*, 2006). Estes indivíduos apresentaram também índices de somatização mais altos e pressão arterial mais baixa, que são fatores que parecem contribuir para a DTM via, pelo menos em parte, a uma deficiência nos sistemas de regulação central da dor (Bruehl e Chung, 2004; Macfarlane *et al.*, 2004; Diatchenko *et al.*, 2006).

Estes resultados têm implicações potencialmente importantes para o tratamento. Uma vez que os haplótipos de risco para DTM já foram relacionados à hiperfunção do ADR β 2, uma percentagem relativamente elevada destes pacientes (60 a 70%) podem responder bem ao tratamento com um antagonista, como propranolol. Em contraste, cerca de 25 a 30% dos casos de DTM, apresentando hipofunção do ADR β 2 (H1/H1), não deverão responder ao mesmo tratamento. Na verdade, o tratamento deste grupo com o agente antagonista pode até mesmo piorar os sintomas. Assim, pode ser possível prever os resultados do tratamento com bloqueador beta adrenérgico determinando-se o perfil haplotípico de pacientes com DTM (Diatchenko *et al.*, 2006).

A DTM é freqüentemente comórbida e/ou considerada como parte de sintomas psicossomáticos, como distúrbios do sono, fadiga, dor de cabeça, e depressão, que são classificados como síndromes somáticas funcionais (FSS) (Praschak-Rieder *et al.*, 2002; Narita *et al.*, 2003). Um conjunto de evidências indica que a DTM, bem como a dor associada a outras FSS, envolvem uma disfunção nos sistemas de processamento sensorial

e da dor (Yunus, 2007), sistemas nos quais a serotonina (5-HT) é um dos principais neurotransmissores.

O gene transportador de serotonina humano (5-HTT), localizado no cromossomo 17q11.1-q12, é portanto, um candidato para o envolvimento na patogênese de doenças dolorosas, como a DTM. Ele carrega um polimorfismo de inserção/deleção de 44 bp na região promotora, apresentado-se com duas formas alélicas, as variações longa (*l*) e curta (*s*, do inglês *short*), que tem menor atividade transcricional do que o alelo *l in vitro* (Hranilovic *et al.*, 2004). Este polimorfismo também se correlaciona com diferentes taxas de absorção de serotonina em células de cultura linfoblastóides. A variação *s* parece exercer uma influência dominante, uma vez que a expressão do gene e a absorção de serotonina foram indistinguíveis entre células da cultura com uma ou duas cópias deste alelo (Greenberg *et al.*, 1999). Um SNP *-1438G/A* também é encontrado na região promotora do gene e pode afetar a sua transcrição (Collier *et al.*, 1997). Ainda, um polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* (VNTR) também é encontrado no íntron 2 do gene da 5-HTT (*5HTT*intron2VNTR). Este VNTR consiste em diferentes comprimentos de uma sequência de elementos de repetição de 20 a 23 pb de comprimento, e atua como um regulador da transcrição de uma maneira alelo-dependente (MacKenzie e Quinn, 1999).

Estes três polimorfismos no gene 5-HTT foram investigados para a sua relação com DTM em um estudo de associação. Os polimorfismos *5HTT*intron2VNTR e *-1438G/A* não mostraram associação. A análise do polimorfismo *5HTTLPR*, no entanto, revelou que a frequência do alelo *s* foi maior entre pacientes com DTM, o que é condizente com seu suposto efeito funcional de menor atividade transcricional, o que pode resultar em menores concentrações de 5-HT no espaço extracelular, ou seja, menos 5-HT ativa. Estes achados sugerem que o *5HTTLPR* deveria ser mais explorado como uma ferramenta de diagnóstico para DTM, e que a patogênese da DTM está associada à disfunção neuronal serotoninérgica (Ojima *et al.*, 2007). No entanto, é preciso cuidado na análise destes resultados, devido ao tamanho extremamente pequeno de amostra usada neste estudo, ainda que o valor de *p* tenha sido pequeno, e mais estudos são necessários para confirmar estes achados.

Em termos de tratamento, a confirmação do envolvimento do sistema serotoninérgico na fisiopatologia da DTM pode apresentar algumas aplicações clínicas promissoras. Apesar de ainda existirem poucos dados advindos de estudos com pacientes de DTM, uma série de informações e novas possibilidades de tratamento emergem de estudos feitos com pacientes de FSS e fibromialgia, e poderá, em breve, beneficiar pacientes com DTM.

Uma vez que serotonina e a noradrenalina são ambos moduladores importantes da percepção da dor, é razoável suspeitar que parte deste sintoma seja em função de anormalidades no metabolismo e transmissão destas moléculas. Neste contexto, os inibidores duplos de recaptação apareceram como potencialmente úteis no tratamento de pacientes com dor, uma vez que eles aumentam a neurotransmissão da norepinefrina e serotonina nas vias descendentes inibitórias da dor através da inibição de sua recaptação, resultando numa redução da dor (Mease, 2009).

Os estudos feitos em animais e ensaios clínicos já publicados relatam que inibidores duplos da recaptação de serotonina e noradrenalina são eficazes no tratamento de fibromialgia (Arnold *et al.*, 2004; Arnold *et al.*, 2005; Gendreau *et al.*, 2005; Clauw *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2008; Mease *et al.*, 2009). Relatam ainda, que as drogas que atuam sobre o sistema noradrenérgico (por exemplo, nisoxetina e nortriptilina), ou sobre ambos os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (por exemplo, imipramina, duloxetina, e milnaciprano) são analgésicos mais eficazes do que as que atuam apenas sobre o sistema serotoninérgico (por exemplo, fluvoxamina e fluoxetina) (Mochizucki, 2004; Jones *et al.*, 2006).

A documentação da utilização clínica de inibidores duplos da recaptação de serotonina e norepinefrina para o tratamento de DTM é limitada a um caso clínico (Toyofuku e Miyako, 2004). Embora o caso apresente uma visão favorável ao uso de minalcipran, nenhuma indicação substancial sobre a sua eficácia ainda pode ser feita. No entanto, as drogas que atuam sobre os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico

apresentam-se como medicamentos de escolha potencialmente úteis para o tratamento de pacientes com DTM.

Por fim, as variações no gene da catecolamina-O-metiltransferase (COMT) também exercem efeito sobre a percepção da dor, e já foram associadas a DTM. As seções seguintes desta revisão de literatura se dedicarão exclusivamente a este gene, e abordarão estes aspectos em detalhes.

2.2 Catecolamina-O-metiltransferase (COMT): uma visão geral

Em 1957, Axelrod demonstrou a *in vitro* e *in vivo* a existência de uma enzima capaz de realizar a O-metilação de catecolaminas em mamíferos e deu início a uma série de trabalhos investigando esta nova enzima, a catecolamina-O-metiltransferase (EC 2.1.1.6) (Axelrod, 1957).

No ano seguinte, seu grupo descreveu pela primeira vez algumas propriedades desta enzima que é capaz de transferir o grupo metil do cofator enzimático SAM para o grupo hidroxila na posição 3 da epinefrina e de outros catecóis. Verificaram que ela era capaz de O-metilar todos os substratos examinados contendo um núcleo de catecol, incluindo os seguintes compostos fisiológicos: noradrenalina, dopamina, 3,4-dihidroxifenilalanina, 3,4-dihidroximandélico, bem como muitos catecóis sintéticos. Verificaram, também, que todos os órgãos examinados (fígado, pulmão, rins, baço, intestino delgado, cérebro, coração, glândula salivar, hipófise, pâncreas, aorta, e veia cava inferior), exceto o músculo esquelético, são capazes de O-metilar as catecolaminas. Ainda, a COMT foi encontrada em todas as espécies de mamíferos estudadas, incluindo o homem, macaco, vaca, porco, rato, camundongo, porquinho da índia, gato, e coelho. (Axelrod *et al.*, 1958).

Ainda em 1958, demonstram que a O-metilação de catecolaminas pela COMT é a via principal de metabolismo da epinefrina e norepinefrina, e dá origem a metabólitos derivados contendo um grupo éter-metil na hidroxila fenólica na posição meta em relação à

cadeia lateral do substrato, os quais são chamados de metanefrina e normetanefrina, respectivamente. A extensão da conversão em seus metabólitos fisiologicamente inativos indicava ser a COMT a principal enzima envolvida na metabolização destas catecolaminas em humanos (Axelrod e Tomchick, 1958).

A partir de então, inúmeros estudos foram conduzidos na área básica visando caracterizar esta enzima, e já indicavam que a hereditariedade desempenha um papel importante na determinação da atividade da COMT.

Em 1977, Weinshilboum & Raymond investigaram a atividade da COMT no sangue em uma população selecionada aleatoriamente, e em 201 familiares de primeiro grau. A distribuição da atividade da COMT na população selecionada aleatoriamente foi aparentemente bimodal, mostrando que 23% tinha baixa atividade da COMT. Os resultados das análises da atividade da enzima sangue de parentes de primeiro grau foram segregados e mostram-se compatíveis com um padrão de herança autossômica recessiva, mostrando também uma aparente distribuição bimodal (Weinshilboum e Raymond, 1977).

Com base nesses achados de que a atividade da COMT é herdada de forma autossômica recessiva, o mesmo grupo de pesquisa publicou na *Science*, em 1979, dados que mostravam que a meia-vida média da COMT em lisados de eritrócitos de indivíduos com baixa atividade enzimática foi significativamente inferior do que a de indivíduos com elevada atividade enzimática. Levantando, pela primeira vez, a hipótese de que a estrutura genética do *locus* da COMT poderia afetar a atividade da enzima (Scanlon *et al.*, 1979).

Os primeiros estudos também já indicavam a existência de pelo menos duas isoformas principais: uma solúvel (S-COMT) e uma ligada à membrana (MB-COMT). No entanto, por um longo período não ficou claro se as duas enzimas representavam, na verdade, espécies distintas de proteínas com diferentes sítios intracelulares ou se a MB-COMT era o resultados da ligação não específica da S-COMT à membrana celular.

Apenas em 1980, Roth investigou a capacidade de metilação das duas formas desta enzima utilizando norepinefrina e dopamina como substratos, e verificou que, no

cérebro humano, a maior parte de sua atividade enzimática é resultado da ação da MB-COMT. Estes foram os primeiros resultados que indicavam fortemente que era pouco provável que a atividade enzimática da MB-COMT fosse o resultado de um artefato de ligação da S-COMT à membrana celular (Roth, 1980).

Em 1988, as atividades da MB-COMT e S-COMT em diferentes regiões do intestino delgado humano e de rato foram determinadas. A S-COMT foi a forma predominante tanto na camada mucosa como na muscular, sendo duas vezes mais elevada na primeira do que na segunda. A atividade de MB-COMT foi praticamente igual nas diferentes regiões do intestino, bem como nas camadas mucosa e muscular. No entanto, a proporção da forma solúvel para a forma ligada à membrana foi de cerca de um nas camadas musculares do jejuno e íleo humanos (Nissinen *et al.*, 1988).

Muitos estudos na área básica almejando caracterizar as duas isoformas desta enzima continuaram sendo conduzidos, mas o grande interesse pela COMT foi reaceso no início da década de 1990, quando as estruturas das duas principais isoformas e o gene desta enzima foram caracterizados e cDNAs da COMT foram clonados em ratos, porcos, e humanos.

Em 1990, a sequência codificadora da COMT foi determinada a partir de cDNA de rato, e bibliotecas genômicas foram rastreadas com sondas de DNA e anticorpos específicos. A fase de leitura aberta consistiu de 663 nucleótidos que codificaram para um polipeptídeo de 221 aminoácidos com peso molecular estimado em torno de 25 kDa. Nenhuma sequência clara de sinal hidrofóbico, domínios de ligação à membrana, ou potenciais sítios de N-glicosilação foram encontrados nesta sequência. A identidade do clone e a precisão da sequência foram verificados por sequenciamento direto dos peptídeos tríplices derivados da purificação da enzima de fígado de rato. O ponto de início da transcrição do mRNA foi identificado 450 pb acima do códon de início da tradução, e um putativo sinal de poliadenilação (ATTAAG) foi encontrado na região 3'UTR. O tamanho previsto do produto da transcrição foi de 1,8-2,0 kb, o que pôde ser confirmado por *Northern blot*. Um polipeptídeo de 25 kDa também pôde ser imunoprecipitado com

anticorpo anti-COMT a partir da tradução *in vitro* de mRNA de fígado de rato. Por fim, utilizando *DNA blotting* os autores encontraram apenas um gene de codificação da COMT no genoma de rato (Salminen *et al.*, 1990).

No ano seguinte, Bertocci *et al.* produziram anticorpos monoclonais contra a S-COMT utilizando uma preparação purificada da enzima de fígado de porco como antígeno. Os anticorpos monoclonais selecionados puderam reconhecer a enzima de três diferentes métodos. Neste estudo, além de sequenciarem parte dos fragmentos polipeptídicos através do método de degradação de Edman, os autores puderam identificar as isoformas solúvel e ligada à membrana da enzima (Bertocci *et al.*, 1991).

Ainda em 1991, clones de cDNA da COMT foram isolados a partir de uma biblioteca de cDNA de placenta humana utilizando oligonucleotídeos sintéticos como sondas. Os quatro clones isolados continham uma fase de leitura aberta que potencialmente codificava para um polipeptídeo de 24,4 kDa, e presumivelmente, correspondiam à forma citoplasmática da COMT. Além das sequências de S-COMT, dois dos clones carregavam extensões na extremidade 5' que codificavam para uma extensão de 50 aminoácidos além da fase de leitura aberta da S-COMT. Esta sequência continha aminoácidos hidrofóbicos na sua região amino-terminal. O polipeptídeo deduzido da COMT humana apresentou 80% de similaridade com a COMT previamente caracterizada em ratos. A expressão de um dos clones em células humanas K-562 resultou em um aumento de 3 a 10 vezes na atividade da enzima. Tradução livre de células de transcritos sintetizados *in vitro* a partir de um dos cDNAs mais curtos produziu um produto de 26 kDa, de tamanho semelhante a S-COMT. A tradução de transcritos a partir de um dos cDNAs mais longos deu origem a polipeptídeos de 30 e 26 kDa, sugerindo que a iniciação da tradução se dá a partir de dois diferentes códons. A proteína de 30 kDa, mas não a de 25, associou-se às membranas celulares nos lisados de tradução. Um putativo sinal de poliadenilação (AATTAA) foi detectado nas extremidades 3' dos dois clones, 265 nucleotídeos além do códon de terminação de tradução. O RNA *blotting* revelou um transcrito COMT-específico de 1,5 kb de comprimento. As análises do DNA sugeriram que as células humanas, bem como as

caninas, as de ratos, e as de macacos, contêm apenas um gene para a COMT (Lunstrom *et al.*, 1991).

A partir deste ponto, a aplicação das técnicas de hidridização *in situ* e de célula híbrida, o gene da COMT humana pode ser localizado. Em 1992, Grossman *et al.* utilizaram primers gerados a partir da sequência conhecida de cDNA de rato, e realizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR) para produzir fragmentos de DNA correspondentes à sequência completa de codificação do gene de rato. Com este fragmento como sonda, hibridizaram o DNA a partir de dois painéis constituídos de células somáticas híbridas de humanos/roedores e humanos/hamster contendo várias translocações e deleções para refinar a localização cromossômica do gene da COMT humana. A análise por *Southern blot* mostrou que este gene está localizado no cromossomo 22q11.1-q11.2, uma região de DNA para a qual várias sequências anônimas de DNA, mas até então nenhuma proteína estrutural, havia sido atribuída (Grossman *et al.*, 1992).

Em 1993, Tenhunen *et al.* puderam descrever a estrutura do gene COMT de ratos e a sua sequência flanqueadoras 5'. Descreveram que o gene abrange pelo menos 13 kb e é composto de cinco éxons, o primeiro não codificador. Os dois códons ATG de iniciação da tradução – da MB- e S-COMT – encontram-se no segundo éxon. O gene expressa duas espécies de mRNA – de 1,6 e 1,9 kb – que têm diferente distribuição nos tecidos. A expressão dos transcritos é regulada por pelo menos dois promotores, P1 e P2. O promotor P1 expressa o transcrito menor de um modo tecido-específico e está localizado entre os códons ATG na região codificadora do transcrito mais longo. O promotor P2 é constitutivo e responsável pela expressão do transcrito mais longo. O mRNA mais curto produz apenas o polipeptídeo S-COMT, enquanto o mais longo é capaz de sintetizar ambas as isoformas da enzima (Tenhunen e Ulmanen, 1993).

Ainda no mesmo ano, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que o promotor P2 controla a expressão de transcritos alternativos de 1,9 kb que diferem por uma região de 27 nucleótidos imediatamente acima do códon MB-AUG. A presença desta sequência altera o nucleótido na posição -3 de G para C, mudando desse modo o contexto

de iniciação da tradução deste códon. Experimentos de expressão em células COS-7, utilizando os cDNAs de comprimento total da COMT, mostraram que esta alteração afeta a iniciação da tradução do MB-AUG e conseqüentemente altera as quantidades relativas de polipeptídeos MB- e S-COMT produzidos. Nenhuma clivagem proteolítica da forma de MB-COMT para S-COMT foi detectada *in vitro* ou *in vivo*. Os autores concluíram que os mRNAs de 1,9 Kb são bifuncionais e capazes de produzir tanto o polipeptídeo MB-COMT como o S-COMT, através de um mecanismo chamado de *leaky scanning* de iniciação da tradução (Tenhunen *et al.*, 1993).

A seguir, Tenhunen *et al.* isolaram fragmentos de DNA genômico humano contendo a seqüência do gene da COMT e analisaram a estrutura éxon-íntron por sequenciamento, PCR e comparação com as seqüências de cDNA humano da COMT. Verificaram que o gene contém seis exons, sendo os éxons 1 e 2 não-codificantes. Os códons de iniciação da tradução da MB-COMT e S-COMT estão localizados no éxon 3. Dois transcritos COMT-específicos distintos, de 1,3 e 1,5 kb, foram detectados em vários tecidos humanos e linhas celulares. Diferentes quantidades do RNAm mais curto da COMT nos tecidos estudados sugerem uma regulação tecido-específica, em nível transcricional. O mapeamento das extremidades 5' dos mRNAs da COMT mostrou que a transcrição se inicia em duas regiões de DNA separadas, as quais são precedidas por seqüências de promotores funcional. O promotor proximal (P1), que se localiza entre os dois códons de iniciação da tradução e se estende por aproximadamente 200 bp acima do códon de iniciação MB-AUG, dá origem ao mRNA de 1,3 kb da S-COMT. O promotor distal (P2) está localizado em um fragmento de DNA à frente e parcialmente sobreposto à região de início da transcrição do transcrito de 1,5 Kb, sugerindo que este promotor controla a expressão do mRNA da MB-COMT (Tenhunen *et al.*, 1994).

A distribuição da COMT em vários tecidos de ratos também foi investigada ainda no mesmo ano. A coloração por imunohistoquímica indicou a presença da COMT na maioria dos tecidos. A coloração foi mais intensa no fígado e no rim, mas o trato gastrointestinal, células epiteliais do estômago, o duodeno, e o íleo também foram imunorreativos para COMT. No pâncreas, a imunoreactividade foi encontrada nas células

p produtoras de insulina e células D produtoras de somatostatina, mas não nas células a produtoras de glucagon nas ilhotas de Langerhans. Na glândula pituitária, imunorreatividade foi encontrada em células de fenda, em pituitócitos dos lobos posterior e anterior, e em parte, nas mesmas células contendo hormônio luteinizante. Em outros órgãos endócrinos, imunorreatividade foi encontrada em células epiteliais da glândula tireóide e na zona glomerulosa do córtex da adrenal. No cérebro, a imunofluorescência foi mais brilhante em células ependimais dos ventrículos cerebrais e do plexo coróide. Os autores concluíram que a ampla distribuição da COMT em diversos tecidos sugere um papel importante para esta proteína na inativação de compostos contendo catecol (Karhunen *et al.*, 1994).

Ainda 1994, um grande interesse pela COMT graças a sua promissora possibilidade de efeito no tratamento da doença de Parkinson em combinação com a levodopa, Vidgren *et al.* publicaram na *Nature* o primeiro estudo predizendo a estrutura cristalina da COMT em uma resolução de 2.0Å. A enzima tem um único domínio de estrutura α/β dobrada, no qual oito α -hélices estão dispostas em torno do eixo β central. O sítio ativo da COMT consiste no domínio de ligação ao co-fator SAM e no sítio catalítico em si. O *motif* de ligação do sítio do SAM tem característica comum a muitas proteínas que se ligam a nucleotídeos. O sítio catalítico é formado por poucos aminoácidos que são importantes para a ligação do substrato, água, Mg^{2+} , e para a catálise da O-metilação. Próximo a um dos grupos hidroxila do substrato, há um resíduo de lisina que aceita o próton da hidroxila, permitindo a transferência do grupo metil do SAM para a hidroxila. Além disso, os resíduos 'gatekeepers' *Trp38*, *Trp143*, e *Pro174*, que formam a "parede" hidrofóbica e definem a seletividade da COMT para com as diferentes cadeias laterais do substrato, participam diretamente da reação de metilação, mantendo o anel de catecol em posição correta (Vidgren *et al.*, 1994).

Em 1995, Lotta *et al.* caracterizaram cineticamente as isoformas da COMT expressando-as em *Escherichia coli* e em células de inseto infectadas com bacilovírus. O uso de inibidores fortes de ligação, como a entacapona, permitiu a estimatção das concentrações reais das enzimas e, desse modo, a comparação dos parâmetros de velocidade, seletividade do substrato, e regiosseletividade de metilação em ambas as

formas da enzima. A cinética da reação de metilação da dopamina, (-)-noradrenalina, L-dopa, e do ácido 3,4-dihidroxibenzóico (DHBA), foi estudada em detalhe. O número catalítico (V_{max}) da S-COMT foi um pouco mais elevado do que o da MB-COMT para todos os substratos. Os valores de K_m (constante de Michaelis) variaram consideravelmente, dependendo tanto do substrato, como forma da enzima. A S-COMT mostrou valores de K_m cerca de 15 vezes maiores para as catecolaminas do que a MB-COMT. A principal diferença entre as isoformas da enzima esteve na mais elevada afinidade da MB-COMT para o co-fator SAM. As médias das constantes de dissociação K_s foram de 3,4 e 20,2 μ M para MB-COMT e S-COMT, respectivamente. Com base nos dados publicados por Vidgren *et al.* em 1994, os autores também modelaram as estruturas cristalinicas dos substratos e sugeriram que o comportamento cinético dos diferentes substratos pode ser explicado em função da interação entre as estruturas da cadeia lateral dos substratos e os resíduos da enzima (Lotta *et al.*, 1995).

Também em 1995, visando esclarecer a localização da COMT no cérebro, Karhunen *et al.* investigaram sua ocorrência no córtex cerebral, córtex cerebelar, e corpo estriado de ratos foi estudada por imunomicroscopia utilizando anticorpo COMT-específico. Em todas as áreas, a imunoreactividade foi observada em astrócitos e processos neuronais. O produto da reação foi visto no citoplasma e em associação com as estruturas tubulares dos processos dendríticos. Imunoreatividade também foi vista pós-sinápticamente nas espinhas dendríticas e associada à membrana pós-sináptica. Imunoreacção forte também foi observada no citoplasma das células ependimais que revestem os ventrículos, e nos tanicitos na eminência mediana. Os resultados sugerem que as espinhas dendríticas pós-sinápticos e processos astrocíticos são os locais de inativação das catecolaminas pela COMT (Karhunen *et al.*, 1995).

Ainda em 1995, o mesmo grupo de pesquisadores buscaram refinar a localização da COMT no cérebro utilizando culturas primárias em que os tipos de células pudessem ser facilmente distinguidos com marcadores específicos. A imunoreactividade da COMT foi estudada em culturas astrocíticas primárias do córtex cerebral de ratos recém-nascidos, e em culturas de neurônios do cérebro de ratos com 18 dias de idade de ratos,

usando anticorpos contra a COMT. Foram realizados estudos de coloração dupla com marcadores específicos células sea distinguir astrócitos, oligodendrócitos e neurónios. Imunorreatividade para COMT colocou-se com o marcador específico de oligodendrócitos em células exibindo a morfologia oligodendrócitos, células planas exibindo morfologia tipo 1 de astrócitos e proteína glial fibrilar ácida, em ramificações de células exibindo morfologia de astrócitos tipo 2, e nos corpos celulares de neurónios, cujos processos apresentaram imunorreatividade nos neurofilamentos. *Western blots* detectaram ambas as proteínas solúvel de 24 kDa e ligada à membrana de 28 kDa em culturas neuronais e de astrócitos (Karhunen *et al.*, 1995)

Em 1997, Reenila *et al.* analisaram bioquimicamente as atividades da COMT, da monoamina oxidase B (MAO-B; uma enzima astrogial), da fosfodiesterase alcalina I (PDE; um marcador de microglia/macrófagos) e da tirosina-hidroxilase (TH; marcador neuronal catecolaminérgico), 1 a 3 dias após a infusão de fluorocitrato, um composto prejudicial aos astrócitos. Astrócitos, microglia, e neurónios foram corados imunohistoquimicamente com anticorpos específicos (contra proteína glial fibrilar ácida, OX-42 e TH, respectivamente) e com anticorpo contra COMT. Três dias após a infusão de fluorocitrato, a atividade da MAO-B foi reduzida, enquanto as atividades da COMT e PDE foram aumentadas. A elevação na imunorreatividade da COMT co-localizou-se com células da microglia, mas não com astrócitos. Este foi o primeiro estudo relatando que as células da microglia exibem atividade da COMT (Reenila *et al.*, 1997).

Restava ainda esclarecer também a localização intracelular das isoformas solúvel e ligada à membrana da COMT. Em 1997, Ulmanen *et al.* estudaram a expressão das proteínas recombinantes da COMT, quer separadamente ou em conjunto, em linhas celulares de mamíferos (HeLa e COS-7) e em neurónios primários de ratos. A distribuição das isoformas da enzima foi visualizada por imunocitoquímica. Para comparação, a localização da COMT nativa foi estudada em células C6 de glioma de rato, por microscopia imunoeletrônica. A coloração das células expressando MB-COMT com um anticorpo específico para COMT revelaram imunofluorescência nas estruturas reticulares intracelulares e na membrana nuclear. Dupla coloração das células com anticorpos contra

as proteínas específicas do retículo endoplasmático rugoso indicaram que a colocação da MB-COMT, sugerindo que esta isoforma reside no retículo endoplasmático. Notavelmente, nenhuma fluorescência foi detectada nas membranas plasmáticas. A fluorescência no retículo endoplasmático também foi evidente nas células que expressavam ambas as formas recombinantes da COMT. Reação com a COMT intracelular nativa foi detectada e um intenso sinal citoplasmático foi observado nos neurónios primários infectados com o vírus recombinante Semliki Forest. As células expressando S-COMT revelaram coloração nuclear intensa e imunorreatividade citoplasmática difusa, sugerindo que parte da S-COMT é transportada para os núcleos. *Western blotting* de fígado e cérebro de rato revelaram S-COMT nos núcleos. Ensaios de atividade enzimática a partir das frações hepáticas citoplasmática e nuclear sugeriram que cerca de 5% da S-COMT reside nos núcleos. A localização intracelular de ambas as formas da COMT indica que a COMT age no citoplasma e no compartimento nuclear, e que os substratos fisiológicos de enzimas COMT precisam ser internalizados antes de serem metilados pela COMT (Ulmanen *et al.*, 1997).

Na maioria dos tecidos humanos, ambas as formas de mRNA da COMT podem ser encontradas e a expressão da S-COMT prevalece sobre a MB-COMT. No cérebro humano, porém, a expressão do transcrito de 1,5 Kb parecia ser, até recentemente, exclusiva.

Em 1998, usando duas sondas marcadas alfa-32P, Hong *et al.* encontraram apenas o transcrito de 1,5 kb em todas as 16 regiões do SNC humano utilizando *Northern blots* comercialmente disponíveis na época. A medula espinhal teve o maior, e a amígdala o menor nível de expressão. As outras regiões do SNC compartilharam um nível semelhante de expressão. Este estudo mostrou que a expressão do transcrito de 1,5 Kb, e consequentemente da MB-COMT, é crucial para a atividade da COMT em todas as regiões do SNC humano (Hong *et al.*, 1998).

Mais recentemente, Matsumoto *et al.* utilizaram hibridização histoquímica *in situ* para determinar o perfil de expressão de mRNA de COMT no córtex pré-frontal, corpo

estriado e mesencéfalo humanos. Os mRNAs de 1,5kb foram observados nos neurônios piramidais grandes e pequenos, em todas as camadas do córtex pré-frontal, bem como em neurônios médios e do corpo estriado. Os níveis de mRNA foram obviamente maiores nos neurônios do que em células da glia. O corpo estriado, o qual recebe grande carregamento dopaminérgico, expressou níveis inferiores do mRNA em comparação ao córtex pré-frontal. Os mRNAs também foram abundantes em células ependimais que revestem os ventrículos cerebrais. No mesencéfalo, o mRNA foi detectado em neurônios dopaminérgicos, embora em níveis baixos (Matsumoto *et al.*, 2003).

Em 2006, no entanto, Tunbridge *et al.* publicaram uma carta aos editores na *Molecular Psychiatry* mostrando resultados preliminares da existência de uma forma variante da proteína MB-COMT no córtex pré-frontal, de peso molecular de aproximadamente 39kDa. Os dados preliminares de espectroscopia de massa já confirmavam ser esta uma forma variante da MB-COMT (Tunbridge *et al.*, 2006).

Com base nesses achados preliminares, o mesmo grupo de pesquisa publicou, no ano seguinte, o primeiro trabalho que identificou a ocorrência de formas resultantes de *alternative splicing* do mRNA da COMT no cérebro humano. Os autores utilizaram PCR de transcrição reversa para detectar sistematicamente variações do mRNA da COMT no córtex pré-frontal humano. A identidade dos amplicons foi confirmada por sequenciamento, e suas distribuições regionais e 30 regiões não traduzidas foram caracterizadas por meio de RT-PCR. Foram detectadas 7 variações do mRNA da COMT, resultantes de inserções e deleções no transcrito conhecido da COMT cerebral. Várias das variantes alteraram a sequência codificadora prevista. Três destas variantes correspondem a sequências existentes na base de dados Aceview e puderam ser confiavelmente amplificadas. O restante não correspondeu à nenhuma *expressed sequence tag* e foram amplificados apenas uma vez. Os resultados deste trabalho revelam uma complexidade adicional na biologia da COMT, e os produtos alternativos deste gene podem ser de importância funcional significativa (Tunbridge *et al.*, 2007).

2.3 Variações genéticas da COMT

O locus do gene COMT contém múltiplos SNPs com frequência do alelo raro maior do que 1% (SNPs comuns; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projetos/SNP>). A maioria deles estão localizados em regiões não codificadoras e não têm uma óbvia consequência funcional (como afetar a expressão de mRNA ou alterar a sequência de aminoácidos da proteína).

Recentemente, o complexo padrão de variação e desequilíbrio de ligação (associação alélica não aleatória) no gene da COMT foi estudado em 45 populações humanas utilizando 28 SNPs. Verificou-se que haplótipos comuns (conjuntos de alelos de SNPs associados) de diversas linhagens evolutivas potencialmente ainda escondem variações não detectadas com consequências funcionais (Mukherjee *et al.*, 2010).

Certamente, o SNP mais estudados no gene COMT é o rs4680, também conhecido como *Val158Met*. Este polimorfismo provoca uma substituição de uma valina (*Val*) por uma metionina (*Met*) na posição de aminoácido 158, levando a uma redução de três a quatro vezes na atividade da enzima (Lotta *et al.*, 1995). O alelo *Met* está associado com baixa atividade enzimática e estabilidade de proteína (Lotta *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 1996; Weinshilboum, 2006).

A análise de desequilíbrio de ligação no gene da COMT revela a existência de três haploblocos na maioria das populações humanas (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), o que é consistente com o previamente sabido que, usualmente, três a quatro haplótipos comuns cobrem toda a variação genética ao longo de cada haplobloco (Gabriel *et al.*, 2002).

Em 2005, Diatchenko *et al.* descreveram três haplótipos da COMT muito comuns consistindo de quatro SNPs (rs6269, rs4633, rs4818 e rs4680-*Val158Met*) cobrindo a região do íntron 2 ao éxon 4, e representando 96% de todos os haplótipos observados. Eles foram identificados como haplótipos de baixa (LPS), média (APS), e alta sensibilidade

à dor, e também se correlacionaram fortemente com mudanças na atividade da enzima (até 20 vezes de diferença) (Diatchenko *et al.*, 2005).

Curiosamente, o haplótipo APS, que contém o alelo *Met*, está correlacionado com um nível apenas intermediário de atividade da enzima, enquanto que o alelo *Val*, dependendo da combinação com os alelos dos outros três SNPs, correlaciona-se com atividade da COMT muito alta ou muito baixa. Tal fato pode ser explicado por alterações causadas na conformação da estrutura secundária do mRNA em função da troca de alelos, o que pode ser permissivo ou restritivo para a tradução de COMT (Nackley *et al.*, 2006).

A estrutura secundária corresponde ao emparelhamento bidimensional de nucleótidos dentro de uma sequência de mRNA, que resulta na formação de dobras, caules, e *loops* característicos que influenciam a taxa de sua tradução em proteína. Ambos os haplótipos LPS e HPS incluem o alelo *Val*, mas o haplótipo HPS tem efeito restritivo sobre a tradução da enzima e metaboliza 11,4 vezes menos catecolaminas do que o haplotipo LPS num ensaio de cultura de células (Nackley e Diatchenko, 2010).

Um estudo recente do mesmo grupo investigou o efeito de SNPs mais raros da COMT (com frequências alélicas menores que 1-5%) sobre a atividade enzimática haplótipo-dependente. Os resultados de experiências *in silico* e *in vitro* mostraram que a inclusão de SNPs mais raros nos haplótipos previamente descritos não modifica a dobragem do mRNA, sua transcrição, a tradução da proteína, ou atividade enzimática (Nackley *et al.*, 2009).

Assim, é possível supor que SNPs adicionais da COMT, sinônimos ou não sinônimos, são marcadores de haplótipos funcionais em vez de colaboradores independentes para a atividade da COMT (embora alguns deles possam ter efeito funcional independente através de mecanismos alternativos ainda desconhecidos). Imaginando que estes haplótipos são expressos no cérebro, com os mesmos níveis de expressão e atividades, homocigotos para o haplótipo LPS são capazes de metabolizar catecolaminas de forma mais eficiente, e presumivelmente, têm reduzida neurotransmissão dependente de catecolaminas (Voelker *et al.*, 2009).

2.4 Contribuição da COMT para os diferentes tipos de dor em humanos

Durante a última década, as variações genéticas da COMT foram extensivamente testadas em estudos de associação com fenótipos complexos, tais como transtornos mentais (Hosak, 2007), funções cognitivas (Heinz e Smolka, 2006), e estresse (Derijk, 2009). O efeito modulador de SNPs funcionais, marcadores informativos, e/ou haplotipos sobre diferentes fenótipos relatados em mais de 200 publicações no PubMed, reforçam o papel fundamental da COMT para as funções do cérebro e susceptibilidade à comprometimento da função. Uma vez que a dor humana tem componentes integrados (sensório-discriminativo, aversivo-afetivo e cognitivo-avaliativo) nos diferentes domínios afetados pela COMT, este gene tornou-se um candidato "padrão ouro" em estudos de associação genética de dor humana buscando explicar a variabilidade interindividual na percepção, persistência, e sensibilidade à dor, assim como na eficácia analgésica.

2.4.1 Estudos de imagem

Zubieta *et al.* em 2003 testaram a hipótese de que um variante genética funcional poderia afetar não só a proteína codificada pelo gene em questão, mas também poderia contribuir para a resposta de todo um sistema em geral. Eles examinaram a influência do SNP *Val158Met* na modulação das respostas ao desafio de dor prolongada (infusão de solução salina hipertônica), utilizando a tecnologia de PET (tomografia por emissão de positrons), e encontraram que os indivíduos com genótipo *Met/Met* reportaram maiores graduações da dor sensorial e afetiva e exibiram densidade regional mais elevada de receptores μ -opióides no cérebro. Efeitos opostos foram observados nos homozigotos *Val*. Os autores concluíram que a COMT influencia a experiência humana de dor e pode ser a base das diferenças interindividuais na adaptação e respostas à dor e outros estímulos estressantes (Zubieta *et al.*, 2003).

Recentemente, foram publicados mais dois estudos de imagem sobre o efeito do mesmo SNP da COMT sobre a modulação da dor. Mobascher *et al.* investigaram o impacto do polimorfismo *Val158Met* na resposta dependente do nível de oxigênio no sangue (BOLD) ao estímulo doloroso provocado por laser, utilizando imagens de ressonância

magnética funcional. Mais uma vez, o alelo *Met* esteve associado com maior resposta BOLD no córtex cingulado anterior, validando o efeito da COMT no processamento cerebral da dor (Mobascher *et al.*, 2010).

Lee *et al.* examinaram o efeito modulatório do *Val158Met* da COMT em interações neuronais indicado por forças de conectividade usando EEG, e confirmou os achados anteriores de imagem (Lee *et al.*, 2011).

A neuroimagem oferece uma abordagem poderosa para avaliar atividade neuronal funcional, e medidas neurofisiológicas podem servir como fenótipos intermediários em análises de associação, especialmente no que diz respeito a pequenos efeitos genéticos em comparação a parâmetros comportamentais de disfunções neuronais (Xu *et al.*, 2006).

2.4.2 Sensibilidade à dor experimental

O SNP funcional *Val158Met* da COMT foi investigado em relação à resposta à dor experimentalmente evocada. Uma contribuição gênero-específica para a variabilidade na sensibilidade à dor fria de curta duração foi encontrada em caucasianos, mas não em outras raças (Kim *et al.*, 2006), e não foi confirmado em estudos posteriores sobre a percepção da dor térmica (Birklein *et al.*, 2008; Potvin *et al.*, 2009).

Análise por haplótipos utilizando os três haplótipos funcionais comuns descritos previamente (LPS, APS ou HPS), revelou a associação com uma medida global de sensibilidade à dor derivada das respostas dos indivíduos aos estímulos nociceptivos térmico, isquêmico, e de pressão. Aparentemente, portadores de alelos específicos destes haplótipos mostram associações diferentes com estímulos específicos de evocação de dor, sendo que homozigotos LPS tiveram a menor, homozigotos APS tiveram a média, e heterozigotos e APS/HPS tiveram a maior resposta à dor em termos de limiar e tolerância. No entanto, apenas o SNP *Val158Met*, mas não os haplótipos funcionais, esteve associado com o índice de somação temporal da dor ao calor, sugerindo que os polimorfismos genéticos funcionais da COMT podem afetar diferencialmente a percepção da dor

experimental; no entanto, o natureza desta observação ainda não está clara (Diatchenko *et al.*, 2006). Sand *et al.* sugeriram que a falta de efeito direto do SNP *Val158Met* sobre a tolerância à dor experimental pode ser explicada por formas alternativas de transcritos do gene da COMT (Sand *et al.*, 2008).

Além disso, um estudo de EEG medindo os potenciais relacionados a eventos em resposta a estímulos nociceptivos elétricos demonstrou que o alelo *Met* aumentou o processamento cortical da dor apenas em pacientes com dor crônica, e não em pacientes controle saudáveis. Os autores sugeriram que é possível que a dor crônica aumente a sensibilidade genética à dor experimentalmente evocada (Vossen *et al.*, 2010).

2.4.3 Dor musculoesquelética

Em um estudo sobre dor musculoesquelética aguda, homozigotos para o haplótipo vulnerável à dor da COMT foram mais propensos a relatar dor moderada a severa no pescoço após colisão de veículo a motor, além de precisarem de mais tempo para a recuperação física e emocional, indicando que a variação genética da COMT afeta tanto a resposta somática como a psicológica nos portadores deste haplótipo (McLean *et al.*, 2011).

O SNP funcional da COMT, *Val158Met*, parece não ter efeito direto sobre a dor musculoesquelética quando estudados isoladamente: não foi observada diferença na distribuição alélica entre os controles e 12 grupos diferentes com queixas de dor musculoesquelética crônica em um grande estudo populacional (Hagen *et al.*, 2006).

A dor musculoesquelética crônica disseminada parece não ser afetada pelas variações genéticas da COMT (seja o SNP *Val158Met* ou os haplótipos funcionais) em três estudos independentes recentes em populações caucasianas (Hocking *et al.*, 2010; Jakobi *et al.*, 2010; Nicholl *et al.*, 2010). Estes resultados negativos podem ser causados por problemas no delineamento destes estudos, que utilizaram uma amostragem de conveniência ao invés de criarem um coorte de pacientes com dor musculoesquelética crônica disseminada com fenótipos contínuos bem definidos.

2.4.4 Fibromialgia

Fibromialgia, uma síndrome reumática idiopática crônica, é caracterizada por sensibilidade à dor aumentada (dor difusa e pontos sensíveis), acompanhada por uma série de sintomas psicológicos, incluindo distúrbios de humor e do sono. Fatores neuroendócrinos e genéticos desempenham um papel significativo na evolução desta doença, e os polimorfismos no gene da COMT são um dos principais contribuintes inatos. Cohen *et al.* relataram que homozigotos para o alelo *Met* da COMT mostraram aumento da sensibilidade à dor e no número de pontos sensíveis (Cohen *et al.*, 2009).

Um estudo realizado em pacientes brasileiros com fibromialgia confirmou esse achado e mostrou que os alelos raros de dois SNPs, rs4680 e rs4818, estiveram associados com maior dor (Barbosa *et al.*, 2012).

Vargas-Alarcón *et al.* relataram que mais um SNP isolado, rs6269, esteve associado à fibromialgia e sintomas mais graves em uma população de mulheres espanhola, com sinal de associação mais fraco em uma coorte de mulheres mexicanas (Vargas-Alarcon *et al.*, 2007).

As variações genéticas da COMT parecem modular não só a dor, mas também processos mal adaptativos de enfrentamento da dor em pacientes com fibromialgia: homozigotos para o alelo *Met* experimentaram mais dor nos dias em que os escores de atenção à dor e catastrofização foram elevados (Finan *et al.*, 2011), e um maior declínio no efeito positivo em dias em que a dor esteve elevada (Finan *et al.*, 2010).

Estas descobertas apóiam a ideia de um papel para a COMT e as catecolaminas em reatividade afetiva positiva à dor da fibromialgia, e em vias da cognição relacionadas à dor em pacientes com esta síndrome. Os polimorfismos da COMT, em particular o *Val158Met*, podem ser útil para a identificação de indivíduos susceptíveis à fibromialgia (Matsuda *et al.*, 2010), embora evidências confirmatórias com base em grandes amostras de pacientes com fibromialgia bem definidas ainda sejam necessárias.

2.4.5 COMT e cefaléia crônica

O SNP *Val158Met* da COMT apresentou distribuição alélica diferenciada entre indivíduos com cefaléia e controles saudáveis, de modo que foi mais frequente no primeiro grupo (Emin Erdal *et al.*, 2001).

Este achado também foi observado em um grande estudo populacional: uma prevalência mais baixa de dores de cabeça não-migrêneas foi encontrada entre mulheres homozigotas *Val* (Hagen *et al.*, 2006).

Em outro estudo com uma amostra de pacientes com cefaléia limitada às mulheres, a contribuição do SNP da COMT para a expressão fenotípica foi revelada: o alelo *Met* esteve significativamente associado com maior intensidade de dor de cabeça, e com uma maior incidência dos sintomas associados de náuseas e vômitos (Park *et al.*, 2007).

Ainda não há estudos que investiguem a associação dos haplótipos funcionais da COMT em populações com cefaléia crônica até o momento. Uma vez que o efeito previamente descrito destes haplótipos sobre a atividade enzimática é mais profundo em comparação a um único SNP funcional, sua associação com as cefaléias crônicas pode ser muito mais forte se o nível de atividade da COMT for importante para o desenvolvimento desta condição.

2.4.6 Dor pós-operatória

Tanto o SNP *Val158Met* como os haplótipos da COMT mostraram associação significativa com escores de dor pós-operatória (respostas à dor clínica aguda) em modelo de extração de terceiro molar (Kim *et al.*, 2006).

Os haplótipos da COMT estiveram associados com maior melhora na pontuação do índice de incapacidade de Oswestry em pacientes com doença degenerativa do disco, um ano após a cirurgia (dor pós-operatória crônica), sugerindo que a variação da COMT pode ter preditivo em termos de prognóstico do tratamento (Dai *et al.*, 2010).

2.4.7 Dor e características biopsicossociais

Um estudo longitudinal prospectivo em pacientes com dor crônica pós-operatória no ombro mostrou uma interação entre catastrofização dor e diplótipos da COMT contribuindo para uma variância adicional na classificação da dor pré-operatória. Além disso, essa interação teve validade preditiva, uma vez que pacientes com alta catastrofização da dor e baixa atividade da COMT foram mais propensos a relatarem dor pós-operatória moderada à grave (George *et al.*, 2008).

Estes resultados foram confirmados em um modelo de dor experimental induzida no ombro – uma interação entre catastrofização da dor e diplótipos da COMT foi o mais forte e único da classificação da dor após 72 horas, indicando que os participantes com alta catastrofização da dor baixa atividade da COMT são mais propensos a relatarem intensidades elevadas da dor (George *et al.*, 2008).

Variações da COMT também já foram previamente associadas à depressão profunda e à resposta dos sintomas depressivos ao tratamento (Fijal *et al.*, 2010). Um estudo de 2009 mostrou que o haplótipo funcional da COMT LPS está associado com os índices de dor no *baseline* em pacientes do sexo feminino com transtorno depressivo profundo (Perlis *et al.*, 2009). No entanto, ainda não é claro se existe uma interação entre COMT e depressão contribuindo para a sensibilidade à dor nestes pacientes.

2.4.8 Dor neuropática

Até o momento, há apenas um único estudo publicado investigando o papel da variação genética da COMT em síndromes de dor neuropática. Armero *et al.* observaram uma ausência de associação entre o SNP *Val158Met* e dor em um estudo caso-controle usando um grupo caso misto com múltiplos diagnósticos de dor neuropática (distrofia simpático-reflexa, causalgia, síndrome da cirurgia lombar falha, membro fantasma, neuralgia de nervos periféricos, neuralgia de nervos cranianos e neuralgia pós-herpética) (Armero *et al.*, 2005). Não fica claro, portanto, se este resultado negativo é em função da heterogeneidade da amostra, falta de dados genéticos para a investigação dos haplótipos

funcionais, ou se de fato não há nenhum efeito da COMT sobre a susceptibilidade à dor neuropática.

Um estudo recente sobre o envolvimento do mesmo SNP no risco para síndrome das pernas inquietas, que muitas vezes ocorre com dor neuropática, teve resultados semelhantes: não houve diferenças significativas na distribuição deste SNP em entre casos e controles (Mylius *et al.*, 2010).

No entanto, existe uma possibilidade de que ambos os estudos apresentados acima representem uma verdadeira correlação negativa entre a atividade da COMT e dor neuropática, o que estaria de acordo com crescentes evidências de modelos animais sobre a influência divergente da atividade da COMT em modelos de dor específicos.

Recentemente, um haplótipo funcional da COMT de ratos, [denominado +SINE (Segall *et al.*, 2010), ComtB2i (Kember *et al.*, 2010), ou o alelo B (Li *et al.*, 2010)] foi descoberto por três grupos de pesquisa independentes, e estes dados suportam os achados de estudos de associação da COMT humana.

Linhagens de camundongos carregando o haplótipo ComtB2i têm aumento da função enzimática e tolerância aumentada à dor em ensaios de dor térmica e química induzidas, embora os testes de retração da cauda e de hipersensibilidade induzida por injúria ao nervo falhassem em reproduzir a correlação estatisticamente significativa (Segall *et al.*, 2010)(46).

Validação adicional foi encontrada em camundongos transgênicos e *knockout* para COMT. Os camundongos *knockout* apresentam sensibilidade à dor térmica aumentada, enquanto os animais transgênicos expressando COMT humana foram mais resistentes (Papaleo *et al.*, 2008).

Os dados de comportamento da dor disponíveis em diferentes linhagens de ratos também mostram correlação entre elevada atividade da COMT e resistência à dor induzida quimicamente, e sugerem que ratos também podem apresentar polimorfismos funcionais da COMT. Linhagens puras de ratos Lewis Wistar têm aproximadamente duas

vezes mais atividade enzimática da COMT em lisados biológicos que linhagens puras de ratos Fisher (Weinshilboum e Raymond, 1977; Weinshilboum *et al.*, 1979; Goldstein *et al.*, 1980).

Ratos Lewis mostram diminuição da sensibilidade à dor inflamatória no teste de formalina, onde uma solução de formaldeído e formalina é injetada na superfície plantar da pata traseira e o animal é observado durante 60 minutos (Lariviere *et al.*, 2006). Da mesma forma como os ratos de linhagens puras que carregam o haplótipo da COMT de elevada atividade funcional, os ratos Lewis são mais resistentes a este tipo de dor química induzida do que os ratos Fisher, que têm menor atividade da COMT.

Por outro lado, correlações contrárias com estímulos de dor também já foram relatadas. Por exemplo, ratos fêmeas *knockout* para S-COMT demonstraram uma latência significativa no teste de retração da cauda em comparação aos animais *wild-type* (Tammimaki *et al.*, 2010).

Além disso, o mesmo padrão de relação foi observado em linhagens de ratos puras com atividade da COMT diferentes. Por exemplo, os ratos Lewis com elevada atividade da COMT foram significativamente mais sensíveis no teste de retração da cauda e vocalizaram na maior parte dos testes em comparação aos ratos Fisher com baixa atividade da COMT (Lariviere *et al.*, 2006).

Ainda, os ratos Lewis levaram mais tempo que os ratos Fisher para se recuperarem da dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo ciático (Herradon *et al.*, 2007; Herradon *et al.*, 2008).

Uma vez que estes estudos em modelos de roedores apontem na direção de diferentes efeitos dos genótipos da COMT em diferentes modelos de dor, estudos de associação sobre as condições humanas de dor lançando mão dos haplótipos funcionais podem de fato auxiliar na avaliação da contribuição COMT para cada tipo de dor.

2.5 COMT e as disfunções temporomandibulares

Ainda é um enigma porque indivíduos podem variar consideravelmente em suas respostas às condições clínicas que têm potencial aparentemente semelhante para causar dor, um fenômeno que é freqüentemente observado na DTM (Slade *et al.*, 2007). Na lista já apresentada de genes candidatos, a COMT e suas variações genéticas parecem contribuir fortemente para as diferenças na percepção da dor de DTM.

Já em 1976, Marbach e Levitt (Marbach e Levitt, 1976) sugeriram um papel para COMT nesta condição quando relataram que pacientes com condições de dor facial comparáveis a DTM mostravam aumento dos níveis urinários de metabólitos de catecolaminas e exibiam atividade eritrocítica da COMT diminuída.

No primeiro estudo realizado para investigar a associação dos SNPs da COMT com DTM, Diatchenko *et al.* (Diatchenko *et al.*, 2005) identificaram que a presença de até mesmo um único haplótipo LPS diminui em até 2,3 vezes o risco de desenvolvimento de DTM miogênica. Tendo também demonstrado que o haplótipo LPS produz níveis mais elevados de atividade enzimática da COMT e que a inibição da COMT em ratos resulta em um profundo aumento na sensibilidade à dor, os autores sugeriram que os três haplótipos principais determinam a atividade da COMT em humanos, e correlacionam-se inversamente com o risco de desenvolvimento de DTM.

Em 2009, nosso grupo de pesquisa investigou a associação entre e DTM, tendo esta não sido identificada. Embora 633 mulheres tenham incluídas neste estudo, apenas o SNP *Val158Met* foi acessado, não sendo possível, portanto, a abordagem por haplótipos (Serrano, 2010).

O potencial das variações genéticas da COMT em mediar as relações entre características psicológicas e risco DTM também já foi investigado, e os efeitos das características psicológicas sobre o risco de desenvolver DTM não lhes pôde ser atribuído, indicando que existem mecanismos etiológicos distintos pelos quais características

psicológicas e variações genéticas da do gene da COMT influenciam o risco de uma pessoa desenvolver DTM (Slade *et al.*, 2007).

Além de características psicológicas, tratamentos ortodônticos foram várias vezes citados como um fator potencialmente de risco para a DTM. Por isso, a relação entre os genótipos da COMT, tratamento ortodôntico, e risco de DTM também foi investigada. Esta análise ilustrou perfeitamente um exemplo de interação entre gene e ambiente, uma vez que o risco relativo de DTM associada ao tratamento ortodôntico foi dependente de uma variação do gene da COMT. Mais especificamente, o tratamento ortodôntico não foi associado ao maior risco de desenvolver DTM entre as pessoas com haplótipos resistentes à dor, enquanto a associação foi encontrada elevando acentuadamente o risco de DTM entre os indivíduos com haplótipos sensíveis à dor (Slade *et al.*, 2008).

Embora os mecanismos moleculares precisos pelos quais as variações genéticas no gene da COMT afetam a atividade da COMT e, por consequência, condições de dor como a DTM ainda não sejam completamente desvendados, um destes mecanismos parece ser através da alteração da estrutura secundária do mRNA, como descrito previamente nesta revisão de literatura.

Neste contexto, modelos animais ajudam no maior esclarecimento destes mecanismos, uma vez que essas variações genéticas podem afetar não apenas a proteína codificada pelo gene em questão, mas também podem ter efeitos em cascata que contribuem para a resposta global do sistema.

Em ratos, a ativação crônica da neurotransmissão dopaminérgica e receptores D2, uma situação paralela à observada em homozigotos *Met/Met* (SNP rs4680), reduz o conteúdo neuronal de peptídeos da encefalina e induz aumentos compensatórios nas concentrações regionais de receptores μ -opióides em várias regiões do cérebro (Steiner e Gerfen, 1998).

Com base nisso, foi hipotetizado que também em humanos a hiperatividade do sistema dopaminérgico induzida pela baixa função da enzima COMT *Met/Met* estaria

associada com uma menor capacidade de ativar a neurotransmissão μ -opióide em condições provocadas em virtude de um menor conteúdo neuronal de encefalina. Zubieta *et al.* detectaram que a magnitude da ativação do sistema μ -opióide em resposta a um desafio de dor foi menor em indivíduos *Met/Met*, assim como o aumento no potencial de ligação a receptores μ -opióides, confirmando que níveis variáveis de metabolismo de catecolaminas induzidos pelo polimorfismo *Val158Met* estão associadas a alterações na cascata de respostas funcionais do sistema neurotransmissor μ -opióide (Zubieta *et al.*, 2003). Estes resultados foram ainda validados por Jensen *et al.*, que demonstraram sensibilidade à dor aumentada em indivíduos *Met/Met* ao longo do tempo, após a administração de opióides exógenos (Jensen *et al.*, 2009).

Outro mecanismo possível é que a atividade reduzida da COMT, resultando em níveis elevados de catecolaminas, tais como epinefrina, favoreça a produção de condições crônicas de dor através da estimulação de receptores β -adrenérgicos (β AR, do inglês *beta adrenergic receptors*). Ao investigar esta hipótese, Nackley *et al.* relataram que aumentos COMT-dependentes na sensibilidade à dor foram completamente bloqueados pelo antagonista não seletivo β -adrenérgico propanolol, ou pela administração combinada de antagonistas seletivos β 2 e β 3-adrenérgicos, sugerindo que a sensibilidade à dor COMT-dependente é mediada por processos de sinalização coincidentes β 2/3 adrenérgicos. Portanto, pode-se sugerir que níveis elevados de catecolaminas, resultantes de atividade reduzida da COMT, ativam os β 2/3-ARs para produzir sensibilidade à dor aumentada (Nackley *et al.*, 2007).

Endossando o envolvimento da via simpática β 2/3-adrenérgica na percepção da dor humana, antagonistas β AR aliviaram significativamente a dor de alguns pacientes com DTM e fibromialgia (Bhalang *et al.*, 2004), sugerindo que os indivíduos carregando os haplótipos APS e HPS e sofrendo com condições crônicas de dor que resultam da baixa atividade da COMT podem ser favorecidos pelo tratamento farmacológico com agentes que bloqueiam o sistema β -adrenérgicos.

2.6 COMT e a medicina da dor

Um dos objetivos evidentes dos estudos de associação genética é aplicar abordagens baseadas em genética no manejo personalizado da dor buscando prever a resposta do indivíduo ao tratamento. Parte da variabilidade interindividual na terapia da dor tem sido associada com polimorfismos genéticos, incluindo aqueles da COMT (Oertel e Lotsch, 2008).

O SNP *Val158Met* da COMT tem sido associado com menores doses de morfina para se atingir analgesia em pacientes com dor de câncer: homozigotos para o alelo *Val* precisam significativamente de mais morfina em comparação a heterozigotos ou homozigotos para o alelo *Met* (Rakvag *et al.*, 2005).

Outros SNPs da COMT podem também contribuir para este efeito uma vez que a análise de 11 variações no gene revelou uma correlação do haplótipo mais comum (34,5% de frequência) com menores doses de morfina em uma coorte de doentes com câncer (Rakvag *et al.*, 2008).

Ross *et al.* relataram que um haplótipo menos frequente (cerca de 10%) constituído a partir de SNPs no íntron 1 da COMT (não incluindo os SNPs *Val158Met* e os relacionando aos haplótipos LPS, APS e HPS) se correlacionou com os efeitos colaterais centrais do consumo de morfina (sonolência, confusão, e alucinações), os quais compõe a razão mais comum para não se obter analgesia adequada da morfina, impedindo o escalonamento da dose (Ross *et al.*, 2008).

Um estudo recente demonstrou que a sensibilidade aumentada aos estímulos térmicos dolorosos repetitivos após uma dose única de opiáceos foi influenciada pelo polimorfismo *Val158Met*, e homozigotos *Met* exibiram maior sensibilidade à dor. O efeito foi observado após a aplicação de cinco estímulos, quando o sistema inibitório já havia sido sensibilizado, sugerindo que as diferenças relacionadas à COMT na resposta a analgésicos pode ser mais evidente em pacientes com dor crônica (Jensen *et al.*, 2009).

Recentemente, pesquisadores de um estudo multicêntrico transversal observacional em centros ambulatoriais de pacientes com dor de câncer analisaram a influência de moduladores farmacogenéticos da dor atualmente conhecidos na terapia opióide, incluindo o polimorfismo *Val158Met*. Descobriram que os portadores do alelo *Met* receberam maiores doses de opióides que não portadores (Lotsch *et al.*, 2009). Este achado contrário ao esperado talvez possa ser explicado pela heterogeneidade extremamente elevada da amostra, pela impossibilidade de se avaliar o alívio atingido da dor, e pela variedade de analgésicos opióides testados. É preciso considerar também que muitas das variações genéticas relacionadas à dor são comuns (frequências alélicas de 10 a 50%), os estudos de associação podem demonstrar resultados inconsistentes devido à presença simultânea em um único indivíduo de vários polimorfismos genéticos funcionais que modulam especificamente os efeitos de analgésicos e atuam como fatores de confundimento ou interação (Lotsch *et al.*, 2009). Portanto, variações funcionais da COMT tem um potencial significativo para influenciar a saúde humana (Mantione *et al.*, 2010), desde que se controlem os fatores de confundimento em nível de genotipagem e fenotipagem no delineamento do estudo.

Além do efeito direto sobre o tratamento com opióides, os polimorfismos da COMT podem também servir como preditores genéticos do resultado do tratamento da dor. Um estudo piloto de Tchivileva *et al.* demonstrou o efeito dos haplótipos funcionais da COMT na resposta à terapia de dor musculoesquelética crônica com propranolol: quando a amostra de pacientes com DTM foi estratificada em função dos haplótipos, um efeito benéfico do propranolol na percepção da dor foi observado em pacientes que não carregavam o haplótipo LPS – relacionado à alta atividade da COMT –, um benefício reduzido foi observado nos heterozigotos, e nenhum benefício foi observado nos homozigotos LPS (Tchivileva *et al.*, 2010). Este estudo é a primeira evidência de sucesso na aplicação de genotipagem da COMT antes da terapia para identificar um subgrupo de pacientes que poderá ser beneficiado por ela.

Por fim, a COMT pode interagir com outros fatores genéticos (através de epistasia, ou interação entre genes) para afetar os resultados do tratamento de dor. Um

estudo recente demonstrou que pacientes que eram heterozigotos para os alelos dos SNPs *A118G* do receptor opióide μ e *Val158Met* da COMT apresentaram analgesia pós-operatória por morfina muito melhor (consumo menor de morfina), e escores muito mais baixos de náusea e sedação, em comparação aos outros grupos genotípicos (Kolesnikov *et al.*, 2011). Este dado confirma a importância de uma abordagem da interação entre os genes na compreensão dos mecanismos genéticos de analgesia, o que inclui o papel da COMT.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo inicial identificar novos polimorfismos no gene da COMT associados à DTM.

A partir da identificação do SNP rs165774 (G>A), que por sua vez se localiza em proximidade ao SNP rs165895 (T>C), ambos na região 3' não traduzida de um mRNA alternativo da COMT ainda não caracterizado, também foram nossos objetivos: (i) verificar a expressão deste transcrito em diferentes tecidos humanos e linhas de células; (ii) prever a estrutura cristalina da enzima codificada por ele; (iii) expressá-lo em um sistema celular e comparar sua expressão relativa e atividade enzimática às da isoforma convencional; e (iv) verificar os efeitos dos SNPs rs165774 e rs165895 sobre a expressão relativa e atividade enzimática deste transcrito.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudos de associação

4.1.1 Delineamento do estudo e seleção de indivíduos

Este estudo foi conduzido com base nos dados já coletados a partir de duas coortes, a primeira chamada de “COMT”, e a segunda, OPPERA (do inglês *Orofacial Pain: Prospective Evaluation and Risk Assessment*).

A coorte “COMT” foi formada por 400 mulheres caucasianas da região de Chapel Hill (Carolina do Norte/EUA), das quais 105 eram portadoras de DTM. Detalhes da composição desta coorte encontram-se já descritos na literatura (Diatchenko *et al.*, 2005). Resumidamente, esses dados consistem na determinação da sensibilidade individual a estímulos dolorosos mediante diferentes modalidades (fenótipos intermediários): (1) limiar de dor à pressão, em kPa, determinado utilizando-se um algômetro de pressão sobre os músculos temporal e masseter, articulação temporomandibular, e superfície ventral dos punhos, sempre bilateralmente; (2) limiar de dor e tolerância de dor ao calor, utilizando um dispositivo térmico controlado por computador colocado sobre a pele nas regiões do antebraço direito e dorso do pé direito; sendo que as voluntárias classificavam verbalmente a intensidade da dor de acordo com uma escala numérica de 0 a 100mm; e (3) limiar de dor e tolerância a dor isquêmica, em minutos, que foram determinados pelo procedimento de esforço submáximo com torniquete. Para avaliar a sensibilidade dolorosa de cada voluntária e conduzir as análises estatísticas, uma medida unitária de dor para cada fenótipo intermediário foi gerada (*z-score*).

Casos de DTM foram definidos com base no *Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders* (Dworkin e LeResche, 1992). Brevemente, tinham que atender a três critérios: relato de dor frequente na região de músculos da mastigação, temporais, e/ou articulação temporomandibular durante os últimos 6 meses (pelo menos 15 dias no mês corrente, e 5 dias por mês em cada um dos outros 5 meses); relato de dor durante o exame clínico; e relato de dor em pelo menos três músculos mastigatórios, ou

pelo menos uma articulação temporomandibular, em resposta à palpação do examinador ou manobras da mandíbula.

As voluntárias controle, por sua vez, tinham que exibir cada uma das cinco características a seguir: nenhum relato de dor frequente na região de músculos da mastigação, temporais, e/ou articulação temporomandibular nos últimos 6 meses (nenhuma dor no mês corrente e não mais do que 4 dias de dor por mês em nenhum dos outros 5 meses); não mais do que 4 relatos de cefaléia por mês nos últimos três meses; nunca ter sido diagnosticada com DTM; nunca ter usado aparelhos oclusais; e nenhum relato de dor durante o exame clínico.

A coorte OPPERA também se encontra descrito em detalhes na literatura (Maixner *et al.*, 2011), sendo que os dados do estudo de caso-controle *baseline* já estão disponíveis para análise, e parte deles já foi recentemente publicada (Fillingim *et al.*, 2011; Greenspan *et al.*, 2011; Maixner *et al.*, 2011; Maixner *et al.*, 2011; Ohrbach *et al.*, 2011; Slade *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011). Este estudo conta com um total de 3050 indivíduos, homens e mulheres (n=1736), recrutados entre Maio de 2006 e Novembro de 2008 nas comunidades e proximidades dos centros de saúde acadêmicos de Baltimore (Maryland/EUA), Buffalo (New York/EUA), Chapel Hill (North Carolina/EUA), e Gainesville (Florida/EUA), dos quais 166 foram inicialmente diagnosticados com DTM. Os casos e controles foram definidos com base nos mesmos critérios descritos brevemente para o coorte “COMT”. No presente estudo, apenas mulheres caucasianas foram incluídas nas análises (n=969; 106 casos e 863 controles).

A OPPERA coletou dados de três modalidades de fenótipos intermediários e já foram descritos em detalhes (Greenspan *et al.*, 2011). Sucintamente, os dados de limiar de dor à pressão, em kPa, foram obtidos usando um algômetro de pressão sobre a porção central dos músculos temporal, masseter, e trapézio, sobre a articulação temporomandibular, e sobre o epicôndilo lateral, bilateralmente. A dor cutânea mecânica foi acessada utilizando sondas de pressão calibradas variando entre 8 a 512mN sobre o dorso dos dedos 2 a 4; após a determinação do limiar individual de dor, os indivíduos eram

orientados a classificar a dor de acordo com uma escala numérica de 0 a 100 após a aplicação de um estímulo supra-limiar (limiar de dor), e após a aplicação de uma série de 10 estímulos supra-limiais (somação temporal); os indivíduos também classificaram a sensação tardia de dor 15 e 30 segundos após o término da aplicação da série de 10 estímulos. A sensibilidade à dor ao calor foi acessada utilizando um estimulador térmico disponível no mercado (Pathway; Medoc, Ramat Yishai, Israel) e aplicando o estímulo no ventre do antebraço; após a determinação do limiar individual de dor, uma série de 10 estímulos supralimiais (somação temporal) eram aplicados, e o participante era instruído a classificar a dor, utilizando a mesma escala; as sensações tardias de dor após 15 e 30 segundos da aplicação dos estímulos também foi classificada. Para avaliar a sensibilidade dolorosa de cada voluntária e conduzir as análises estatísticas, uma medida unitária de dor para cada fenótipo intermediário foi gerada (*z-score*).

Para ambos os coortes, amostras de sangue foram coletadas de cada indivíduo e foram genotipadas usando o *Algyonomics Pain Research Panel* (Algyonomics, Chapel Hill, NC, EUA), uma plataforma utilizando a tecnologia *Affymetrix MegAllele* que permite identificar 3295 SNPs representando 358 genes conhecidamente envolvidos nos sistemas relevantes de processamento da dor (<http://www.algyonomics.com/pain-research-panel.html>).

4.1.2 Análises genético-estatísticas de associação

Os testes de associação assumindo efeitos codominantes foram conduzidos utilizando regressão logística (dados categóricos) ou linear (dados contínuos) no *software* PLINK [<http://pnu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>; (Purcell *et al.*, 2007)], considerando o número de cópias do alelo raro como a variável genética preditora e o *status* de DTM como a variável dependente. Para corrigir para os diferentes sítios de recrutamento, variáveis *dummy* foram introduzidas como covariáveis nas análises de regressão. A idade também foi incluída como covariável. O erro tipo I adotado foi de 5%, com intervalo de confiança de 95% (CI 95%), e o efeito dos alelos foi determinado com base no *odds ratio*.

4.2 Expressão da COMT em diferentes tecidos e células

Para detectar a expressão da COMT, isoformas convencional e truncada, extraímos o RNA total de diferentes linhas de células – BE(2)-C (CRL-2268; ATCC, Manassas, VI, EUA), COS-1 (CRL-1650; ATCC), SY5Y (CRL-2266; ATCC), e H4 (HTB-148; ATCC) – e de tecido da raiz do gânglio dorsal humano (fornecido pela Dra. Inna Belfer, University of Pittsburgh, PA, EUA) utilizando *RNeasy* (QIAGEN, Valencia, CA, EUA). As outras amostras de RNA total – lobo frontal, medula oblongata, ínsula, núcleo acumbens, ponte, medula espinhal, tecido conjuntivo, e leucócitos – foram adquiridas da empresa Clontech/Takara Bio (Mountain View, CA, EUA).

O RNA foi tratado com a enzima *RNase free-DNase I* (Promega, Madison, WI, EUA) e 1µg do produto foi submetido à transcrição reversa com *Superscript III* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sempre seguindo as orientações dos respectivos fabricantes.

O cDNA produzido foi amplificado no sistema 7900HT *Fast Real-Time* PCR (Applied Biosystems Incorporated, Foster City, CA, EUA), utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.) e os primers *forward* e *reverse*, submetidos a 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 seg, e 60°C por 1 min.

Os primers foram desenhados com base na sequência disponível no GenBank (isoforma convencional: EF103922; isoforma truncada: CR616943), sendo que o mesmo primer *forward* foi utilizado para detectar as duas isoformas (primer *forward*: TTCGCTGGCGTGAAGGA; primer *reverse*-isoforma convencional: ACGTTGTCAGCCAGTAGCAC TGT; primer *reverse*-isoforma truncada: GGCTGAGGCTGACTGAATGG).

Os valores de Ct (do inglês *cycle threshold*) obtidos foram normalizados com base na detecção do controle interno de expressão hRPL13a (do inglês *human ribosomal protein L13a*) para análise da expressão relativa das isoformas da COMT.

4.3 Previsão da estrutura cristalina da isoforma truncada

Nós modelamos a isoforma truncada da S-COMT, a (T)S-COMT, utilizando o método de dinâmicas moleculares discretas de troca de réplicas (REXDMD, do inglês *replica-exchange discrete molecular dynamics*) (Ding *et al.*, 2008; Tsao e Dokholyan, 2010). Um modelo atômico inicial foi gerado mapeando sua sequência de aminoácidos sobre a estrutura cristalina já conhecida isoforma convencional (108V COMT, PDB: 3BWM) utilizando Medusa, uma ferramenta desenvolvida para o delineamento e modelagem molecular de proteínas, que permite a exploração simultânea da sua sequência e de sua conformação espacial (Ding e Dokholyan, 2006; Rutherford *et al.*, 2008).

Os primeiros 154 resíduos, que são idênticos aos da estrutura 3BWM (isoforma convencional) foram condicionados às cadeias laterais. Os últimos 30 resíduos, exclusivos para a isoforma truncada, foram deixados sem restrições. Uma simulação de fusão inicial foi realizada para desnaturar a extremidade C-terminal. A partir deste modelo inicial, foi realizada a REXDMD para 1×10^6 unidades de tempo. Nós utilizamos 15 réplicas, nas quais a temperatura foi incrementada em $0,05 \text{ } \epsilon/\text{Kb}$, tal que a faixa de temperaturas variou de $0,30\text{-}1,00 \text{ } \epsilon/\text{Kb}$ (usando um termostato de Andersen) (Andersen, 1980). A temperatura entre quaisquer duas réplicas variou a cada 1000 unidades de tempo durante o decorrer da simulação. Uma minimização adicional foi realizada a fim de remover quaisquer potenciais conflitos estéricos e obter a estrutura final. A estrutura de menor energia representa o modelo final de estrutura da isoforma truncada da COMT.

Apenas a estrutura cristalina da (T)S-COMT foi prevista uma vez que (i) além de já existir disponível na literatura a bem estabelecida predição da estrutura da isoforma solúvel convencional, (ii) para realizar a mesma predição para a isoforma truncada ligada à membrana, é necessário primeiro estabelecer a estrutura da isoforma convencional, o que se torna bastante difícil em função da porção da estrutura ligada à membrana. Apesar disso, tentamos realizar esta predição, mas a estrutura obtida parece ser curta demais para atravessar a membrana.

4.4 Expressão dos clones e mutantes e caracterização da isoforma truncada

Clones da MB-COMT, S-COMT, e da isoforma truncada da MB-COMT [(T)MB-COMT] em vetor *pCMV-sport6* foram adquiridos da IMAGE *clone collection* (Open Biosystems, Huntsville, AL, EUA), e os clones S-COMT e (T)MB-COMT foram utilizados para criarmos o clone da isoforma truncada da S-COMT [(T)S-COMT]. Todos os clones foram sequenciados para identificação dos haplótipos e dos alelos referentes aos SNP rs165774 (G>A) e rs165895 (T>C). Todos os clones carregavam o haplótipo APS, o alelo rs165774G (comum), e o alelo rs165895C (raro). Estes clones serão chamados de *(T)MB-* ou *(T)S-COMT_rs165895C*.

Assim sendo, o primeiro passo foi criar o mutante carregando apenas os alelos comuns para os dois SNPs, que chamaremos de *(T)MB-* ou *(T)S-COMT_comum*. Para isso, realizamos mutação sítio dirigida no SNP rs165895, utilizando *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, LaJolla, CA, EUA) e primers mutagênicos *forward* e *reverse* (GTTTAGTAGAGATGGGGTCTCACCACATTGGCCAG e CAAATCATCTCTACCCCAGAGTGGTGTAACCGGTC, respectivamente), seguindo as orientações do fabricante. Os primers foram desenhados utilizando a ferramenta disponível no site da empresa (<http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Tool&SubPageType=ToolQCPD&PageID=15>).

Em seguida, utilizamos o mesmo método para criar os mutantes expressando o alelo rs165774A (primer *forward* CTGCTGTTAGCAGCCAGACTAGGAGCACGAG e primer *reverse* CTCGTGCTCCTAGTCTGGCTGCTAACAGCAG). Estes clones serão chamados de *(T)MB-* ou *(T)S-COMT_raro*.

Assim, ao final das transformações, dispúnhamos dos seguintes clones: *MB-COMT*: APS, rs165774G, rs165895T; *(T)MB-COMT_comum*: APS, rs165774G, rs165895T; *(T)MB-COMT_raro*: APS, rs165774A, rs165895C; *(T)MB-COMT_rs165895C*: APS, rs165774G, rs165895C; *S-COMT*: APS, rs165774G, rs165895T; *(T)S-COMT_comum*: APS, rs165774G, rs165895T; *(T)S-COMT_raro*: APS, rs165774A, rs165895C; *(T)S-COMT_rs165895C*: APS, rs165774G, rs165895C.

Células Be2C foram então cultivadas em meio próprio e plaqueadas em poços de 6 cm de diâmetro a 125.000 células/ml (2ml/poço), e um dia após o plaqueamento, foram transfectadas (Lipofectamine; Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante, em cada uma das seguintes condições: *MB-COMT*, *(T)MB-COMT_comum*, *(T)MB-COMT_raro*, *(T)MB-COMT_rs165985C*, *MB-COMT + (T)MB-COMT_comum* (chamaremos de *MB-Cotransfectadas*), *S-COMT*, *(T)S-COMT_comum*, *(T)S-COMT_raro*, *(T)S-COMT_rs165985C*, *S-COMT+(T)S-COMT_comum* (chamaremos de *S-Cotransfectadas*).

A transfecção de cada uma das condições foi realizada em dois poços diferentes, sendo que a primeira coleção de células foi destinada ao isolamento de RNA, e a segunda, à lise celular para extração de proteínas. Como controle, utilizamos vetores *pCMV-sport6* vazios e células não-transfectadas. Três transfecções independentes foram realizadas.

Após 36 horas de cada transfecção, a coleção de células destinada ao isolamento de RNA foi coletada em tubos de plástico (1,75ml) livres de RNases e DNases com 1ml de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e mantidas congeladas (-80°C). Para o isolamento do RNA, 200µl de clorofórmio foram adicionados a cada tubo, que foram, em seguida vortexados e centrifugados (12.000g, 15min, 4°C). A fase aquosa da solução foi transferida para novos tubos, e o RNA foi lavado e precipitado numa sequência de centrifugação com isopropanol, e etanol 75% (12.000g, 10min, 4°C), e ressuspensão em água.

O RNA isolado foi tratado com *RNase free-DNase I* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez tratado, foi submetido à ação da enzima transcriptase reversa para obtenção de cDNA, seguindo as orientações do fabricante (*Superscript III*; Invitrogen). A fim de garantir a qualidade dos nossos resultados, foi sempre mantido um controle negativo para cada coleção de cDNA, que não recebeu foi submetido à ação da enzima.

O cDNA produzido foi submetidas ao RT-PCR em triplicata (7900HT Fast Real-Time PCR, Applied Biosystems Inc.) para análise da expressão relativa das diferentes isoformas, utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.) e os primers *forward e reverse* (TCGTGGACGCCGTGATTCAGG e AGGTCTGACAACGGGTCAGGC, respectivamente) para detecção da COMT total. As taxas de transcrição encontradas foram normalizadas em função do produto da expressão de um gene controle, o GAPDH (primer *forward*: TGAACGTGGGCGACAAGAAAGGCAAGAT; primer *reverse*: TGACCTTGTCCTTCACGCCAGCGAAAT).

Para a caracterização da atividade enzimática, utilizamos a segunda coleção de células de cada condição para obter os lisados celulares. As células transfectadas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato, coletadas em 200µl de solução tampão (Tris ph 8.0, MgCl₂ 50mM e DTT 10mM) em tubos de plástico de 1,75ml, e imediatamente congeladas para lise celular. Em seguida, foram descongeladas e centrifugadas (13.000g, 10min, 4°C) a fim de se eliminar os debris celulares, e o sobrenadante foi transferido para novos tubos de plástico. Em seguida, a concentração de proteínas nos diferentes lisados celulares foi determinada através do ensaio de BCA (Pierce, Milwaukee, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Por fim, realizamos o ensaio de atividade enzimática utilizando um catecol base como substrato, o DHBA, de acordo com o previamente descrito por Reenila *et al.* (Reenila *et al.*, 1995). Brevemente, 20µg de proteínas são incubadas em 250µl de solução tampão contendo DHBA (Na₂HPO₄ 100mM, MgCl₂ 20mM, SAM 20mM, e DHBA 10mM) a 37°C, por 30 minutos. Para paralisar a reação, são adicionados 25µl de ácido perclórico 4M à reação, que é então centrifugada (13.000g, 15min, 4°C), e o sobrenadante é coletado por filtragem em um novo tubo de plástico. Após a filtragem, nossas amostras foram congeladas (-80°C) e, em seguida, despachadas em gelo seco para o laboratório do Dr. Reenila, em Helsinki/Finlândia, onde foram submetidas à cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) para detecção dos metabólitos. Os resultados obtidos, em picomol/minuto/mg de proteína, foram normalizados para quantidades iguais de mRNA.

A expressão relativa e a atividade enzimática obtidas a partir de cada uma das condições foram comparadas e analisadas estatisticamente utilizando ANOVA unidirecional e pós-teste para comparações múltiplas de Tukey, considerando-se 0.05 como o nível de significância (*GraphPad Prism*, versão 4.0).

5 RESULTADOS

5.1 Estudo de associação

A Tabela 1 abaixo traz os resultados dos testes de associação obtidos no coorte “COMT”. Existe forte efeito protetor do alelo *rs165774A* sobre o fenótipo de DTM ($p=0.0053$, $0.4 < CI < 0.85$, STAT: -2.79), porém, nenhum efeito foi observado sobre os fenótipos intermediários.

Tabela 1 – Resultado da associação entre o SNP *rs165774* (G>A) e os diferentes fenótipos investigados no coorte “COMT”.

FENÓTIPOS		-	Número de indivíduos	A1	STAT	P
DTM		-	105	A	-2.79	0.005263
z-scores Dor experimental	INTERMEDIÁRIOS (unidade de medida)	Média (DP)	Número de indivíduos	A1	STAT	P
	L-Pressão (kPa)	205.9 (250.4)	356	A	-0.1566	0.8756
	L-Calor (END)	20.5 (20.1)	384	A	-0.1091	0.9131
	T-Calor (END)	30.6 (24.1)	384	A	0.6619	0.5084
	L-Isquêmica (min)	4.3 (6.3)	383	A	-0.3521	0.7249
	T-Isquêmica (min)	6.9 (5.3)	383	A	-0.1503	0.8806

Abreviações: A1, alelo raro; STAT, coeficiente de regressão; P, valor de p do teste de regressão logística/linear; L, limiar; T, tolerância; kPa, kilo-Pascal; END, escala numérica de dor; min, minutos; DP, desvio padrão.

A Tabela 2 traz os resultados dos testes de associação obtidos no coorte OPPERA. Os resultados não mostraram associação entre o alelo rs165774A e DTM, porém, múltiplos fenótipos intermediários mostraram-se associados, de forma que o referido alelo sempre apareceu protegendo contra a dor.

Tabela 2 – Resultado da associação entre o SNP rs165774 (G>A) e os diferentes fenótipos investigados no coorte OPPERA.

FENÓTIPOS		-	Número de indivíduos	A1	STAT	P
DTM		-	106	A	NA	NA
<i>z-scores</i> Dor experimental	INTERMEDIÁRIOS (unidade de medida)	Média (DP)	Número de indivíduos	A1	STAT	P
	L-Pressão (kPa)	267.7 (141.7)	969	A	1.867	0.0622
	UE-Mecânica (END)	12.9 (17.1)	969	A	-2.186	0.02907
	STE-Mecânica (END)	13.5 (15.1)	969	A	-0.6911	0.4897
	STA-Mecânica (END)	4.5 (10.9)	969	A	-2.833	0.004705
	STE-Calor (END)	46.3 (33.2)	969	A	-1.825	0.06828
	STA-Calor (END)	10.1 (16.5)	969	A	-2.487	0.01304

Abreviações: A1, alelo raro; STAT, coeficiente de regressão; P, valor de p do teste de regressão logística/linear; L, limiar; UE, único estímulo; STE, somação temporal, STA, sensação tardia; kPa, kilo-Pascal; END, escala numérica de dor; DP, desvio padrão.

5.2 Expressão da COMT em diferentes tecidos e células

A Figura 1 abaixo ilustra os níveis de expressão relativa das isoformas convencional e truncada da enzima COMT.

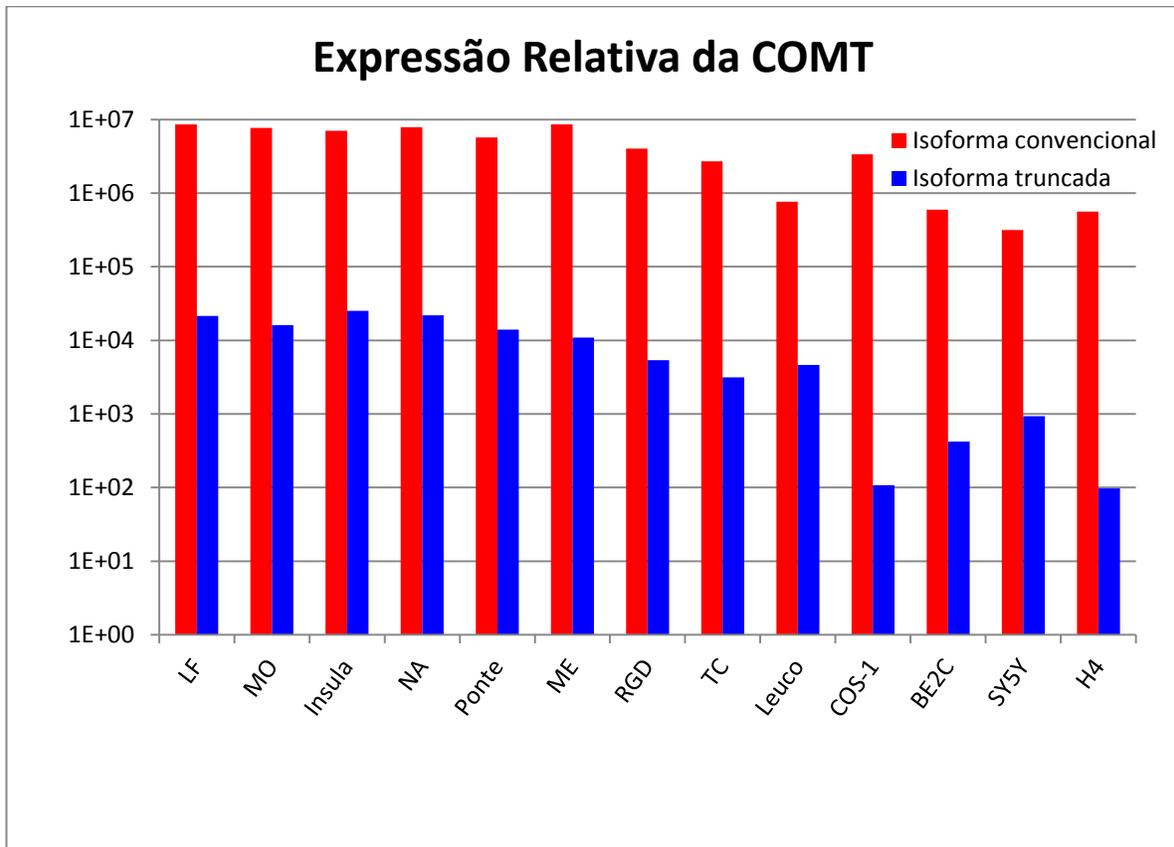


Figura 6 – Expressão relativa das isoformas convencional e truncada da enzima COMT em diferentes tecidos humanos e sistemas celulares (FL-lobo frontal; MO-medula oblongata; Insula; NA-núcleo acumbens; Ponte; ME-medula espinhal; RGD-raiz do gânglio dorsal; TC-tecido conjuntivo; Leuc-leucócitos; e os sistemas celulares COS-1, Be2C, SY5Y, e H4).

5.3 Previsão da estrutura cristalina da isoforma truncada

A Figura 2 abaixo ilustra a estrutura cristalina prevista para a *(T)S-COMT*.

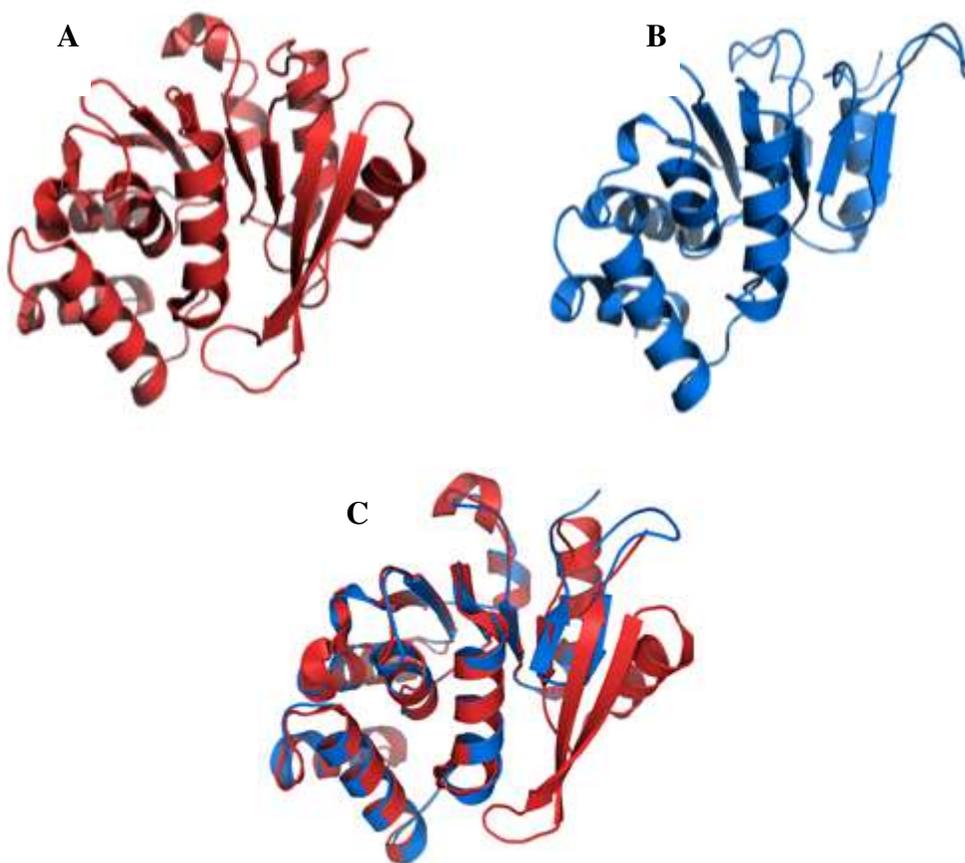


Figura 2– Estruturas cristalinas previstas por simulação dinâmico-moleculares discretas (DMD) para *S-COMT* (A, em vermelho) e *(T)S-COMT* (B, em azul), e sobreposição entre as duas estruturas (C).

A Figura 3 ilustra em maiores detalhes a relação espacial dos resíduos importantes para a ligação da enzima ao substrato e ao cofator enzimático (SAM) para as estruturas cristalinas da *S-COMT* e (*T*)*S-COMT*. Os resíduos **Glu202** e **Arg201** formam a porção externa do bolso enzimático; **Met40**, **Tyr200**, **Leu198**, **Trp38**, e **Pro174** definem a “parede” hidrofóbica; e **Glu199** atua como *gatekeeper*.

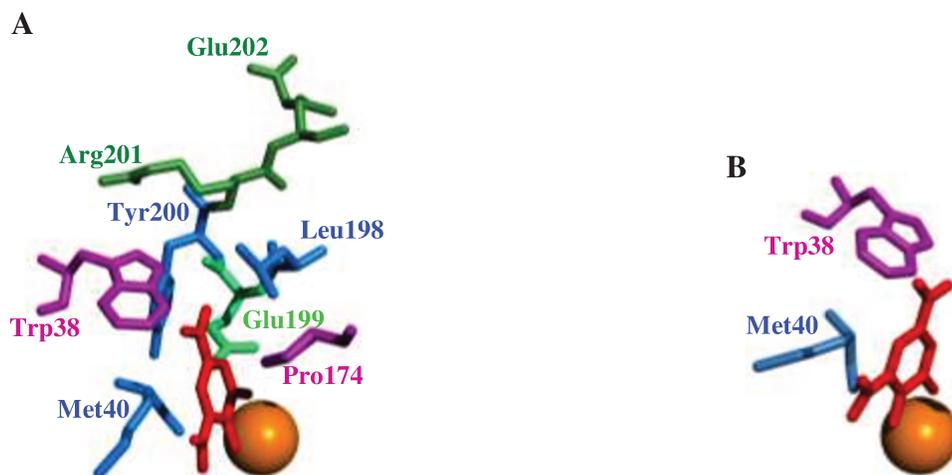


Figura 3 – Em detalhe, é possível observar que muitos resíduos essenciais para a ligação ao substrato (em vermelho) e ao cofator enzimático (em laranja) estão ausentes na estrutura prevista para a (*T*)*S-COMT* (B).

4 Expressão dos clones e mutantes e caracterização da isoforma truncada

Tabela 3 – Comparação do número de cópias de mRNA totais da COMT expresso pelos diferentes clones das isoformas ligadas à membrana (MB).

ISOFORMAS	NÚMERO DE CÓPIAS				Teste de Tukey			
	1	2	3	Média*	MB-COMT	(T)MB-COMT _comum	(T)MB-COMT _raro	(T)MB-COMT _rs165895C
MB-COMT	282,330,685	241,162,291	270,071,366	264,521,447	-	-	-	-
(T)MB-COMT _comum	202,177,590	195,615,282	189,052,974	195,615,282	<.05	-	-	-
(T)MB-COMT _raro	92,876,330	84,412,341	93,726,603	90,338,425	<.001	<.01	-	-
(T)MB-COMT _rs165895C	71,367,530	68,382,060	88,905,340	76,218,310	<.001	<.001	>.05	-
MB- Cotransfectadas	192,964,947	211,174,704	201,240,822	201,793,491	>.05	>.05	<.01	<.001
E.V.	1,149,287	859,308	3,102,317	1,703,637	-	-	-	-

*ANOVA, $p < 0.0001$, análise de variância testando a hipótese nula de igualdade das médias entre as diferentes condições.

Figura 4 – Gráfico das médias e desvios-padrão do número de cópias de mRNA totais da COMT expresso pelos diferentes clones das isoformas ligadas à membrana (MB).

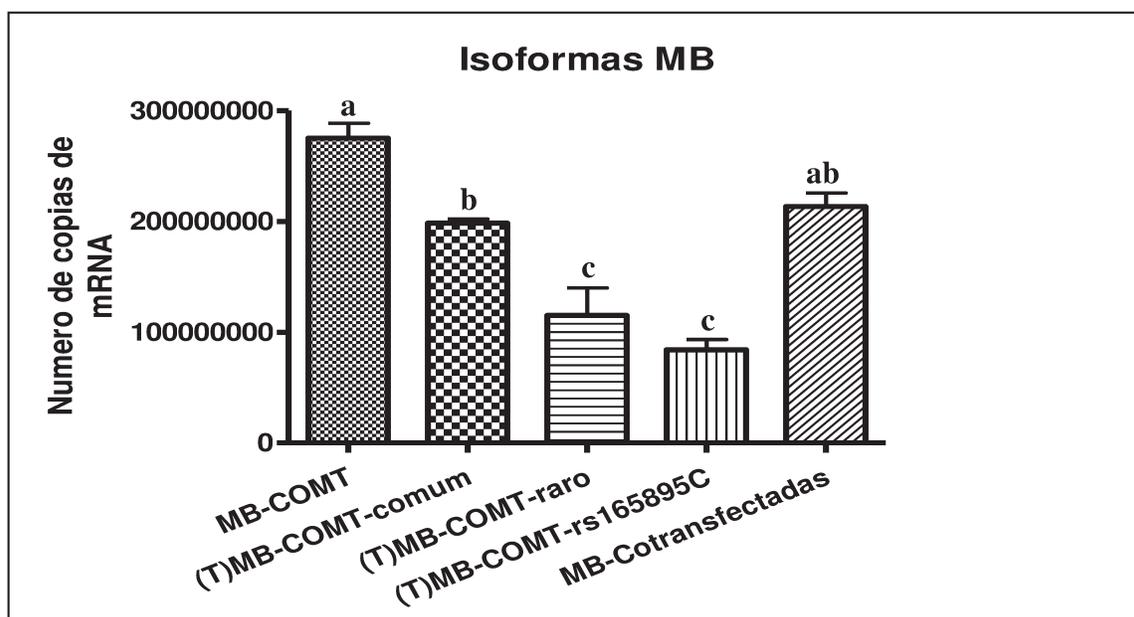


Tabela 4 – Comparação do nível de atividade enzimática da COMT resultante da expressão dos diferentes clones das isoformas ligadas à membrana (MB).

ISOFORMAS	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (pmol/min/mg prot.)				Teste de Tukey Valor de $p < \text{ou} > 0.$			
	1	2	3	Média*	MB-COMT	(T)MB-COMT _comum	(T)MB-COMT _raro	(T)MB-COMT _rs165895C
MB-COMT	26.31	75.34	45.36	49.00	-	-	-	-
(T)MB-COMT _comum	6.6	4.32	4.22	5.05	<.01	-	-	-
(T)MB-COMT _raro	9.51	7.83	7.51	8.28	<.05	>.05	-	-
(T)MB-COMT _rs165895C	10.92	6.53	8.38	8.61	<.05	>.05	>.05	-
MB- Cotransfectadas	75.02	50.69	63.83	63.18	>.05	<.01	<.01	<.01
E.V.	0.14	0.22	0.097	0.15	-	-	-	-

*ANOVA, $p=0.0004$, análise de variância testando a hipótese nula de igualdade das médias entre as diferentes condições.

Figura 5 – Gráfico das médias e desvios-padrão do nível de atividade enzimática da COMT resultante da expressão dos diferentes clones das isoformas ligadas à membrana (MB).

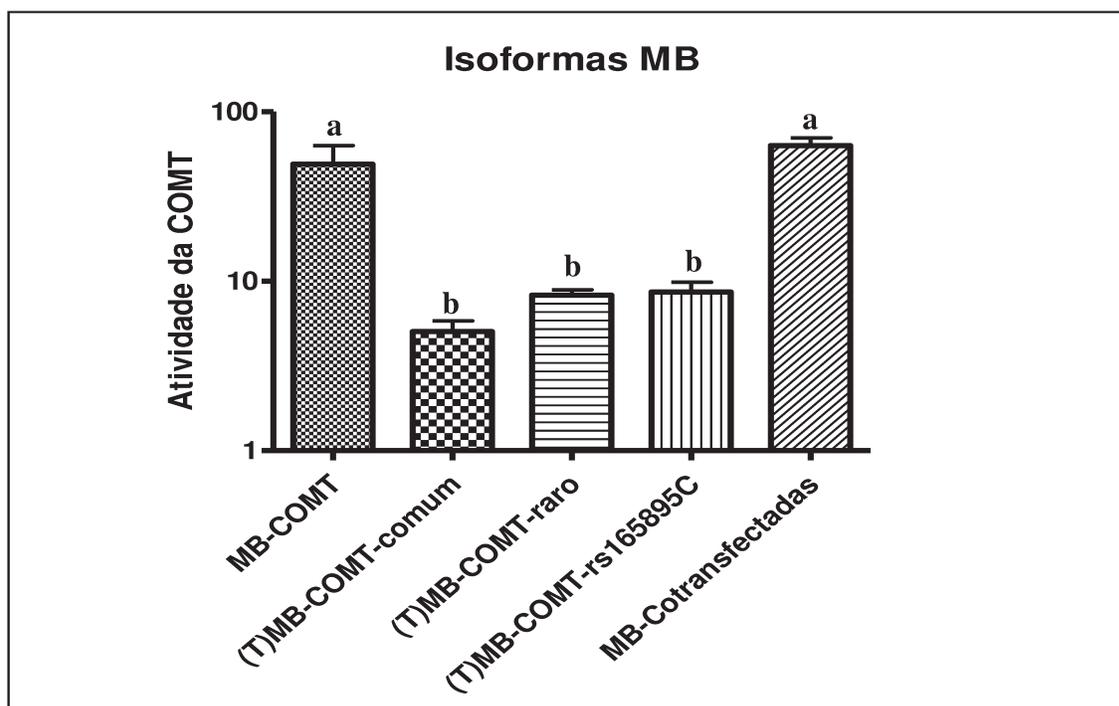


Tabela 5 – Comparação do número de cópias de mRNA totais da COMT expresso pelos diferentes clones das isoformas solúveis (S).

ISOFORMAS	NÚMERO DE CÓPIAS				Teste de Tukey			
	1	2	3	Média*	S-COMT	(T)S-COMT _comum	(T)S-COMT _raro	(T)S-COMT _rs165895C
S-COMT	202,801,100	200,731,900	230,448,300	211,327,100	-	-	-	-
(T)S-COMT _comum	103,815,400	111,419,900	124,259,300	113,164,867	<.001	-	-	-
(T)S-COMT _raro	91,641,210	86,421,080	97,562,290	91,874,860	<.001	>.05	-	-
(T)S-COMT _rs165895C	91,559,250	10,313,260	59,237,560	53,703,357	<.001	<.01	>.05	-
S- Cotransfectadas	173,041,700	162,673,900	191,782,000	175,832,533	>.05	<.001	<.001	<.001
E.V.	1,149,287	859,308	3,102,317	1,703,637	-	-	-	-

*ANOVA, $p < 0.0001$, análise de variância testando a hipótese nula de igualdade das médias entre as diferentes condições.

Figura 6 – Gráfico das médias e desvios-padrão do número de cópias de mRNA totais da COMT expresso pelos diferentes clones das isoformas solúveis (S).

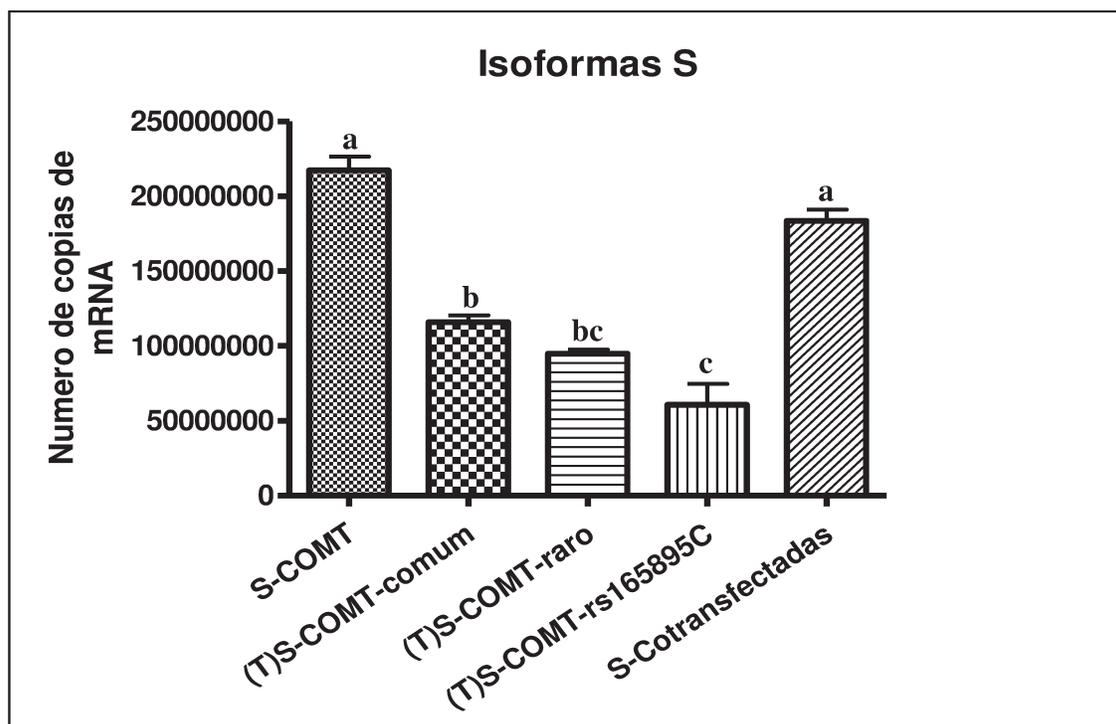
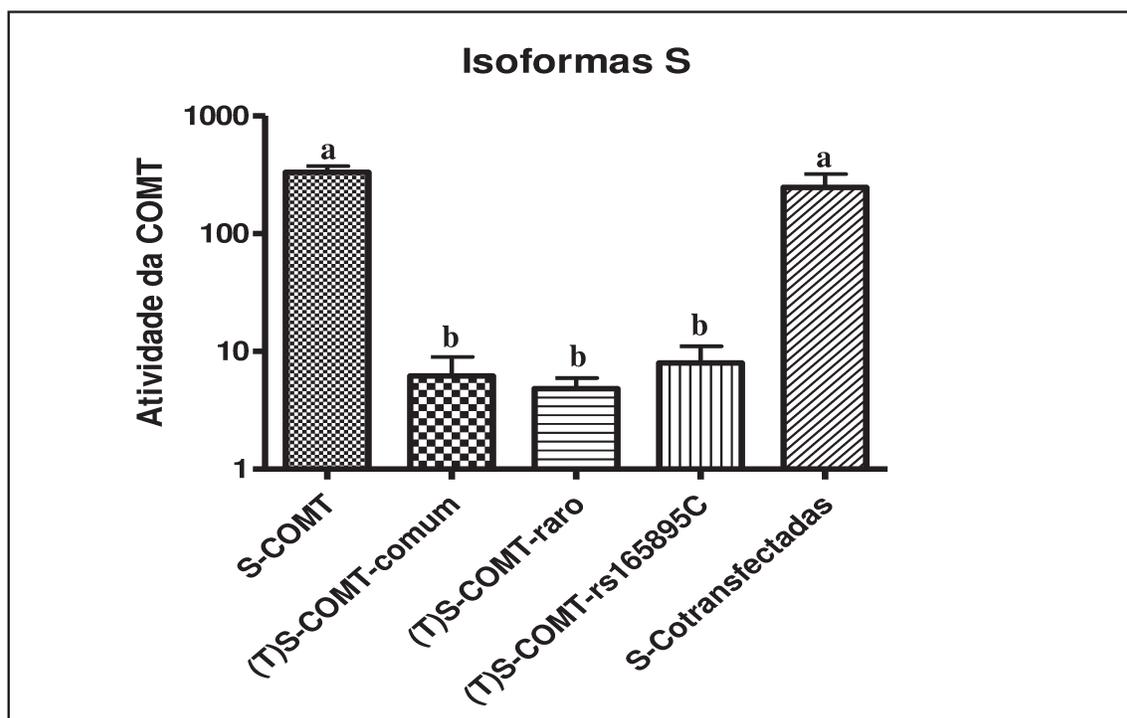


Tabela 6 – Comparação do nível de atividade enzimática da COMT resultante da expressão dos diferentes clones das isoformas solúveis (S).

ISOFORMAS	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (pmol/min/mg prot.)				Teste de Tukey Valor de $p < \text{ou} > 0.$			
	1	2	3	Média*	S-COMT	(T)S-COMT _comum	(T)S-COMT _raro	(T)S-COMT _rs165895C
S-COMT	408.1	265.94	324.97	333.00	-	-	-	-
(T)S-COMT _comum	11.7	4.31	2.51	6.17	<.001	-	-	-
(T)S-COMT _raro	6.4	5.42	2.648	4.82	<.001	>.05	-	-
(T)S-COMT _rs165895C	10	12.02	1.851	7.96	<.001	>.05	>.05	-
S- Cotransfectadas	361.4	28.07	90.983	247.71	>.05	<.01	<.01	<.01
E.V.	0.14	0.22	0.097	0.15	-	-	-	-

*ANOVA, $p=0.0002$, análise de variância testando a hipótese nula de igualdade das médias entre as diferentes condições.

Figura 7 – Gráfico das médias e desvios-padrão do nível de atividade enzimática da COMT resultante da expressão dos diferentes clones das isoformas solúveis (S).



6 DISCUSSÃO

Os resultados do nosso estudo de associação evidenciam que o alelo *rs165774A* (G>A), situado quase exclusivamente no haplótipo APS, é um forte marcador de proteção contra DTM (coorte “COMT”: $p=0.0053$, $0.4 < CI < 0.85$, STAT: -2.79), além de também mostrar efeito sobre fenótipos intermediários de dor experimental (coorte OPPERA: Tabela 2).

A importância deste achado é ainda maior se considerarmos a frequência deste alelo nas populações estudadas, que foi de aproximadamente 24% entre os indivíduos portadores de DTM e 36% entre os indivíduos do grupo controle, no coorte “COMT”; e de 30% entre os indivíduos portadores de DTM e 25% entre os indivíduos do grupo controle, no coorte OPPERA.

A não observância de associação entre o SNP *rs165774* e DTM no coorte OPPERA nos parece ser claramente devido ao pequeno número inicial de casos de DTM (106 casos x 863 controles), assim como à dissolução do efeito deste SNP em função das correções necessárias (idade e sítio de coleta), e portanto, diminuição da força estatística em identificá-lo.

De maneira similar, a falta de associação entre o referido SNP e fenótipos intermediários na coorte “COMT”, parece ser em função do pequeno número de indivíduos totais (n variando entre 356 a 384), dificultando a identificação do efeito do alelo *rs165774A* sobre esses fenótipos mais sutis.

A ausência de consequências funcionais óbvias para o SNP *rs165774* (G>A) sobre os transcritos convencionais (Chorev e Carmel, 2012), somada ao fato da já sabida existência de múltiplos mRNAs da COMT (Tunbridge *et al.*, 2007), levou-nos a especular sobre o possível efeito deste SNP sobre formas alternativas de mRNA da COMT.

De fato, identificamos que o SNP *rs165774* (G>A) se localiza na região 3’UTR de um mRNA alternativo da COMT (CR616943) gerado por retenção de íntron e originalmente isolado a partir do cérebro de feto humano (Li *et al.*, 1994), que difere dos

transcritos convencionais na sua região 3' por incluir parte do que corresponderia ao íntron 5 e excluir a porção codificante do éxon 6. Neste estudo, mostramos que este transcrito alternativo também está presente em diferentes tecidos humanos adultos e sistemas celulares, ainda que sua expressão relativa seja consideravelmente menor (Figura 1).

Regiões 3'UTR são sequências não codificantes que fazem parte do mRNA maduro e que se iniciam a partir do códon de parada da transcrição. Estas regiões são críticas para o término da transcrição, para a exportação do mRNA do núcleo celular, e têm impacto significativo sobre a estabilidade e regulação do transcrito, e sua tradução no citoplasma (Nackley *et al.*, 2006). A contribuição de mutações nesta região para doenças humanas já é conhecida há algum tempo, e o reconhecimento de que podem afetar um grande número delas é cada vez maior (Neilson e Sandberg, 2010).

Em função disso, investigamos a região 3'UTR deste transcrito alternativo da COMT, e identificamos um segundo SNP a cerca de 400pb do primeiro – rs165895 (T>C) – localizado em uma região *Alu* de repetição de DNA. Estas regiões pertencem a uma classe de elementos chamados de sequências de repetição dispersas curtas (SINE, do inglês *short interspersed elements*) que podem ter amplo impacto sobre a expressão gênica (Deininger, 2011), mas que por se tratarem de sequências altamente repetidas ao longo do genoma humano, têm a sua genotipagem tecnicamente inviabilizada.

Com base na associação entre o SNP rs165774 e DTM e fenótipos intermediários de dor, e no possível impacto do SNP rs165895 sobre a biologia deste transcrito alternativo da COMT, consideramos importante investigar os possíveis efeitos funcionais de ambos os SNPs sobre esta forma alternativa de mRNA da COMT.

Este mRNA alternativo, por sua vez, codifica para uma enzima truncada, com região C-terminal reduzida e única em relação às isoformas convencionais (Figura 2C). A determinação prévia da estrutura cristalina da isoforma convencional da S-COMT (Vidgren *et al.*, 1994), mostrou que existem dois resíduos essenciais para a afinidade de ligação ao substrato – *Trp38* e *Pro174* (Lotta *et al.*, 1995). Os resultados da nossa análise da sequência de aminoácidos da isoforma truncada mostraram que a (T)S-COMT não carrega uma série

resíduos importantes, sendo que apenas os resíduos *Trp38* e *Met40* estão mantidos (Figura 3A, e B), sendo este último importante para a orientação do cofator enzimático SAM em relação ao substrato (Vidgren *et al.*, 1994).

Os resultados do nosso ensaio *in silico* mostraram que os resíduos adicionais não participam diretamente no sítio ativo da enzima e servem para completar o *Rossmann fold*, enovelamento típico de enzimas que se ligam a nucleotídeos, caracterizado por um domínio central na forma α/β (Vidgren *et al.*, 1994), formando, portanto, o que também pode compreender um bolso enzimático (Figura 2C).

Em virtude disso, perguntamo-nos se as isoformas truncadas da enzima COMT exibiriam alguma atividade enzimática, se competiriam com a isoforma convencional por substrato, e em caso positivo, se esta atividade enzimática estaria submetida a alguma forma de regulação, em nível transcricional, associada aos SNPs localizados na região 3'UTR deste transcrito alternativo da COMT.

Surpreendentemente, nossos ensaios *in vitro* de atividade enzimática utilizando um catecol básico com substrato, o ácido dihidroxibenzóico (DHBA), mostraram que as isoformas truncadas da COMT são capazes de metilar o substrato, ainda que de maneira significativamente menos eficiente do que suas correspondentes isoformas convencionais, como seria de se esperar (Figuras 5 e 7).

Mostraram também, que não há evidências iniciais de competição por substrato pelas correspondentes isoformas convencional e truncada da enzima, uma vez que a cotransfecção não afetou a eficiência da atividade enzimática (Figuras 5 e 7).

O fato de que as isoformas truncadas da enzima exibiram atividade enzimática, ao contrário do que esperávamos após a previsão da sua estrutura cristalina, nos permite vislumbrar se esta isoforma truncada da enzima exibirá diferentes afinidades por diferentes substratos. A modelagem de diferentes substratos da COMT já mostrou que a ligação da enzima ao anel catecol é idêntica para os diferentes substratos, sendo as diferentes afinidades explicadas pela interação entre a cadeia lateral do substrato e os resíduos

componentes do bolso enzimático (Lotta *et al.*, 1995). Será interessante investigar no futuro, portanto, a atividade enzimática desta isoforma truncada da enzima sobre diferentes catecolaminas.

O que fica claro a partir dos nossos resultados, é que os SNPs rs165774 e rs165895 parecem exercer efeitos sobre a estabilidade da estrutura deste mRNA alternativo da COMT, uma vez que não há diferença sobre a atividade enzimática normalizada, mas sim na expressão relativa dos seus diferentes mutantes (Figuras 4 e 6), o que, por sua vez, afetará a atividade geral da enzima.

A fim de esclarecer os efeitos funcionais destes SNPs sobre o transcrito alternativo da COMT, e em virtude de não ser possível a associação direta do SNP rs165895 à qualquer que seja o fenótipo, nós criamos diferentes variações do clone original deste transcrito.

Entre os três clones estudados, a expressão relativa das variantes carregando os alelos comuns [(*T*)*MB-COMT*_ e (*T*)*S-COMT*_ *comum*: rs165774G e rs165895T] foi sempre estatisticamente maior do que a expressão das variantes (*T*)*MB-COMT*_ e (*T*)*S-COMT*_ *rs165895C* (rs165774G e rs165895C; $p < 0.001$ e $p < 0.01$, respectivamente), indicando que o alelo *rs165895C* tem impacto significativo sobre a estabilidade deste transcrito.

O que é interessante observar é o efeito do alelo rs165774A sobre a estabilidade do transcrito. As variantes (*T*)*MB-COMT*_ e (*T*)*S-COMT*_ *raro* (rs165774A e rs165895C) exibiram expressão relativa sempre numericamente – porém não estatisticamente – maior que os clones (*T*)*MB-COMT*_ e (*T*)*S-COMT*_ *rs165895C*, sendo que o clone (*T*)*S-COMT*_ *raro* chegou a não diferir estatisticamente do clone (*T*)*S-COMT*_ *comum*, sugerindo que o alelo *rs165774A* tem efeito compensatório sobre o transcrito, buscando restaurar a estabilidade perdida pela presença do alelo *rs165895C*.

Esta hipótese é reforçada pelo fato de que esta forma alternativa de mRNA da COMT, isolada a partir do cérebro de feto humano, originalmente carregava os alelos

rs165774G (comum) e *rs165895C* (raro), o que pode indicar a ausência de desequilíbrio de ligação entre os dois alelos – apesar do que seria esperado para dois alelos em regiões tão próximas de DNA (Gabriel *et al.*, 2002) –, mas é condizente com a teoria de que o alelo *rs165774A* (raro) seria, então, uma mutação compensatória na tentativa de restabelecer a estabilidade original do transcrito.

Do ponto de vista evolutivo, também é possível compreender porque a combinação entre alelos com efeito aparentemente deletério teria sido mantida na população, e em uma frequência que parece ser consideravelmente alta. A frequência do alelo *rs165774A*, que foi de 36% e 41% nas populações aqui estudadas, pode significar que a frequência do alelo *rs165774G*, e provavelmente da combinação *rs165774G/rs165895C*, varia em torno de 59-64% nesta mesma população.

Uma vez que a COMT tem funções biológicas que vão muito além de apenas modular o processamento da dor (Andersen e Skorpen, 2009), esta combinação de genótipos não é apenas deletéria, mas se encaixa perfeitamente na teoria de “*guerreiros x preocupados*” (“*warriors x worriers*”) proposta em 2006 para explicar o papel das variações genéticas no gene da COMT (Stein *et al.*, 2006). Esta teoria propõe que indivíduos exibindo maiores níveis de atividade da COMT teriam vantagem no processamento de estímulos aversivos, como a dor (*guerreiros*), enquanto aqueles exibindo menores níveis de atividade da enzima teriam vantagem na execução de tarefas cognitivas, como a memória e a atenção (*preocupados*). Assim sendo, é perfeitamente plausível compreender porque ambas as combinações de genótipos teriam sido evolutivamente mantidas em frequências altas na população, já que proporcionam vantagens em diferentes processos e/ou comportamentos humanos.

O resultado encontrado no nosso estudo de associação vem senão confirmar esta teoria, uma vez que o alelo *rs165774A* – que parece restabelecer a estabilidade do transcrito – mostrou forte efeito protetor contra DTM e diferentes fenótipos intermediários de dor, indo de encontro à teoria de que indivíduos capazes de metabolizar catecolaminas mais eficientemente teriam vantagem no processamento de estímulos aversivos.

Para confirmação desta hipótese, nosso próximo passo será a clonagem e sequenciamento do gene da COMT de indivíduos participantes do coorte “COMT” que carregam o alelo *rs165774A*, o que nos permitirá estimar exatamente o grau de desequilíbrio de ligação entre os alelos dos SNPs *rs165774* (G>A) e *rs165895* (T>C); e a construção dos clones *(T)MB-COMT_* e *(T)S-COMT_ rs165774A* – que carregarão os alelos *rs165774A* e *rs165895T* –, os quais deverão exibir níveis de expressão relativa no mínimo iguais aos clones *(T)MB-COMT_* e *(T)S-COMT_ comum*, e superiores aos clones *(T)MB-COMT_* e *(T)S-COMT_ raro*, e *(T)MB-COMT_* e *(T)S-COMT_ rs165895C*.

Caso esta hipótese não se confirme, ficará claro que o alelo *rs165774A* está atuando apenas como um marcador para o SNP funcional *rs165895*, ou ainda, para outro SNP funcional ainda não identificado.

É possível supor algumas maneiras através das quais o SNP *rs165895* pode afetar a estabilidade do mRNA alternativo da COMT investigado neste estudo. A primeira delas é através da alteração na interação da estrutura secundária do dúplex de miRNA e mRNA. A região do transcrito na qual este SNP se insere, é alvo putativo de 3 miRNAs humanos conhecidos – *hsa-miR-199b-5p*, *-1304*, e *-548s* (Huang *et al.*, 2006) – e, portanto, a substituição do alelo *rs165895T* pelo alelo *rs165895C* pode ter impacto sobre a energia livre mínima do dúplex, favorecendo a sua degradação. Para esclarecer esta hipótese, conduziremos ensaios nos quais células serão cotransfectadas com o transcrito alternativo da COMT e os diferentes miRNAs, a fim de verificar seu efeito sobre a expressão relativa do referido transcrito.

Outra maneira possível, é que os alelos dos SNPs *rs165895* e *rs165774* estejam afetando a estrutura secundária do mRNA em si, o que pode ter consequências funcionais sobre a taxa de degradação do transcrito e de tradução da proteína. Isto é, de forma similar ao que acontece com a forma convencional do transcrito da COMT (Nackley *et al.*, 2006), pode ser que a combinação entre os diferentes alelos dos SNPs em questão atuem aumentando ou diminuindo esta estabilidade. Nossos resultados indicam que a estrutura secundária do transcrito carregando o alelo *rs165895C* é menos estável que a do transcrito

carregando o alelo *rs165895T*, e poderão ser confirmados construindo-se todos os transcritos *in silico* e predizendo ao sua energia livre mínima, assim como *in vitro*, expressando-se os transcritos em culturas de células e verificando a taxa de tradução da proteína.

Com base nisso, é possível sugerir que a maneira mais óbvia através da qual o alelo *rs165895C* está contribuindo para o fenótipo de dor, é em função da reduzida estabilidade de seu transcrito, afetando a produção da proteína. Isto é, quanto menos estável o transcrito, menor a taxa de tradução de proteína a partir dele, menos atividade enzimática (Nackley *et al.*, 2006), e portanto, maior disponibilidade de neurotransmissores adrenérgicos na fenda sináptica, contribuindo para a transmissão e processamento da dor (Nackley *et al.*, 2007).

Porém, a relação entre a atividade da COMT e seus efeitos sistêmicos, com ênfase na modulação da dor, não é apenas tão direta. Por exemplo, os efeitos dos diferentes substratos da COMT, como a dopamina, adrenalina, e noradrenalina, depende – dentre outros fatores – da sua localização, ou seja, se central ou periférica, e mais especificamente, em que região do cérebro ela está sendo expressa (Argoff, 2011; Jarcho *et al.*, 2012; Segall *et al.*, 2012).

Além disso, também é possível que, em função da sua região C-terminal única e distinta da isoforma convencional da COMT, a isoforma truncada da enzima exiba diferentes afinidades aos substratos, o que tornaria seus efeitos ainda mais específicos.

Assim, mais detalhes a respeito do completo efeito funcional do SNP *rs165895*, e do mRNA alternativo da COMT em si, sobre os fenótipo de dor, poderão ser esclarecidos uma vez conhecida a sua expressão sítio-específica e afinidade por diferentes substratos.

Em suma, este trabalho mostrou, pela primeira vez, a existência de uma isoforma alternativa de mRNA da COMT, que exibe estrutura única e atividade enzimática. Além disso, identificou dois SNPs na sua região 3'UTR – *rs165774* (G>A) e *rs165895*

(T>C) –, sendo que o primeiro está associado a DTM e fenótipos intermediários de dor e parece ser funcional, enquanto o segundo provou ser funcional.

Por fim, o melhor entendimento da função e efeitos deste transcrito alternativo da COMT e de suas variações genéticas, respectivamente, possibilitará o melhor entendimento da fisiopatologia de condições crônicas de dor humana, como a DTM – permitindo o desenvolvimento de um novo alvo para drogas –, além de firmar a identificação de um novo marcador genético – que, em primeira instância, identifica um novo subgrupo de pacientes com DTM que provavelmente se beneficiarão pelo tratamento com propranolol.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho permite concluir (i) que o SNP rs165774 é um forte marcador genético para as disfunções temporomandibulares; (ii) que este SNP, juntamente com o SNP rs165895, localizam-se na região 3' não traduzida de uma isoforma alternativa de mRNA da COMT que, pela primeira vez, provou ser capaz de codificar para uma isoforma alternativa da enzima que exibe atividade enzimática; e (iii) que esta isoforma alternativa de mRNA da COMT sofre efeitos regulatórios em nível transcricional causados pelo SNP rs165895, e provavelmente, também pelo SNP rs165774.

REFERÊNCIAS*

Abubaker AO, Raslan WF, Sotereanos GC. Estrogen and progesterone receptors in temporomandibular joint discs of symptomatic and asymptomatic persons: a preliminary study. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 1993;51:1096-100.

Andersen HC. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *Journal of Chemical Physics*. 1980;72:2384-94.

Andersen S, Skorpen F. Variation in the COMT gene: implications for pain perception and pain treatment. *Pharmacogenomics*. 2009;10(4):669-84.

Argoff C. Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management. *Current medical research and opinion*. 2011 Oct;27(10):2019-31. PubMed PMID: 21916528.

Armero P, Muriel C, Santos J, Sanchez-Montero FJ, Rodriguez RE, Gonzalez-Sarmiento R. COMT (Val158Met) polymorphism is not associated to neuropathic pain in a Spanish population. *European journal of pain*. 2005 Jun;9(3):229-32. PubMed PMID: 15862471.

Arnold LM, Lu Y, Crofford LJ, Wohlreich M, Detke MJ, Iyengar S, *et al*. A double-blind, multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients with or without major depressive disorder. *Arthritis and rheumatism*. 2004 Sep;50(9):2974-84. PubMed PMID: 15457467.

Arnold LM, Rosen A, Pritchett YL, D'Souza DN, Goldstein DJ, Iyengar S, *et al*. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of duloxetine in the treatment of women with fibromyalgia with or without major depressive disorder. *Pain*. 2005 Dec 15;119(1-3):5-15. PubMed PMID: 16298061.

Axelrod J. O-methylation of epinephrine and other catechols in vitro and in vivo. *Science*. 1957;126(3270):400-1.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Axelrod J, Senoh S, Witkop B. O-Methylation of Catechol Amines in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 1958;233:697-701.

Axelrod J, Tomchick R. Enzymatic O-Methylation of Epinephrine and Other Catechols *Journal of Biological Chemistry*. 1958;233(702-705).

Barbosa FR, Matsuda JB, Mazucato M, de Castro Franca S, Zingaretti SM, da Silva LM, *et al*. Influence of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms in pain sensibility of Brazilian fibromyalgia patients. *Rheumatology international*. 2012 Feb;32(2):427-30. PubMed PMID: 21120493.

Belfer I, Buzas B, Evans C, Hipp H, Phillips G, Taubman J, *et al*. Haplotype structure of the beta adrenergic receptor genes in US Caucasians and African Americans. *European journal of human genetics : EJHG*. 2005 Mar;13(3):341-51. PubMed PMID: 15523499.

Bertocci B, Garotta G, Prada M, Lahm HW, G. Z, Virgallita G, *et al*. Immunoaffinity purification and partial amino acid sequence analysis of catechol-O-methyltransferase from pig liver. *Biochimica et biophysica acta*. 1991;1080:103-9.

Bhalang K, Light K, Maixner W. Effect of propranolol on TMD and fibromyalgia pain: preliminary findings. *The IADR/AADR/CADR 82nd General Session; Hawaii2004*.

Birklein F, Depmeier C, Rolke R, Hansen C, Rautenstrauss B, Prawitt D, *et al*. A family-based investigation of cold pain tolerance. *Pain*. 2008 Aug 15;138(1):111-8. PubMed PMID: 18194840.

Boudilkova B, Szumlanski C, Maidak B, Weinshilboum R. Human liver catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 1990;48(4):381-9.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Bruehl S, Chung OY. Interactions between the cardiovascular and pain regulatory systems: an updated review of mechanisms and possible alterations in chronic pain. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2004 Jul;28(4):395-414. PubMed PMID: 15341037.

Chorev M, Carmel L. The function of introns. *Frontiers in genetics*. 2012;3:55. PubMed PMID: 22518112. Pubmed Central PMCID: 3325483.

Clauw DJ, Mease P, Palmer RH, Gendreau RM, Wang Y. Milnacipran for the treatment of fibromyalgia in adults: a 15-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose clinical trial. *Clinical therapeutics*. 2008 Nov;30(11):1988-2004. PubMed PMID: 19108787.

Cohen H, Neumann L, Glazer Y, Ebstein RP, Buskila D. The relationship between a common catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism val(158) met and fibromyalgia. *Clinical and experimental rheumatology*. 2009 Sep-Oct;27(5 Suppl 56):S51-6. PubMed PMID: 20074440.

Collier DA, Arranz MJ, Li T, Mupita D, Brown N, Treasure J. Association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and anorexia nervosa. *Lancet*. 1997 Aug 9;350(9075):412. PubMed PMID: 9259661.

Dai F, Belfer I, Schwartz CE, Banco R, Martha JF, Tighioughart H, *et al*. Association of catechol-O-methyltransferase genetic variants with outcome in patients undergoing surgical treatment for lumbar degenerative disc disease. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2010 Nov;10(11):949-57. PubMed PMID: 20863768.

Dao TT, Knight K, Ton-That V. Modulation of myofascial pain by the reproductive hormones: a preliminary report. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1998 Jun;79(6):663-70. PubMed PMID: 9627895.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Deininger P. Alu elements: know the SINEs. *Genome biology*. 2011;12(12):236. PubMed PMID: 22204421. Pubmed Central PMCID: 3334610.

Derijk RH. Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(5):340-52. PubMed PMID: 19571595.

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. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2006 Jul 5;141B(5):449-62. PubMed PMID: 16741943. Pubmed Central PMCID: 2570772.

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*. 2006 Dec 5;125(3):216-24. PubMed PMID: 16837133.

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. *Human molecular genetics*. 2005 Jan 1;14(1):135-43. PubMed PMID: 15537663.

Ding F, Dokholyan NV. Emergence of protein fold families through rational design. *PLoS computational biology*. 2006 Jul 7;2(7):e85. PubMed PMID: 16839198. Pubmed Central PMCID: 1487181.

Ding F, Tsao D, Nie H, Dokholyan NV. Ab initio folding of proteins with all-atom discrete molecular dynamics. *Structure*. 2008 Jul;16(7):1010-8. PubMed PMID: 18611374. Pubmed Central PMCID: 2533517.

Dworkin SF, Huggins KH, LeResche L, Von Korff M, Howard J, Truelove E, *et al*. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

cases and controls. Journal of the American Dental Association. 1990 Mar;120(3):273-81. PubMed PMID: 2312947.

Dworkin SF, LeResche L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique. Journal of craniomandibular disorders : facial & oral pain. 1992 Fall;6(4):301-55. PubMed PMID: 1298767.

Dworkin SF, Massoth DL. Temporomandibular disorders and chronic pain: disease or illness? The Journal of prosthetic dentistry. 1994 Jul;72(1):29-38. PubMed PMID: 8083839.

Emin Erdal M, Herken H, Yilmaz M, Bayazit YA. Significance of the catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in migraine. Brain research Molecular brain research. 2001 Oct 19;94(1-2):193-6. PubMed PMID: 11597779.

Engel GL. The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. Science. 1977 Apr 8;196(4286):129-36. PubMed PMID: 847460.

Fijal B, Perlis RH, Heinloth AN, Houston JP. The association of single nucleotide polymorphisms in the catechol-O-methyltransferase gene and pain scores in female patients with major depressive disorder. The journal of pain : official journal of the American Pain Society. 2010 Sep;11(9):910-5, 5 e1-9. PubMed PMID: 20627703.

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. The journal of pain : official journal of the American Pain Society. 2011 Nov;12(11 Suppl):T46-60. PubMed PMID: 22074752. Pubmed Central PMCID: 3233685.

Finan PH, Zautra AJ, Davis MC, Lemery-Chalfant K, Covault J, Tennen H. Genetic influences on the dynamics of pain and affect in fibromyalgia. Health psychology : official

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association. 2010 Mar;29(2):134-42. PubMed PMID: 20230086. Pubmed Central PMCID: 3212833.

Finan PH, Zautra AJ, Davis MC, Lemery-Chalfant K, Covault J, Tennen H. COMT moderates the relation of daily maladaptive coping and pain in fibromyalgia. *Pain*. 2011 Feb;152(2):300-7. PubMed PMID: 21130573. Pubmed Central PMCID: 3053137.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, *et al*. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002 Jun 21;296(5576):2225-9. PubMed PMID: 12029063.

Galal N, El-Beialy WR, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Totsuka Y. Novel effect of estrogen on RANK and c-fms expression in RAW 264.7 cells. *International journal of molecular medicine*. 2007 Jul;20(1):97-101. PubMed PMID: 17549395.

Galal N, El Beialy W, Deyama Y, Yoshimura Y, Yoshikawa T, Suzuki K, *et al*. Effect of estrogen on bone resorption and inflammation in the temporomandibular joint cellular elements. *International journal of molecular medicine*. 2008 Jun;21(6):785-90. PubMed PMID: 18506373.

Gendreau RM, Thorn MD, Gendreau JF, Kranzler JD, Ribeiro S, Gracely RH, *et al*. Efficacy of milnacipran in patients with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2005 Oct;32(10):1975-85. PubMed PMID: 16206355.

George SZ, Dover GC, Wallace MR, Sack BK, Herbstman DM, Aydog E, *et al*. Biopsychosocial influence on exercise-induced delayed onset muscle soreness at the shoulder: pain catastrophizing and catechol-o-methyltransferase (COMT) diplotype predict pain ratings. *The Clinical journal of pain*. 2008 Nov-Dec;24(9):793-801. PubMed PMID: 18936597. Pubmed Central PMCID: 2669668.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

George SZ, Wallace MR, Wright TW, Moser MW, Greenfield WH, 3rd, Sack BK, *et al.* Evidence for a biopsychosocial influence on shoulder pain: pain catastrophizing and catechol-O-methyltransferase (COMT) diplotype predict clinical pain ratings. *Pain*. 2008 May;136(1-2):53-61. PubMed PMID: 17686583. Pubmed Central PMCID: 2669670.

Goldstein DJ, Weinshilboum RM, Dunnette JH, Creveling CR. Developmental patterns of catechol-O-methyltransferase in genetically different rat strains: enzymatic and immunochemical studies. *Journal of neurochemistry*. 1980 Jan;34(1):153-62. PubMed PMID: 7452232.

Goulet JP, Lavigne GJ, Lund JP. Jaw pain prevalence among French-speaking Canadians in Quebec and related symptoms of temporomandibular disorders. *J Dent Res*. 1995 Nov;74(11):1738-44. PubMed PMID: 8530734.

Greenberg BD, Tolliver TJ, Huang SJ, Li Q, Bengel D, Murphy DL. Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *American journal of medical genetics*. 1999 Feb 5;88(1):83-7. PubMed PMID: 10050973.

Greene CS, Laskin DM. Temporomandibular disorders: moving from a dentally based to a medically based model. *J Dent Res*. 2000 Oct;79(10):1736-9. PubMed PMID: 11077987.

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. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2011 Nov;12(11 Suppl):T61-74. PubMed PMID: 22074753. Pubmed Central PMCID: 3249228.

Griffiths AJF, Gellant W, Lewontin RC. Integrating genes and genomes. *Modern genetic analysis*. 2nd ed. New York: Freeman and Co.; 2002. p. 600.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Grossman MH, Emanuel BS, Budarf ML. Chromosomal Mapping of the Human Catechol-O-Methyltransferase Gene to 22q11.1-q11.2. *Genomics*. 1992;12:822-5.

Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F, Zwart JA. The association between headache and Val158Met polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: the HUNT Study. *The journal of headache and pain*. 2006 Apr;7(2):70-4. PubMed PMID: 16688411.

Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F, Zwart JA. No association between chronic musculoskeletal complaints and Val158Met polymorphism in the Catechol-O-methyltransferase gene. The HUNT study. *BMC musculoskeletal disorders*. 2006;7:40. PubMed PMID: 16674809. Pubmed Central PMCID: 1524765.

Heiberg A, Heloe B, Heiberg AN, Heloe LA, Magnus P, Berg K, *et al.* Myofascial pain dysfunction (MPD) syndrome in twins. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1980 Dec;8(8):434-6. PubMed PMID: 6942960.

Heinz A, Smolka MN. The effects of catechol O-methyltransferase genotype on brain activation elicited by affective stimuli and cognitive tasks. *Reviews in the neurosciences*. 2006;17(3):359-67. PubMed PMID: 16878403.

Herradon G, Ezquerra L, Nguyen T, Wang C, Siso A, Franklin B, *et al.* Changes in BDNF gene expression correlate with rat strain differences in neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2007 Jun 15;420(3):273-6. PubMed PMID: 17556103.

Herradon G, Ezquerra L, Nguyen T, Wang C, Siso A, Franklin B, *et al.* Noradrenergic and opioidergic alterations in neuropathy in different rat strains. *Neurosci Lett*. 2008 Jun 20;438(2):186-9. PubMed PMID: 18472331.

Hocking LJ, Smith BH, Jones GT, Reid DM, Strachan DP, Macfarlane GJ. Genetic variation in the beta2-adrenergic receptor but not catecholamine-O-methyltransferase

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

predisposes to chronic pain: results from the 1958 British Birth Cohort Study. *Pain*. 2010 Apr;149(1):143-51. PubMed PMID: 20167428.

Hong J, Shu-Leong H, Tao X, Lap-Ping Y. Distribution of catechol-O-methyltransferase expression in human central nervous system. *Neuroreport*. 1998;9:2861-4.

Hosak L. Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: a review. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists*. 2007 Jul;22(5):276-81. PubMed PMID: 17419009.

Hranilovic D, Stefulj J, Schwab S, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Jernej B, *et al*. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biological psychiatry*. 2004 Jun 1;55(11):1090-4. PubMed PMID: 15158428.

Huang HY, Chien CH, Jen KH, Huang HD. RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements. *Nucleic acids research*. 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W429-34. PubMed PMID: 16845041. Pubmed Central PMCID: 1538840.

Jakobi J, Bernateck M, Tran AT, Holm L, Volkmann L, Buers D, *et al*. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms are not associated with multisomatoform disorder in a group of German multisomatoform disorder patients and healthy controls. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2010 Jun;14(3):293-7. PubMed PMID: 20373853.

Jarcho JM, Mayer EA, Jiang ZK, Feier NA, London ED. Pain, affective symptoms, and cognitive deficits in patients with cerebral dopamine dysfunction. *Pain*. 2012 Apr;153(4):744-54. PubMed PMID: 22386471.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Jensen KB, Lonsdorf TB, Schalling M, Kosek E, Ingvar M. Increased sensitivity to thermal pain following a single opiate dose is influenced by the COMT val(158)met polymorphism. *PloS one*. 2009;4(6):e6016. PubMed PMID: 19547755. Pubmed Central PMCID: 2695541.

Jones CK, Eastwood BJ, Need AB, Shannon HE. Analgesic effects of serotonergic, noradrenergic or dual reuptake inhibitors in the carrageenan test in rats: evidence for synergism between serotonergic and noradrenergic reuptake inhibition. *Neuropharmacology*. 2006 Dec;51(7-8):1172-80. PubMed PMID: 17045620.

Kamisaka M, Yatani H, Kuboki T, Matsuka Y, Minakuchi H. Four-year longitudinal course of TMD symptoms in an adult population and the estimation of risk factors in relation to symptoms. *J Orofac Pain*. 2000 Summer;14(3):224-32. PubMed PMID: 11203757.

Kang SC, Lee DG, Choi JH, Kim ST, Kim YK, Ahn HJ. Association between estrogen receptor polymorphism and pain susceptibility in female temporomandibular joint osteoarthritis patients. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2007 May;36(5):391-4. PubMed PMID: 17391927.

Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Julkunen I, Panula P. Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1994;42(8):1079-90.

Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Panula P. Catechol-O-methyltransferase (COMT) in rat brain: immunoelectron microscopic study with an antiserum against rat recombinant COMT protein. *Neuroscience Letters*. 1995;187:57-60.

Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Panula P. Neuronal and non-neuronal catechol-O-methyltransferase in primary cultures of rat brain cells. *International Journal of Developmental Science*. 1995;13(8):825-34.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Kember RL, Fernandes C, Tunbridge EM, Liu L, Paya-Cano JL, Parsons MJ, *et al.* A B2 SINE insertion in the Comt1 gene (Comt1(B2i)) results in an overexpressing, behavior modifying allele present in classical inbred mouse strains. *Genes, brain, and behavior*. 2010 Nov;9(8):925-32. PubMed PMID: 20618449. Pubmed Central PMCID: 3037563.

Kim H, Lee H, Rowan J, Brahim J, Dionne RA. Genetic polymorphisms in monoamine neurotransmitter systems show only weak association with acute post-surgical pain in humans. *Molecular pain*. 2006;2:24. PubMed PMID: 16848906. Pubmed Central PMCID: 1543620.

Kim H, Mittal DP, Iadarola MJ, Dionne RA. Genetic predictors for acute experimental cold and heat pain sensitivity in humans. *Journal of medical genetics*. 2006 Aug;43(8):e40. PubMed PMID: 16882734. Pubmed Central PMCID: 2564596.

Klasser GD, Greene CS. The Changing Field of Temporomandibular Disorders: What Dentists Need to Know. *Journal of the Canadian Dental Association*. 2009;75(1):49-53.

Koh H, Robinson PG. Occlusal adjustment for treating and preventing temporomandibular joint disorders. *Cochrane database of systematic reviews*. 2003 (1):CD003812. PubMed PMID: 12535488.

Kolesnikov Y, Gabovits B, Levin A, Voiko E, Veske A. Combined catechol-O-methyltransferase and mu-opioid receptor gene polymorphisms affect morphine postoperative analgesia and central side effects. *Anesthesia and analgesia*. 2011 Feb;112(2):448-53. PubMed PMID: 21127283.

Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*. 1996 Jun;6(3):243-50. PubMed PMID: 8807664.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Landi N, Lombardi I, Manfredini D, Casarosa E, Biondi K, Gabbanini M, *et al.* Sexual hormone serum levels and temporomandibular disorders. A preliminary study. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2005 Feb;20(2):99-103. PubMed PMID: 15823829.

Lariviere WR, Sattar MA, Melzack R. Inflammation-susceptible Lewis rats show less sensitivity than resistant Fischer rats in the formalin inflammatory pain test and with repeated thermal testing. *Journal of neurophysiology*. 2006 May;95(5):2889-97. PubMed PMID: 16452262.

Lee TW, Yu YW, Hong CJ, Tsai SJ, Wu HC, Chen TJ. The effects of catechol-O-methyltransferase polymorphism Val158Met on functional connectivity in healthy young females: a resting EEG study. *Brain research*. 2011 Mar 4;1377:21-31. PubMed PMID: 21195697.

LeResche L, Saunders K, Von Korff MR, Barlow W, Dworkin SF. Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. *Pain*. 1997 Jan;69(1-2):153-60. PubMed PMID: 9060026.

Li WB, Gruber CE, Lin JJ, Lim R, D'Alessio JM, Jessee JA. The isolation of differentially expressed genes in fibroblast growth factor stimulated BC3H1 cells by subtractive hybridization. *BioTechniques*. 1994 Apr;16(4):722-9. PubMed PMID: 7517687.

Li Z, Mulligan MK, Wang X, Miles MF, Lu L, Williams RW. A transposon in *Comt* generates mRNA variants and causes widespread expression and behavioral differences among mice. *PloS one*. 2010;5(8):e12181. PubMed PMID: 20808911. Pubmed Central PMCID: 2923157.

Locker D, Slade G. Prevalence of symptoms associated with temporomandibular disorders in a Canadian population. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1988 Oct;16(5):310-3. PubMed PMID: 3263254.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Lotsch J, Fluhr K, Neddermayer T, Doehring A, Geisslinger G. The consequence of concomitantly present functional genetic variants for the identification of functional genotype-phenotype associations in pain. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Jan;85(1):25-30. PubMed PMID: 18548001.

Lotsch J, von Hentig N, Freynhagen R, Griessinger N, Zimmermann M, Doehring A, *et al.* Cross-sectional analysis of the influence of currently known pharmacogenetic modulators on opioid therapy in outpatient pain centers. *Pharmacogenetics and genomics.* 2009 Jun;19(6):429-36. PubMed PMID: 19514130.

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 4;34(13):4202-10. PubMed PMID: 7703232.

Lunstrom K, Salminen M, Jalanko A, Savolainen A, Ulmanen I. Cloning and Characterization of Human Placental Catechol-O-Methyltransferase cDNA. *DNA and Cell Biology.* 1991;10(3):181-9.

Macfarlane TV, Blinkhorn AS, Davies RM, Kincey J, Worthington HV. Predictors of outcome for orofacial pain in the general population: a four-year follow-up study. *J Dent Res.* 2004 Sep;83(9):712-7. PubMed PMID: 15329378.

MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999 Dec 21;96(26):15251-5. PubMed PMID: 10611371. Pubmed Central PMCID: 24806.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Magliozzi JR, Gietzen D, Maddock RJ, Haack D, Doran AR, Goodman T, *et al.* Lymphocyte beta-adrenoreceptor density in patients with unipolar depression and normal controls. *Biological psychiatry*. 1989 May;26(1):15-25. PubMed PMID: 2541807.

Maixner W, Diatchenko L, Dubner R, Fillingim RB, Greenspan JD, Knott C, *et al.* Orofacial pain prospective evaluation and risk assessment study--the OPPERA study. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2011 Nov;12(11 Suppl):T4-11 e1-2. PubMed PMID: 22074751. Pubmed Central PMCID: 3233836.

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. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2011 Nov;12(11 Suppl):T75-91. PubMed PMID: 22074754. Pubmed Central PMCID: 3233841.

Mann JJ, Brown RP, Halper JP, Sweeney JA, Kocsis JH, Stokes PE, *et al.* Reduced sensitivity of lymphocyte beta-adrenergic receptors in patients with endogenous depression and psychomotor agitation. *The New England journal of medicine*. 1985 Sep 19;313(12):715-20. PubMed PMID: 2993884.

Mannisto PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological reviews*. 1999 Dec;51(4):593-628. PubMed PMID: 10581325.

Mantione K, Kream RM, Stefano GB. Variations in critical morphine biosynthesis genes and their potential to influence human health. *Neuro endocrinology letters*. 2010;31(1):11-8. PubMed PMID: 20150871.

Marbach JJ, Levitt M. Erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in facial pain patients. *J Dent Res*. 1976 Jul-Aug;55(4):711. PubMed PMID: 1064628.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Matsuda JB, Barbosa FR, Morel LJ, Franca Sde C, Zingaretti SM, da Silva LM, *et al.* Serotonin receptor (5-HT 2A) and catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms: triggers of fibromyalgia? *Revista brasileira de reumatologia*. 2010 Mar-Apr;50(2):141-9. PubMed PMID: 21125150.

Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, *et al.* Catechol-O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience*. 2003;16:127-37.

McLean SA, Diatchenko L, Lee YM, Swor RA, Domeier RM, Jones JS, *et al.* Catechol O-methyltransferase haplotype predicts immediate musculoskeletal neck pain and psychological symptoms after motor vehicle collision. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2011 Jan;12(1):101-7. PubMed PMID: 20688576. Pubmed Central PMCID: 2975044.

McNamara JAJ, Seligman DA, Okeson JP. Occlusion, Orthodontic treatment, and temporomandibular disorders: a review. *Journal of Orofacial Pain*. 1995;9(1):73-90.

Mease PJ. Further strategies for treating fibromyalgia: the role of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. *The American journal of medicine*. 2009 Dec;122(12 Suppl):S44-55. PubMed PMID: 19962496.

Mease PJ, Clauw DJ, Gendreau RM, Rao SG, Kranzler J, Chen W, *et al.* The efficacy and safety of milnacipran for treatment of fibromyalgia. a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of rheumatology*. 2009 Feb;36(2):398-409. PubMed PMID: 19132781.

Michalowicz BS, Pihlstrom BL, Hodges JS, Bouchard TJ, Jr. No heritability of temporomandibular joint signs and symptoms. *J Dent Res*. 2000 Aug;79(8):1573-8. PubMed PMID: 11023277.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

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. *Molecular pain*. 2010;6:32. PubMed PMID: 20509977. Pubmed Central PMCID: 2887789.

Mochizucki D. Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors in animal models of pain. *Human psychopharmacology*. 2004 Oct;19 Suppl 1:S15-9. PubMed PMID: 15378668.

Mukherjee N, Kidd KK, Pakstis AJ, Speed WC, Li H, Tarnok Z, *et al.* The complex global pattern of genetic variation and linkage disequilibrium at catechol-O-methyltransferase. *Molecular psychiatry*. 2010 Feb;15(2):216-25. PubMed PMID: 18574484. Pubmed Central PMCID: 2811226.

Mylius V, Moller JC, Strauch K, Oertel WH, Stiasny-Kolster K. No significance of the COMT val158met polymorphism in restless legs syndrome. *Neurosci Lett*. 2010 Apr 5;473(2):151-4. PubMed PMID: 20184941.

Nackley AG, Diatchenko L. Assessing potential functionality of catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms associated with pain sensitivity and temporomandibular joint disorders. *Methods in molecular biology*. 2010;617:375-93. PubMed PMID: 20336436.

Nackley AG, Shabalina SA, Lambert JE, Conrad MS, Gibson DG, Spiridonov AN, *et al.* Low enzymatic activity haplotypes of the human catechol-O-methyltransferase gene: enrichment for marker SNPs. *PloS one*. 2009;4(4):e5237. PubMed PMID: 19365560. Pubmed Central PMCID: 2664927.

Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, *et al.* Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*. 2006 Dec 22;314(5807):1930-3. PubMed PMID: 17185601.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

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. PubMed PMID: 17084978. Pubmed Central PMCID: 1905861.

Narita M, Nishigami N, Narita N, Yamaguti K, Okado N, Watanabe Y, *et al*. Association between serotonin transporter gene polymorphism and chronic fatigue syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003 Nov 14;311(2):264-6. PubMed PMID: 14592408.

Neilson JR, Sandberg R. Heterogeneity in mammalian RNA 3' end formation. *Experimental cell research*. 2010 May 1;316(8):1357-64. PubMed PMID: 20211174. Pubmed Central PMCID: 2866830.

Ng MC, Harper RP, Le CT, Wong BS. Effects of estrogen on the condylar cartilage of the rat mandible in organ culture. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1999 Jul;57(7):818-23. PubMed PMID: 10416629.

Nicholl BI, Holliday KL, Macfarlane GJ, Thomson W, Davies KA, O'Neill TW, *et al*. No evidence for a role of the catechol-O-methyltransferase pain sensitivity haplotypes in chronic widespread pain. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010 Nov;69(11):2009-12. PubMed PMID: 20570835.

Nissinen E, Tuominen R, Perhoniemi V, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase activity in human and rat small intestine. *Life Sciences*. 1988;42(2609-2614).

Oertel B, Lotsch J. Genetic mutations that prevent pain: implications for future pain medication. *Pharmacogenomics*. 2008 Feb;9(2):179-94. PubMed PMID: 18370847.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Ohrbach R, Fillingim RB, Mulkey F, Gonzalez Y, Gordon S, Gremillion H, *et al.* Clinical findings and pain symptoms as potential risk factors for chronic TMD: descriptive data and empirically identified domains from the OPPERA case-control study. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society.* 2011 Nov;12(11 Suppl):T27-45. PubMed PMID: 22074750. Pubmed Central PMCID: 3443556.

Ojima K, Watanabe N, Narita N, Narita M. Temporomandibular disorder is associated with a serotonin transporter gene polymorphism in the Japanese population. *BioPsychoSocial medicine.* 2007;1:3. PubMed PMID: 17371573. Pubmed Central PMCID: 1805776.

Okeson JP. Etiology of functional disturbances in the masticatory system. Management of temporomandibular disorders and occlusion. 6th ed. Saint Louis: Mosby; 2008. p. 130-63.

Papaleo F, Crawley JN, Song J, Lipska BK, Pickel J, Weinberger DR, *et al.* Genetic dissection of the role of catechol-O-methyltransferase in cognition and stress reactivity in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2008 Aug 27;28(35):8709-23. PubMed PMID: 18753372. Pubmed Central PMCID: 2561993.

Park JW, Lee KS, Kim JS, Kim YI, Shin HE. Genetic Contribution of Catechol-O-methyltransferase Polymorphism in Patients with Migraine without Aura. *Journal of clinical neurology.* 2007 Mar;3(1):24-30. PubMed PMID: 19513339. Pubmed Central PMCID: 2686934.

Parola AL, Kobilka BK. The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis. *The Journal of biological chemistry.* 1994 Feb 11;269(6):4497-505. PubMed PMID: 8308019.

Perlis RH, Fijal B, Adams DH, Sutton VK, Trivedi MH, Houston JP. Variation in catechol-O-methyltransferase is associated with duloxetine response in a clinical trial for major

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

depressive disorder. *Biological psychiatry*. 2009 May 1;65(9):785-91. PubMed PMID: 19095219.

Potvin S, Larouche A, Normand E, de Souza JB, Gaumond I, Grignon S, *et al*. DRD3 Ser9Gly polymorphism is related to thermal pain perception and modulation in chronic widespread pain patients and healthy controls. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009 Sep;10(9):969-75. PubMed PMID: 19464960.

Praschak-Rieder N, Willeit M, Winkler D, Neumeister A, Hilger E, Zill P, *et al*. Role of family history and 5-HTTLPR polymorphism in female seasonal affective disorder patients with and without premenstrual dysphoric disorder. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2002 Apr;12(2):129-34. PubMed PMID: 11872329.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, *et al*. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007 Sep;81(3):559-75. PubMed PMID: 17701901. Pubmed Central PMCID: 1950838.

Puri V, Cui L, Liverman CS, Roby KF, Klein RM, Welch KM, *et al*. Ovarian steroids regulate neuropeptides in the trigeminal ganglion. *Neuropeptides*. 2005 Aug;39(4):409-17. PubMed PMID: 15936815.

Rakvag TT, Klepstad P, Baar C, Kvam TM, Dale O, Kaasa S, *et al*. The Val158Met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients. *Pain*. 2005 Jul;116(1-2):73-8. PubMed PMID: 15927391.

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

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

with pain. *Molecular pain*. 2008;4:64. PubMed PMID: 19094200. Pubmed Central PMCID: 2644687.

Raphael KG, Marbach JJ, Gallagher RM, Dohrenwend BP. Myofascial TMD does not run in families. *Pain*. 1999 Mar;80(1-2):15-22. PubMed PMID: 10204713.

Reenila I, Tuomainen P, Mannisto PT. Improved assay of reaction products to quantitate catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of chromatography B, Biomedical applications*. 1995 Jan 6;663(1):137-42. PubMed PMID: 7704200.

Reenila I, Tuomainena P, Soinilab S, Mannisto PT. Increase of catechol-O-methyltransferase activity in rat brain microglia after intrastriatal infusion of fluorocitrate, a glial toxin. *Neuroscience Letters*. 1997;230:155-8.

Ribeiro-Dasilva MC, Peres Line SR, Leme Godoy dos Santos MC, Arthuri MT, Hou W, Fillingim RB, *et al*. Estrogen receptor-alpha polymorphisms and predisposition to TMJ disorder. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009 May;10(5):527-33. PubMed PMID: 19411060. Pubmed Central PMCID: 2749669.

Ross JR, Riley J, Taegetmeyer AB, Sato H, Gretton S, du Bois RM, *et al*. Genetic variation and response to morphine in cancer patients: catechol-O-methyltransferase and multidrug resistance-1 gene polymorphisms are associated with central side effects. *Cancer*. 2008 Mar 15;112(6):1390-403. PubMed PMID: 18257092.

Roth JA. Presence of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in human brain. *Biochemical Pharmacology*. 1980;29(3119-3122).

Russell IJ, Mease PJ, Smith TR, Kajdasz DK, Wohlreich MM, Detke MJ, *et al*. Efficacy and safety of duloxetine for treatment of fibromyalgia in patients with or without major

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

depressive disorder: Results from a 6-month, randomized, double-blind, placebo-controlled, fixed-dose trial. *Pain*. 2008 Jun;136(3):432-44. PubMed PMID: 18395345.

Rutherford K, Le Trong I, Stenkamp RE, Parson WW. Crystal structures of human 108V and 108M catechol O-methyltransferase. *Journal of molecular biology*. 2008 Jun 27;380(1):120-30. PubMed PMID: 18486144.

Salminen M, Lundstrom K, Tilgmann C, Savolainen R, Kalkkinen N, Ulmanen I. Molecular cloning and characterization of rat liver catechol-O-methyltransferase. *Gene*. 1990;93:241-7.

Sand PG, Korte G, Domani M, Konstandin N, Kar A. Alternatively spliced human catechol- O-methyltransferase (COMT) rationalizes lack of Val158Met effects on pain tolerance. *Pain*. 2008;136(3):445-6.

Scanlon PD, Raymond FA, Weinshilboum RM. Catechol-O-methyltransferase: thermolabile enzyme in erythrocytes of subjects homozygous for allele for low activity. *Science*. 1979 Jan 5;203(4375):63-5. PubMed PMID: 758679.

Segall SK, Maixner W, Belfer I, Wiltshire T, Seltzer Z, Diatchenko L. Janus molecule I: dichotomous effects of COMT in neuropathic vs nociceptive pain modalities. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2012 May;11(3):222-35. PubMed PMID: 22483297.

Segall SK, Nackley AG, Diatchenko L, Lariviere WR, Lu X, Marron JS, *et al*. Comt1 genotype and expression predicts anxiety and nociceptive sensitivity in inbred strains of mice. *Genes, brain, and behavior*. 2010 Nov;9(8):933-46. PubMed PMID: 20659173. Pubmed Central PMCID: 2975805.

Serrano PO. Polimorfismo genético da Catecolamina-0-Metiltransferase (Val 158Met) e disfunção temporomandibular em mulheres. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas; 2010.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Slade GD, Bair E, By K, Mulkey F, Baraian C, Rothwell R, *et al.* Study methods, recruitment, sociodemographic findings, and demographic representativeness in the OPPERA study. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2011 Nov;12(11 Suppl):T12-26. PubMed PMID: 22074749.

Slade GD, Diatchenko L, Bhalang K, Sigurdsson A, Fillingim RB, Belfer I, *et al.* Influence of Psychological Factors on Risk of Temporomandibular Disorders. *Journal of Dental Research*. 2007;86(11):1120-5.

Slade GD, Diatchenko L, Ohrbach R, Maixner W. Orthodontic treatment, genetics and risk of temporomandibular disorder. *Seminars in Orthodontics*. 2008;14(2):146-56.

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. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2011 Nov;12(11 Suppl):T92-101. PubMed PMID: 22074755. Pubmed Central PMCID: 3268684.

Stein DJ, Newman TK, Savitz J, Ramesar R. Warriors versus worriers: the role of COMT gene variants. *CNS spectrums*. 2006 Oct;11(10):745-8. PubMed PMID: 17008817.

Steiner H, Gerfen CR. Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale*. 1998 Nov;123(1-2):60-76. PubMed PMID: 9835393.

Suenaga S, Abeyama K, Indo H, Shigeta K, Noikura T. Temporomandibular disorders: MR assessment of inflammatory changes in the posterior disk attachment during the menstrual cycle. *Journal of computer assisted tomography*. 2001 May-Jun;25(3):476-81. PubMed PMID: 11351201.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Tammimaki A, Kaenmaki M, Kambur O, Kuleskaya N, Keisala T, Karvonen E, *et al.* Effect of S-COMT deficiency on behavior and extracellular brain dopamine concentrations in mice. *Psychopharmacology*. 2010 Sep;211(4):389-401. PubMed PMID: 20617305.

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. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010 Apr;20(4):239-48. PubMed PMID: 20216107. Pubmed Central PMCID: 2876724.

Tenhunen J, Salminen M, Jalanko A, Ukkonen S, Ulmanen I. Structure of the Rat Catechol-O-Methyltransferase Gene: Separate Promoters Are Used to Produce mRNAs for Soluble and Membrane-Bound Forms of the Enzyme. *DNA and Cell Biology*. 1993;12(3):253-63.

Tenhunen J, Salminen M, Lundstrom K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *European Journal of Biochemistry*. 1994;223:1049-59.

Tenhunen J, Ulmanen I. Production of rat soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferase forms from bifunctional mRNAs. *Biochemistry Journal*. 1993;296:595-600.

Toyofuku A, Miyako H. A case of temporo-mandibular disorder with fibromyalgia treated with the antidepressant, milnacipran. *Human psychopharmacology*. 2004 Jul;19(5):357-8. PubMed PMID: 15252831.

Tsao D, Dokholyan NV. Macromolecular crowding induces polypeptide compaction and decreases folding cooperativity. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 2010 Apr 14;12(14):3491-500. PubMed PMID: 20355290. Pubmed Central PMCID: 3050011.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Tunbridge EM, Lane TA, Harrison PJ. Expression of multiple catechol-o-methyltransferase (COMT) mRNA variants in human brain. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2007 Sep 5;144B(6):834-9. PubMed PMID: 17477346.

Tunbridge EM, Weinberger DR, Harrison PJ. A novel protein isoform of catechol O-methyltransferase (COMT): brain expression analysis in schizophrenia and bipolar disorder and effect of Val158Met genotype. *Molecular psychiatry*. 2006 Feb;11(2):116-7. PubMed PMID: 16247488.

Ulmanen I, Peranen J, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P, *et al.* Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*. 1997;243:452-9.

Vargas-Alarcon G, Fragoso JM, Cruz-Robles D, Vargas A, Vargas A, Lao-Villadoniga JJ, *et al.* Catechol-O-methyltransferase gene haplotypes in Mexican and Spanish patients with fibromyalgia. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(5):R110. PubMed PMID: 17961261. Pubmed Central PMCID: 2212567.

Vidgren J, Svensson A, Liljas A. Crystal structure of catechol-O-methyltransferase. *Nature*. 1994;368:354-7.

Voelker P, Sheese BE, Rothbart MK, Posner MI. Variations in catechol-O-methyltransferase gene interact with parenting to influence attention in early development. *Neuroscience*. 2009 Nov 24;164(1):121-30. PubMed PMID: 19482061. Pubmed Central PMCID: 2760680.

Vossen H, Kenis G, Rutten B, van Os J, Hermens H, Lousberg R. The genetic influence on the cortical processing of experimental pain and the moderating effect of pain status. *PloS one*. 2010;5(10):e13641. PubMed PMID: 21049025. Pubmed Central PMCID: 2964315.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Weinshilboum R, Raymond F. Variations in catechol-O-methyltransferase activity in inbred strains of rats. *Neuropharmacology*. 1977 Oct;16(10):703-6. PubMed PMID: 304191.

Weinshilboum RM. Pharmacogenomics: catechol O-methyltransferase to thiopurine S-methyltransferase. *Cellular and molecular neurobiology*. 2006 Jul-Aug;26(4-6):539-61. PubMed PMID: 16807786.

Weinshilboum RM, Raymond FA. Inheritance of Low Erythrocyte Catechol-O-Methyltransferase Activity in Man. *American Journal of Human Genetics*. 1977;29:125-35.

Weinshilboum RM, Raymond FA, Frohnauer M. Monogenic inheritance of catechol-O-methyltransferase activity in the rat -- biochemical and genetic studies. *Biochem Pharmacol*. 1979 Apr 1;28(7):1239-47. PubMed PMID: 444283.

Wright AR, Gatchel RJ, Wildenstein L, Riggs R, Buschang P, Ellis E, 3rd. Biopsychosocial differences between high-risk and low-risk patients with acute TMD-related pain. *Journal of the American Dental Association*. 2004 Apr;135(4):474-83. PubMed PMID: 15127871.

Xu K, Ernst M, Goldman D. Imaging genomics applied to anxiety, stress response, and resiliency. *Neuroinformatics*. 2006 Winter;4(1):51-64. PubMed PMID: 16595858.

Yamada K, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Kohno S, Amizuka N, Iwanaga T, *et al*. Expression of Estrogen Receptor (ER α) in the Rat Temporomandibular Joint. *THE ANATOMICAL RECORD PART A*. 2003;274(A):934-41.

Yu BH, Dimsdale JE, Mills PJ. Psychological states and lymphocyte beta-adrenergic receptor responsiveness. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 1999 Jul;21(1):147-52. PubMed PMID: 10379529.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Yun KI, Chae CH, Lee CW. Effect of estrogen on the expression of cytokines of the temporomandibular joint cartilage cells of the mouse. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2008 May;66(5):882-7. PubMed PMID: 18423275.

Yunus MB. Role of central sensitization in symptoms beyond muscle pain, and the evaluation of a patient with widespread pain. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2007 Jun;21(3):481-97. PubMed PMID: 17602995.

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 21;299(5610):1240-3. PubMed PMID: 12595695.

Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, *et al.* mu-opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002 Jun 15;22(12):5100-7. PubMed PMID: 12077205.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

APÊNDICE 1

Análise estatística referente à **Tabela 1** (coorte “COMT”)

SNP rs165774 x DTM

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	OR	SE	L95	U95	STAT	P
22	rs165774	19952561	1	ADD	391	0.59	0.19	0.40	0.85	-2.79	0.005263

SNP rs165774 x fenótipos intermediários

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	BETA	SE	L95	U95	STAT	P
22	rs165774	19952561	1	ADD	356	-0.23	1.47	-3.10	2.65	-0.16	0.8756
22	rs165774	19952561	1	ADD	383	-0.59	1.70	-3.91	2.72	-0.35	0.7249
22	rs165774	19952561	1	ADD	383	-2.50	16.55	-34.93	29.95	-0.15	0.8806
22	rs165774	19952561	1	ADD	384	-0.18	1.68	-3.48	3.11	-0.11	0.9131
22	rs165774	19952561	1	ADD	384	0.24	0.37	-0.47	0.96	0.67	0.5084

APÊNDICE 2

Análise estatística referente à **Tabela 2 (coorte OPPEA)**

SNP rs165774 x DTM

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	OR	SE	L95	U95	STAT	P
22	rs165774	19952561	1	ADD	391	0.59	0.19	0.40	0.85	-2.79	0.005263

SNP rs165774 x fenótipos intermediários

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	BETA	SE	L95	U95	STAT	P
22	rs165774	18332561	A	ADD	969	0.05	0.03	0.00	0.11	1.87	0.062
22	rs165774	18332561	A	ADD	969	-0.08	0.04	-0.16	-0.01	-2.19	0.029
22	rs165774	18332561	A	ADD	969	-0.03	0.04	-0.11	0.05	-0.69	0.490
22	rs165774	18332561	A	ADD	969	-0.11	0.04	-0.18	-0.03	-2.83	0.005
22	rs165774	18332561	A	ADD	969	-0.08	0.04	-0.16	0.01	-1.83	0.068
22	rs165774	18332561	A	ADD	969	-0.10	0.04	-0.18	-0.02	-2.49	0.013

APÊNDICE 3

Análise estatística referente à **Tabela 3 e Figura 4 (expressão relativa das isoformas MB-COMT)**

Parameter	Value			
Table Analyzed				
Data 2				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	28			
R squared	0.88			
ANOVA Table				
	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	9.5E+16	4	2.4E+16	
Residual (within columns)	1.3E+16	15	8.4E+14	
Total	1.1E+17	19		
Tukey's Multiple Comparison Test				
	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
MB-COMT vs (T)MB-COMT-wild type	77000000	5.3	P < 0.05	13000000 to 140000000
MB-COMT vs (T)MB-COMT-rs165774A	160000000	11	P < 0.001	97000000 to 220000000
MB-COMT vs (T)MB-COMT-rs165895C	190000000	13	P < 0.001	130000000 to 250000000
MB-COMT vs MB-Cotransfected	62000000	4.3	P > 0.05	-1600000 to 130000000
(T)MB-COMT-wild type vs (T)MB-COMT-rs165774A	83000000	5.7	P < 0.01	20000000 to 150000000
(T)MB-COMT-wild type vs (T)MB-COMT-rs165895C	110000000	7.9	P < 0.001	51000000 to 180000000
(T)MB-COMT-wild type vs MB-Cotransfected	-15000000	1	P > 0.05	-78000000 to 48000000
(T)MB-COMT-rs165774A vs (T)MB-COMT-rs165895C	31000000	2.1	P > 0.05	-32000000 to 94000000
(T)MB-COMT-rs165774A vs MB-Cotransfected	-98000000	6.8	P < 0.01	-160000000 to -35000000
(T)MB-COMT-rs165895C vs MB-Cotransfected	-130000000	8.9	P < 0.001	-190000000 to -66000000

APÊNDICE 4

Análise estatística referente à **Tabela 4 e Figura 5 (atividade enzimática das isoformas MB-COMT)**

Parameter	Value			
Table Analyzed	MB-COMT-activity			
One-way analysis of variance				
P value	0.0004			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	14			
R squared	0.85			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	8900	4	2200	
Residual (within columns)	1500	10	150	
Total	10000	14		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
MB-COMT vs (T)MB-COMT-wild type	44	6.1	P < 0.01	11 to 77
MB-COMT vs (T)MB-COMT-rs165774A	41	5.7	P < 0.05	7.4 to 74
MB-COMT vs (T)MB-COMT-rs165895C	40	5.6	P < 0.05	7.1 to 74
MB-COMT vs MB-Cotransfected	-14	2	P > 0.05	-47 to 19
(T)MB-COMT-wild type vs (T)MB-COMT-rs165774A	-3.2	0.45	P > 0.05	-37 to 30
(T)MB-COMT-wild type vs (T)MB-COMT-rs165895C	-3.6	0.5	P > 0.05	-37 to 30
(T)MB-COMT-wild type vs MB-Cotransfected	-58	8.1	P < 0.01	-91 to -25
(T)MB-COMT-rs165774A vs (T)MB-COMT-rs165895C	-0.33	0.046	P > 0.05	-34 to 33
(T)MB-COMT-rs165774A vs MB-Cotransfected	-55	7.7	P < 0.01	-88 to -22

APÊNDICE 5

Análise estatística referente à **Tabela 5 e Figura 6 (expressão relativa das isoformas S-COMT)**

Parameter	Value			
Table Analyzed				
S-COMT				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	57			
R squared	0.92			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	9.9			
P value	0.0419			
P value summary	*			
Do the variances differ signif. (P <	Yes			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	8.3E+16	4	2.1E+16	
Residual (within columns)	7.3E+15	20	3.6E+14	
Total	9.1E+16	24		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
S-COMT vs (T)S-COMT-wild type	100000000	12	P < 0.001	65000000 to 140000000
S-COMT vs (T)S-COMT-rs165774A	120000000	14	P < 0.001	86000000 to 160000000
S-COMT vs (T)S-COMT-rs165895C	160000000	18	P < 0.001	120000000 to 190000000
S-COMT vs S-Cotransfected	34000000	4	P > 0.05	-2400000 to 70000000
(T)S-COMT-wild type vs (T)S-COMT-rs165774A	21000000	2.4	P > 0.05	-15000000 to 57000000
(T)S-COMT-wild type vs (T)S-COMT-rs165895C	55000000	6.5	P < 0.01	19000000 to 91000000
(T)S-COMT-wild type vs S-Cotransfected	-68000000	8	P < 0.001	-100000000 to -32000000
(T)S-COMT-rs165774A vs (T)S-COMT-rs165895C	34000000	4	P > 0.05	-1700000 to 70000000
(T)S-COMT-rs165774A vs S-Cotransfected	-89000000	10	P < 0.001	-120000000 to -53000000
(T)S-COMT-rs165895C vs S-Cotransfected	-120000000	14	P < 0.001	-160000000 to -87000000

APÊNDICE 6

Análise estatística referente à **Tabela 6 e Figura 7 (atividade enzimática das isoformas S-COMT).**

Parameter	Value			
Table Analyzed				
S-COMT-activity				
One-way analysis of variance				
P value	0.0002			
P value summary	**			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	5			
F	6.9			
R squared	0.73			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	250000	4	61000	
Residual (within columns)	89000	10	8900	
Total	330000	14		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
S-COMT vs (T)S-COMT-wild type	330	6	P < 0.05	74 to 580
S-COMT vs (T)S-COMT-rs165774A	330	6	P < 0.05	75 to 580
S-COMT vs (T)S-COMT-rs165895C	330	6	P < 0.05	72 to 580
S-COMT vs S-Cotransfected	200	3.7	P > 0.05	-53 to 450
(T)S-COMT-wild type vs (T)S-COMT-rs165774A	1.4	0.025	P > 0.05	-250 to 250
(T)S-COMT-wild type vs (T)S-COMT-rs165895C	-1.8	0.033	P > 0.05	-250 to 250
(T)S-COMT-wild type vs S-Cotransfected	-130	5.3	P < 0.05	-380 to 130
(T)S-COMT-rs165774A vs (T)S-COMT-rs165895C	-3.1	0.058	P > 0.05	-260 to 250
(T)S-COMT-rs165774A vs S-Cotransfected	-130	5.4	P < 0.05	-380 to 120
(T)S-COMT-rs165895C vs S-Cotransfected	-130	5.3	P < 0.05	-380 to 130