



Maria Isabela Guimarães Campos
Cirurgiã-Dentista
Mestre em Biologia Buco-Dental



ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES COM ALTERAÇÕES DEGENERATIVAS DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Biologia Buco-Dental na área de Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line
Co-orientador: Prof Dr. Paulo Sérgio Flores Campos

Piracicaba
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C157a Campos, Maria Isabela Guimarães.
Análise de polimorfismos genéticos em pacientes com alterações degenerativas da articulação temporomandibular. / Maria Isabela Guimarães Campos. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: Sérgio Roberto Peres Line, Paulo Sérgio Flores Campos

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Osteoartrite. 2. Interleucina. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Campos, Paulo Sérgio Flores. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Analysis of genetic polymorphisms in patients with degenerative changes of temporomandibular joint.

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Osteoarthritis. 2. Interleukin

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Sérgio Roberto Peres Line, Carlos Amílcar Parada, Paula Cristina Trevilatto, Fausto Berzin, Célia Marisa Rizzatti-Barbosa

Data da Defesa: 28-06-2007

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



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 28 de Junho de 2007, considerou a candidata MARIA ISABELA GUIMARÃES CAMPOS aprovada.

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE

PROF. DR. CARLOS AMILCAR PARADA

PROFa. DRa. PAULA CRISTINA TREVILATTO

PROF. DR. FAUSTO BERZIN

PROFa. DRa. CELIA MARISA RIZZATTI BARBOSA

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por todas as oportunidades, ensinamentos e conquistas que foram e serão obtidas.

À **minha família** e aos **amigos queridos** pelo apoio e estímulo constantes.

Aos amigos "piracicabanos", **Alexandre, Andréa, Dindha, Luciana, Maurício e Wagner**, que compartilharam as experiências, angústias e alegrias de realizar um Curso de Pós-Graduação longe de casa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Sérgio Roberto Peres Line**, pela paciência, pela confiança e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos **pacientes e voluntários** pela valorosa contribuição com esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP)**, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. **Francisco Haiter Neto**, pela utilização de suas instalações.

Ao Prof. Dr. **Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. **Fausto Bérzin**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP, por sua amizade e pela seriedade na condução do Curso.

Aos **professores, colegas e funcionários da pós-graduação**, que próximos ou distantes, foram muito solidários durante a condução desta pesquisa.

Ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA), na pessoa da sua diretora, Profa. Dra. **Maria Thereza Barral Araújo**, pela possibilidade de conclusão do Curso de Doutorado.

À equipe de profissionais da **Clínica Radiológica Delfin** por permitir o contato com os pacientes selecionados neste estudo.

Ao Prof. Dr. **Paulo Sérgio Flores Campos** (Faculdade de Odontologia/UFBA) por sua constante disponibilidade no decorrer da pesquisa.

À Profa. Dra. **Luciana Mattos Barros Oliveira** (ICS/UFBA) pelo acesso ao Laboratório de Biologia Molecular durante a coleta dos pacientes.

Aos Professores Doutores **Moysés Sadigurski** (Faculdade de Medicina/UFBA), **Roberto José Meyer Nascimento** (ICS/UFBA) e **Denise Carneiro Lemaire** (ICS/UFBA) pelo apoio durante a coleta de DNA dos pacientes.

À Profa. Dra. **Maria Cristina Teixeira Cangussu** (Faculdade de Odontologia/UFBA) pelo valoroso auxílio nas análises estatísticas.

“Não se iludam.
A ciência não está alicerçada na rocha.
A vasta estrutura de suas teorias ergue-se sobre um pântano.
É como um edifício sustentado por estacas que mergulham num terreno
movediço, mas não atingem nenhuma base natural.
Muitas questões fundamentais para a ciência continuam em aberto.
Se não queremos nos ver reduzidos a meras fatias do conhecimento oficial,
precisamos manter abertas também as nossas mentes.”

Karl Popper

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência dos polimorfismos IL-1A (-889C/T), IL-1B (-511C/T), IL-1B (+3953C/T), IL-1RN VNTR (intron 2), IL-6 (-174G/C) e TNF-A (-308G/A) em 92 pacientes com sinais imagiológicos de alterações degenerativas da ATM e em 102 indivíduos controles. O DNA dos voluntários foi extraído a partir de células epiteliais da mucosa bucal e submetido às técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) e RFLP (polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição) para a detecção dos possíveis alelos. Os produtos do PCR/RFLP foram analisados em géis de poliacrilamida a 10%, corados por prata. Os polimorfismos foram analisados individualmente e sob a forma de haplótipos. O programa Arlequin (ver. 3.01) foi utilizado para calcular o desequilíbrio de ligação entre os *loci* polimórficos da IL-1 e determinar seus possíveis haplótipos. Adicionalmente, um questionário foi aplicado aos voluntários para investigar a presença de fatores locais e sistêmicos associados a DTMs. Os dados do questionário, bem como, as frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas foram comparadas entre os dois grupos com auxílio do teste qui-quadrado ($p < 0,05$). O método de *Mantel-Haenszel* foi utilizado para o cálculo de *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) a 95% para estimar o risco de cada fator avaliado na ocorrência da doença. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Epi Info (ver. 6.04). Estresse e/ou ansiedade ($p=0,001$), uso freqüente de ansiolíticos ou antidepressivos ($p=0,000$), hábitos parafuncionais ($p=0,000$), histórico de trauma facial ($p=0,005$), queixas constantes de dores em outras articulações ($p=0,000$), presença de alterações sistêmicas ($p=0,000$) e histórico de familiares com DTM ($p=0,000$) se mostraram significativamente mais freqüentes nos pacientes do grupo teste. Considerando o polimorfismo IL-1B (+3953C/T), o alelo C e genótipo C/C mostraram maior ocorrência no grupo teste do que no controle ($p=0,000$), aumentando em 3,24 e 6,35 vezes o risco de desenvolvimento de DTM, respectivamente. A presença do genótipo C/T do polimorfismo IL-1A (-889C/T) aumentou em aproximadamente 1,87 vezes o risco em desenvolver DTM. Os *loci* polimórficos IL-1B (+3953C/T), IL-1A (-889C/T) e IL-1RN se mostraram em desequilíbrio de ligação e foram analisados simultaneamente, demonstrando que indivíduos portadores do respectivo

haplótipo TC1 apresentaram-se 0,11 vezes mais protegidos em desenvolver DTM. Considerando o polimorfismo IL-6 (-174G/C), indivíduos portadores do alelo C e do genótipo C/G apresentaram um risco 1,60 e 1,98 vezes maior em desenvolver DTM, respectivamente. O presente estudo mostra que polimorfismos nos genes da IL-1 e IL-6 estão associados ao desenvolvimento de DTMs na população estudada e corrobora evidências anteriores de que fatores psicológicos, locais e sistêmicos devem atuar em conjunto no desenvolvimento de DTMs.

Palavras-chave: Articulação temporomandibular, Desordem temporomandibular, Osteoartrite, Polimorfismo genético, Interleucina

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the occurrence of IL-1A (-889C/T), IL-1B (-511C/T), IL-1B (+3953C/T), IL-1RN VNTR (intron 2), IL-6 (-174G/C) and TNF-A (-308G/A) polymorphisms in 92 patients with degenerative changes of temporomandibular joint. Control group comprised 102 healthy individuals. Genomic DNA was obtained from oral mucosa cells and polymorphisms were identified by PCR (polymerase chain reaction) and RFLP (restriction fragment length polymorphism). Restriction products were visualized by electrophoresis on vertical 10% polyacrylamide gels, followed by silver staining. The Arlequin software (ver.3.01) was used to determine haplotype frequencies and linkage disequilibrium among the IL-1 polymorphic sites. The polymorphisms were analyzed individually and in haplotypes. In addition, a questionnaire was answered by volunteers in order to assess the presence of local and systemic factors associated to TMDs. Data of the questionnaires, frequencies of alleles, genotypes and haplotypes were compared between the two groups using the chi-squared test ($p < 0.05$). The odds ratio (OR) was calculated with 95% confidence intervals (CI) to estimate the relative risk of each factor on the disease occurrence. The statistical analyses were performed using Epi Info software (ver. 6.04). Stress and/or anxiety ($p = 0.001$), frequent usage of anxiolytic or antidepressant drugs ($p = 0.000$), oral parafunctions ($p = 0.000$), history of facial trauma ($p = 0.005$), presence of systemic diseases ($p = 0.000$), complaints of pain in other joints ($p = 0.000$) and history of relatives with TMD ($p = 0.000$) were significantly more frequent in patients of test group. For the IL-1B (+3953C/T) polymorphism, allele C and genotype C/C were significantly frequent in patients of test group ($p = 0.000$), showing 3,24- and 6,35-folds increased risk for TMD development, respectively. Individuals with genotype C/T of IL-1A (-889C/T) polymorphism showed a 1,87-folds increased risk for TMD development. The polymorphisms IL-1B (+3953C/T), IL-1A (-889C/T) and IL-1RN were in linkage disequilibrium and were analyzed in haplotypes. The respective haplotype TC1 showed a protective effect increased in 0,11-folds. Individuals with allele C and genotype C/G of IL-IL-6 (-174G/C) polymorphism showed a 1,60- and 1,98-folds increased risk for TMD development, respectively. The present study shows that IL-1 and IL-6 polymorphisms are

associated with development of TMDs in the studied population and corroborates previous evidences that psychological, local and systemic factors should act in combination to promote development of TMDs.

Key Words: Temporomandibular joint, Temporomandibular disorder, Osteoarthritis, Genetic polymorphism, Interleukin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. PROPOSIÇÃO	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
5. RESULTADOS	22
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE	54
ANEXOS	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM – Articulação temporomandibular

DD – Deslocamento de disco

DTM – Desordem temporomandibular

IL – Interleucina

IL-1ra – Antagonista de receptor da interleucina-1

IL-1RI – Receptor da interleucina-1 tipo I

IL-1RII - Receptor da interleucina-1 tipo II

MMP - Metaloproteinases de matriz

OA - Osteoartrite

PCR – Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

RFLP – Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição)

RM – Ressonância magnética

SNP – Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo único)

TC – Tomografia computadorizada

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

VNTR – Variable number of tandem repeats (número variável de repetições em tandem)

1. INTRODUÇÃO

As desordens temporomandibulares (DTMs) abrangem um amplo número de problemas clínicos articulares e/ou musculares na região orofacial, sendo principalmente caracterizadas por dor, ruídos articulares e/ou funções limitadas da mandíbula. Pacientes portadores de DTMs apresentam como principais alterações articulares os deslocamentos de disco (DDs) e as alterações degenerativas da articulação temporomandibular (ATM) que podem culminar em um quadro de osteoartrite (OA) (Zarb *et al.*, 2000).

Em alguns indivíduos, as DTMs se apresentam de forma severa, podendo gerar incapacidade para o trabalho ou para o convívio social normal. Ao longo da vida, cargas funcionais e/ou parafuncionais iniciam alterações adaptativas e, por fim, degenerativas na ATM. Sob certas condições, como predisposição genética, trauma e estresse, estas alterações podem atravessar o limiar de um estado assintomático para o sintomático. A severidade dos sintomas e a progressão da doença apresentam grande variação interindividual, sugerindo que fatores intrínsecos ao indivíduo devem desempenhar um papel relevante no processo (Zarb & Carlsson 1999; Stegenga, 2001).

Análises bioquímicas do fluido sinovial de ATMs demonstraram que níveis elevados de citocinas e de seus receptores se correlacionaram com alterações patológicas nas articulações (Fu *et al.*, 1995; Kubota *et al.*, 1998; Sandler *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999; Emshoff *et al.*, 2000; Kaneyama *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Kaneyama *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Tominaga *et al.*, 2004; Kaneyama *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2006).

Citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) foram observadas em níveis elevados no fluido sinovial de ATMs com sinais e sintomas de OA, sugerindo a participação desses mediadores na patogênese da doença (Fu *et al.*, 1995; Kubota *et al.*, 1998; Kopp, 1998; Nordahl *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998; Kaneyama *et al.*, 2002; Kaneyama *et al.*, 2004).

Polimorfismos genéticos são pequenas variações comuns na seqüência de nucleotídeos, espalhadas em várias posições diferentes ao longo do genoma. Os

polimorfismos refletem o acúmulo de mutações ao longo de milhares de gerações, proporcionando a ocorrência de dois ou mais genótipos alternativos em uma população (Farah, 1997).

Polimorfismos foram descritos nos genes da IL-1, IL-6 e TNF- α , cujos alelos específicos foram associados a uma maior expressão das respectivas citocinas (di Giovine *et al.*, 1992; Pociot *et al.*, 1992; Tarlow *et al.*, 1993; McDowell *et al.*, 1995; Kroeger *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997; Fishman *et al.*, 1998), bem como, à severidade e/ou predisposição a doenças de natureza inflamatória e degenerativa, como a artrite reumatóide (Danis *et al.*, 1995a; Buchs *et al.*, 2001), artrite crônica juvenil (Fishman *et al.*, 1998), artrite psoriática (Ravidran *et al.*, 2004) e lupus eritematoso sistêmico (Huang *et al.*, 2002).

Estudos que identifiquem fatores genéticos associados às DTMs podem fornecer informações úteis para o desenvolvimento de intervenções farmacológicas e genéticas que combatam a progressão da doença. Entretanto, na literatura existem poucos estudos acerca da influência genética sobre as desordens temporomandibulares.

O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência dos polimorfismos IL-1A (-889C/T), IL-1B (-511C/T), IL-1B (+3953C/T), IL-1RN VNTR (intron 2), IL-6 (-174G/C) e TNF-A (-308G/A) em 92 pacientes portadores de sinais imaginológicos e sintomas de alterações degenerativas da ATM e em 102 indivíduos assintomáticos. Adicionalmente, a presença de fatores psicológicos, locais e sistêmicos também foi investigada por meio de aplicação de questionário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As desordens temporomandibulares são as principais causas de dor não-dentária na região orofacial e acometem uma parcela considerável da população mundial, tendo maior prevalência nas mulheres em idade reprodutiva. Em se tratando das desordens articulares, as principais alterações são os deslocamentos de disco e os processos degenerativos, como a osteoartrite. (Zarb *et al.*, 2000).

O deslocamento de disco é definido como uma anormalidade anatômica e funcional da relação entre disco, côndilo e componente articular do osso temporal. O deslocamento anterior do disco parece ser a situação mais freqüente e, de acordo com o aspecto funcional, pode apresentar-se com ou sem redução. No primeiro, o disco encontra-se deslocado à frente do côndilo quando a boca está fechada, mas durante a abertura de boca, o côndilo se movimenta para uma posição protrusiva, “recapturando” o disco para uma posição de normalidade. Clinicamente, a redução do disco se reflete em um ruído ou estalo. Quando o côndilo volta para a posição retrusiva ocorre o ruído recíproco, pois o disco se recoloca à sua frente. No deslocamento anterior sem redução, há o deslocamento permanente do disco à frente do côndilo, não ocorrendo ruídos articulares. Esta condição reflete um estágio mais avançado, no qual pode ocorrer travamento, ou seja, abertura mandibular limitada (Zarb *et al.*, 2000). O DD pode manifestar-se clinicamente como dor articular, entretanto, a observação de DD em pacientes assintomáticos propõe um novo conceito que considera a posição anterior do disco uma variação anatômica “normal”, podendo persistir por décadas sem progressão do quadro (Stegenga, 2001).

A osteoartrite ou doença articular degenerativa envolve basicamente dois processos: a degeneração e a inflamação. A degeneração é caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem articular e do osso subcondral, acompanhada pela neoformação de osso e de tecido mole. O acúmulo de material degradado poderá desencadear uma resposta inflamatória. Inicialmente, o termo osteoartrose era empregado, pois se acreditava na ausência de processo inflamatório, entretanto, o termo osteoartrite parece ser mais apropriado por ser improvável que alterações degenerativas não desencadeiem algum grau de inflamação no tecido sinovial (Stegenga, 2001).

O diagnóstico de OA é estabelecido com base na história do paciente e na interpretação dos exames de imagens (Zarb & Carlsson, 1999). Dentre os exames de imagem das ATMs, o exame de ressonância magnética (RM) parece ser o método mais eficiente para avaliação das estruturas articulares, pois fornece informações sobre tecidos duros, moles e posicionamento do disco (Tomas *et al.*, 2006). Erosão da cortical óssea, esclerose subcondral e formação de espículas ósseas, denominadas osteófitos, são imagens características de alterações degenerativas da ATM (De Bont & Stegenga, 1993; Zarb & Carlsson, 1999; Tomas *et al.*, 2006).

As alterações degenerativas são frequentemente relacionadas a sinais e sintomas clínicos de DTM, decorrentes da resposta inflamatória dos tecidos (Zarb & Carlsson, 1999; Stegenga, 2001). Durante o curso da doença, os sintomas tendem a desaparecer, porém as alterações radiográficas podem permanecer como resultado da remodelação tecidual (De Leeuw *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1998; Imirzalioglu *et al.*, 2005; Kurita *et al.*, 2005). Caso ocorra sobrecarga da articulação, os sintomas poderão recidivar (Stegenga, 2001).

A grande prevalência de alterações degenerativas em ATMs com deslocamento de disco sem redução sugere a instalação da OA como progressão do DD (Bertram *et al.*, 2001; Emshoff *et al.*, 2001; Larheim *et al.*, 2005). No entanto, essa relação ainda não está confirmada, pois a presença de alterações degenerativas em articulações sem DD demonstra que a segunda condição não é pré-requisito necessário para a primeira (De Bont & Stegenga, 1993; Pereira *et al.*, 1994).

Em revisão de literatura, Greene (2001) discute as teorias etiológicas propostas para as DTMs e ressalta que a ciência ainda não nos oferece uma resposta definitiva. Atualmente o modelo mais aceito é o da etiologia multifatorial, no qual fatores psicológicos, locais e sistêmicos podem ser identificados. Na OA, alguns fatores podem ser destacados como o avanço da idade, estresse, traumatismo facial e sobrecarga articular produzida por hábitos parafuncionais, maloclusão e perda dos dentes (Zarb & Carlsson, 1999; Martinez-Blanco *et al.*, 2004).

É reconhecido que diversas condições sistêmicas podem afetar diretamente a ATM ou atuar em comorbidade com as DTMs. Doenças como artrite reumatóide (Kobayashi *et al.*, 2001; Bathi *et al.*, 2004; Moen *et al.*, 2005; Ardic *et al.*, 2006), artrite psoriática (Dervis & Dervis, 2005), espondilite anquilosante (Major *et al.*, 1999), artrite idiopática juvenil (Savioli *et al.*, 2004; Twilt *et al.*, 2004; Scolozzi *et al.*, 2005; Arabshahi & Cron, 2006), pseudogota (Goldblatt *et al.*, 2004) e anemia falciforme (Baykul *et al.*, 2004) podem também acometer a ATM, contribuindo para a instalação de alterações degenerativas. Essas alterações podem gerar complicações como dor, movimentos mandibulares limitados e, em casos mais severos, a reabsorção condilar que pode trazer conseqüências para a oclusão dos indivíduos acometidos (Helenius *et al.*, 2005; Atsu & Ayhan-Ardic, 2006).

A teoria multifatorial parece ser plausível e apresenta grande valor para a compreensão das desordens temporomandibulares em nível coletivo. Entretanto, ela não explica a importância relativa dos diversos fatores envolvidos em cada paciente. Dessa forma, permanece a questão: ‘o que determina que alguns indivíduos desenvolvam dor e disfunção enquanto outros permanecem assintomáticos?’ (Greene, 2001).

2.1 Papel de citocinas na patogênese das DTMs

A ATM é considerada uma articulação complexa, formada por diferentes tecidos que se interrelacionam: cartilagem, osso, ligamentos e membrana e fluido sinoviais. Estes tecidos estão em constante remodelação, na qual condrócitos, osteócitos e fibroblastos exercem atividades anabólicas e catabólicas. Essas atividades se mantêm em equilíbrio sob a ação de cargas funcionais, desenvolvendo alterações adaptativas na estruturas articulares. As alterações degenerativas se instalam quando a capacidade adaptativa dos tecidos é excedida, gerando um desequilíbrio entre as atividades catabólica e anabólica. O processo degenerativo pode gerar um acúmulo de produtos degradados, os quais desencadeiam uma resposta inflamatória clinicamente perceptível quando não são rapidamente fagocitados (Stegenga *et al.*, 1991; Stegenga, 2001).

As vias de degradação dos tecidos articulares envolvem principalmente a necrose celular e a atividade das enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs), enquanto que as vias anabólicas envolvem proliferação e diferenciação celular, além de síntese da matriz (Puzas *et al.*, 2001). A análise da expressão de MMP-1, -2, -3, -8, -9, e -13 no fluido sinovial de ATMs revelou alta incidência destas proteinases em pacientes que apresentavam osteoartrite e/ou desarranjo interno da articulação temporomandibular (Kubota *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1998; Srinivas *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2006). Adicionalmente, o aumento da atividade das MMPs foi associado a níveis elevados de IL-1 β e IL-6 no fluido sinovial de ATMs com desarranjo interno ou OA (Kubota *et al.*, 1998).

Os resultados de estudos *in vitro* e em modelos animais sugerem que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e TNF- α desempenhem um papel importante na indução de maior expressão e atividade das MMPs na patogênese das DTMs (Ijima *et al.*, 2001; Puzas *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2006).

Condrócitos e células do disco obtidas da ATM de ratos, sob a estimulação com IL-1 α , apresentaram maior expressão e ativação das MMP-3 e -9 (Ijima *et al.*, 2001). Entretanto, em estudo com células obtidas do disco da ATM de coelhos, Yamaguchi *et al.* (2005) observaram que, apenas em condição de hipóxia, a IL-1 β induziu expressão gênica elevada de MMP-1, -3, -9 e -13.

A expressão elevada de IL-1 β em ATM de camundongos geneticamente manipulados desencadeou alterações histopatológicas na cartilagem articular como fibrilação e erosão da superfície articular, clonagem de condrócitos e perda do conteúdo de proteoglicanas. Estas alterações foram acompanhadas pela indução da expressão de mediadores inflamatórios como IL-6, MMP-9 e ciclooxigenase-2 (COX-2). As alterações histopatológicas e bioquímicas mencionadas se refletiram em comportamentos relacionados à dor e disfunção da ATM, como grunhido e diminuição da resistência à abertura de boca (Lai *et al.*, 2006).

Puzas *et al.* (2001) avaliaram a ATM de camundongos manipulados geneticamente para expressar níveis aumentados de TNF- α e observaram imunomarcação

de MMP-9 e IL-1 em células articulares e do disco. Inicialmente, a ATM desses animais apresentou inflamação da membrana sinovial, seguida, em poucos meses, por alterações histológicas de degeneração, como clonagem de condrócitos, reabsorção óssea, fissura na superfície articular e afinamento do disco.

A capacidade das citocinas pró-inflamatórias em induzir a síntese de MMPs, bem como seu potencial de ativar condrócitos e osteoclastos durante a degradação da cartilagem e reabsorção óssea (Tatakis, 1993; Westacott *et al.*, 1994; Manolagas, 2000) sugerem um importante papel destas moléculas nas alterações patológicas da ATM. Desta forma, a avaliação desses mediadores inflamatórios e de seus receptores no fluido sinovial de ATMs tem sido sugerida como uma análise bioquímica eficiente para avaliar o grau de inflamação e destruição dos tecidos articulares (Fu *et al.*, 1995; Kubota *et al.*, 1998; Sandler *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999; Emshoff *et al.*, 2000; Kaneyama *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Kaneyama *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Tominaga *et al.*, 2004; Kaneyama *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2006).

Concentrações elevadas de IL-1 β (Kubota *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998; Kaneyama *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2004; Kaneyama *et al.*, 2005), TNF- α (Takahashi *et al.*, 1998; Kaneyama *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Kaneyama *et al.*, 2005) e IL-6 (Kubota *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998; Kaneyama *et al.*, 2002; Kaneyama *et al.*, 2004; Kaneyama *et al.*, 2005) foram detectadas no fluido sinovial de pacientes com DTMs (desarranjo interno e/ou OA), quando comparados a indivíduos controles. Em contraste, os níveis de IL-1 β e TNF- α não mostraram diferença estatística significativa em estudo realizado por Kaneyama *et al.* (2003), comparando grupos com DTMs e indivíduos saudáveis.

Níveis elevados de IL-1 β e/ou TNF- α no fluido sinovial foram correlacionados com a presença de dor na ATM (Takahashi *et al.*, 1998; Emshoff *et al.*, 2000), bem como, com o diagnóstico clínico e imagiológico de OA (Fu *et al.*, 1995; Kubota *et al.*, 1998). Adicionalmente, observou-se que pacientes com elevada concentração de IL-1 β no fluido sinovial apresentam maior probabilidade de insucesso na resolução dos sintomas após irrigação da ATM (Nishimura *et al.*, 2004). Em discordância, Nishimura *et al.* (2002) e

Kaneyama *et al.* (2002) não observaram correlação entre a concentração de IL-1 β e TNF- α no fluido sinovial e achados clínicos de DTMs.

Takahashi *et al.* (1998) e Kaneyama *et al.* (2002) não observaram correlação entre a concentração de IL-6 no fluido sinovial e achados clínicos de DTMs, como a presença de dor. Entretanto, níveis elevados deste mediador foram correlacionados com quadro severo de sinovite evidenciada em exames de artroscopia (Sandler *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2002), bem como com a presença de alterações ósseas observadas em exames radiográficos da ATM (Kubota *et al.*, 1998; Kaneyama *et al.*, 2002; Kaneyama *et al.*, 2004). Adicionalmente, observou-se que pacientes com elevada concentração de IL-6 no fluido sinovial apresentam maior probabilidade de insucesso na resolução dos sintomas após irrigação da ATM (Hamada *et al.*, 2006).

Além das IL-1 α e β , a família da IL-1 apresenta um antagonista de receptor (IL-1ra) que atua como um inibidor competitivo, pois sua ligação aos receptores da IL-1 não desencadeia atividade biológica (Abbas *et al.*, 1998). Em análise do fluido sinovial, indivíduos do grupo controle apresentaram níveis mais elevados de IL-1ra do que pacientes com DTMs, porém sem significância estatística (Tominaga *et al.*, 2004; Kaneyama *et al.*, 2005). Adicionalmente, concentrações elevadas de IL-1ra no fluido sinovial foram correlacionadas com ausência ou menor intensidade de dor durante movimentos mandibulares em pacientes com poliartrites crônicas que apresentaram envolvimento da ATM (Alstergren *et al.*, 2003). Em discordância, Fang *et al.* (1999) observaram concentração elevada de IL-1ra no fluido sinovial de pacientes com DTMs, porém o mesmo não foi detectado nos indivíduos do grupo controle.

Citocinas pró-inflamatórias e seus receptores parecem desempenhar um papel importante na patofisiologia das DTMs, embora ainda não estejam esclarecidos seus mecanismos de indução e exacerbação dos sinais e sintomas da OA. Estudos *in vitro* e em modelos animais têm sido conduzidos na tentativa de elucidar o papel de diferentes mediadores inflamatórios durante os estágios da artrite na ATM (Habu *et al.*, 2002; Spears *et al.*, 2003a; Spears *et al.*, 2003b; Sukedai *et al.*, 2004; Spears *et al.*, 2005; Hirota *et al.*, 2006).

Habu *et al.* (2002), Sakedai *et al.* (2004) e Hirota *et al.* (2006) utilizaram o mesmo modelo animal de artrite induzida em ATM de coelhos para avaliar a marcação celular de IL-1 β , do receptor de antagonista da IL-1 (IL-1ra), da IL-8, do TNF- α e de células apoptóticas durante a progressão da doença. A IL-1 β , IL-1ra e TNF- α estavam presentes na fase aguda e persistiram na fase crônica da artrite, porém apresentaram diferentes fontes celulares. Na fase aguda, IL-1 β e IL-1ra foram principalmente produzidas por células inflamatórias e sinoviais, enquanto que nos estágios mais tardios da doença essas citocinas foram observadas em condrócitos e células sinoviais hiperplásicas (Habu *et al.*, 2002). O TNF- α que inicialmente era produzido por células inflamatórias, sinoviais, condrócitos e células endoteliais vasculares, se mostrou relacionado apenas com os dois últimos tipos celulares durante a fase crônica (Sakedai *et al.*, 2004). Adicionalmente, foi sugerido que a elevada marcação de TNF- α em condrócitos no estágio agudo da artrite induzida deve atuar como responsável pelo aumento de condrócitos apoptóticos durante a progressão para o estágio crônico (Hirota *et al.*, 2006). Já a produção de IL-8 parece limitar-se a fase aguda da doença, sendo sintetizada por células inflamatórias e sinoviais (Sakedai *et al.*, 2004).

Em modelo de artrite induzida na ATM de ratos, as concentrações de IL-1 β e TNF- α foram avaliadas nos tecidos articulares com dois dias, duas, quatro e seis semanas. Nos dois primeiros dias, foram observadas as maiores concentrações, as quais se mantiveram elevadas durante os demais estágios inflamatórios quando comparadas ao grupo controle (Spears *et al.*, 2005). Em estudo anterior, utilizando-se o mesmo modelo animal, foram demonstradas durante o estágio agudo de inflamação concentrações elevadas, não apenas de TNF- α , mas também de seus receptores (TNF-R1 e TNF-R2) nos tecidos articulares (Speras *et al.*, 2003a). Adicionalmente, os tecidos articulares foram colocados em meio de cultura e estimulados com TNF- α observando-se uma diminuição da concentração de TNF-R1, aumento da apoptose, bem como, das enzimas caspase-3 e -8 e de IL-1 β . Esses efeitos foram revertidos pela adição de anticorpo anti-TNF- α ao meio de cultura, sugerindo que esta citocina deve estar envolvida na ativação das vias de sinalização da apoptose (Spears *et al.*, 2003b).

Com base no que foi exposto, pode-se hipotetizar que mediante um estímulo iniciador, indivíduos capazes de produzir elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias podem apresentar um risco elevado em desenvolver DTMs de maior severidade. Logo, torna-se relevante estudar a correlação entre fatores associados à maior produção dessas moléculas, como os polimorfismos genéticos, e as alterações patológicas da ATM.

2.2 Influência de polimorfismos genéticos nas DTMs

Basicamente, existem dois tipos de variações no DNA de indivíduos normais: aquela que afeta um simples par de bases, como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), e as que envolvem seqüências gênicas repetidas, como o polimorfismo VNTR (número variável de repetições em tandem). O SNP apresenta dois alelos possíveis, reconhecidos por enzimas de restrição. A alteração de um par de bases na seqüência do DNA cria um sítio de restrição, ou seja, a depender do nucleotídeo presente, a seqüência será ou não reconhecida e cortada por uma enzima de restrição específica. Já o polimorfismo VNTR é caracterizado por uma seqüência de pares de bases que se repete consecutivamente em número variável, podendo originar dois ou mais alelos (Farah, 1997).

Essas variações podem estar localizadas em regiões codificantes, promotoras ou intrônicas dos genes, podendo alterar transcrição e/ou função da proteína. Desta forma, pequenas variações no genoma podem contribuir com a base genética de determinadas doenças (Chen *et al.*, 2005).

Os três polipeptídeos que constituem a família da IL-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra) são codificados pelos genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN, respectivamente. Esses genes estão próximos e localizados no braço longo do cromossomo 2 (Nicklin *et al.*, 1994).

Na posição -511 do promotor e na posição +3953 do exon 5 do gene IL-1B, assim como, na posição -889 da região promotora do gene IL-1A foram descritos SNPs que se caracterizam pela substituição de uma base citosina (C) por uma base timina (T), originando dois possíveis alelos: alelo C e alelo T (Di Giovine *et al.*, 1992; Pociot *et al.*, 1992; McDowell *et al.*, 1995).

No intron 2 do gene IL-1RN foi identificado um polimorfismo VNTR, caracterizado por uma seqüência de 86 pares de base (86 pb) que se repete em número variável. Essa seqüência pode se repetir de duas a seis vezes consecutivas, fornecendo cinco possíveis alelos: 1, 2, 3, 4 e 5 (Tarlow *et al.*, 1993).

Os alelos T (IL1B-511), T (IL1B+3953), T (IL1A-889) e 2 (IL-1RN intron 2) foram associados a maior produção de seus respectivos mediadores (Pociot *et al.*, 1992; Danis *et al.*, 1995b; Hurme & Santtila, 1998; Shirodaria *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2002), bem como a suscetibilidade e/ou severidade de doenças degenerativas e inflamatórias, como a artrite reumatóide (Buchs *et al.*, 2001), espondilite anquilosante (van der Paardt *et al.*, 2002), artrite psoriática (Ravidran *et al.*, 2004) e osteoartrite (Moos *et al.*, 2000).

O gene humano que codifica a IL-6 está localizado no braço curto do cromossomo 7 e consiste de 5 exons e 4 introns. Na posição -174 do seu promotor, foi descrito um SNP caracterizado pela substituição de uma base guanina (G) por uma base C (citosina) (Olomolaiye *et al.*, 1998), que resulta em alterações na transcrição da IL-6 e aumento dos seus níveis plasmáticos (Fishman *et al.*, 1998). Ainda não foi esclarecido de que maneira este polimorfismo modula os níveis de IL-6. Alguns autores (Fishman *et al.*, 1998; Pola *et al.*, 2002; Vozarova *et al.*, 2003) observaram associação de níveis aumentados de IL-6 e doenças sistêmicas com os genótipos G/G e C/G quando comparados ao genótipo C/C, enquanto que outros autores (Revilla *et al.*, 2002; Rea *et al.*, 2003) observaram uma relação oposta.

O gene TNF-A, responsável pela codificação do TNF- α , está localizado no braço curto do cromossomo 6, na região de classe III do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e contém 4 exons e 3 introns (Makhatadze, 1998). Na posição -308 de sua região promotora, foi descrito um SNP, no qual há substituição de uma base guanina (G) por uma base adenina (A) (Wilson *et al.*, 1992). O alelo A foi relacionado à maior transcrição gênica (Kroeger *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997) e produção elevada de TNF- α *in vitro* (Louis *et al.*, 1998). Este alelo parece também estar associado ao desenvolvimento de doenças inflamatórias e degenerativas, como a artrite reumatóide (Rodriguez-Carreón *et*

al., 2005), lupus eritematoso sistêmico (Rood *et al.*, 2000) e febre reumática (Sallakci *et al.*, 2005)

Até o presente momento não existe relato na literatura sobre a influência dos referidos polimorfismos sobre o desenvolvimento e/ou severidade de DTMs.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência de polimorfismos nos genes da IL-1, IL-6 e TNF- α em 92 pacientes com sintomas e sinais imaginológicos de alterações degenerativas da ATM e em 102 indivíduos assintomáticos.

Foram analisados seis polimorfismos genéticos previamente descritos: IL-1A (-889C/T), IL-1B (-511C/T), IL-1B (+3953C/T), IL-1RN VNTR (intron 2), IL-6 (-174G/C) e TNF-A (-308G/A).

Adicionalmente, a presença de fatores psicológicos, locais e sistêmicos foi investigada por meio da aplicação de questionários.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos analisados

A amostra do presente estudo foi composta por dois grupos: (1) grupo teste, constituído por 92 pacientes que apresentaram imagens de alterações degenerativas na ATM em exames de ressonância magnética (RM) e/ou tomografia computadorizada (TC); e (2) grupo controle, constituído por 102 indivíduos sem nenhum tipo de sintomatologia na região da ATM e/ou dos músculos da mastigação.

O grupo teste foi selecionado do universo de pacientes que realizaram, entre o período de outubro de 2000 a novembro de 2005, RM e/ou TC das ATMs numa clínica privada de diagnóstico por imagem da cidade de Salvador-BA (Clínica DELFIN - Av. Antonio Carlos Magalhães, nº 442, Itaipara). Antes da aquisição das imagens, esta clínica possui como rotina submeter os pacientes a anamnese simplificada e dirigida para a queixa principal, exame clínico e palpação bilateral das ATMs (ANEXO 1).

Os exames por RM foram procedidos em aparelho da marca *General Electric Medical System* (Milwaukee, WI, E.U.A.), modelo *Signa Horizon*, de 1,5T. Os exames de TC foram realizados em tomógrafo de alta resolução, marca *General Electric Medical System* (Milwaukee, WI, E.U.A.), modelo *CT Sinergy Helicoidal*. Os critérios para a obtenção das imagens foram os mesmos para todos os pacientes do grupo teste e seguiram o protocolo utilizado pela clínica para exames de RM e TC das ATMs. As imagens foram interpretadas por dois radiologistas experientes, sendo consideradas desde alterações degenerativas iniciais (osteófito e erosão cortical sem perda importante de substância) a condições degenerativas avançadas (osteocondrite dissecante e necrose avascular).

Os 102 indivíduos do grupo controle foram selecionados na cidade de Salvador (BA) e apresentaram sexo, idade, raça e condição social similares aos pacientes do grupo teste.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP (protocolo nº 096/2005) (ANEXO 2) e todos os voluntários assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para participação em pesquisa.

4.2 Aplicação de questionário

Um questionário elaborado pelos pesquisadores (APÊNDICE 1) foi aplicado a todos os pacientes do grupo teste, por meio de entrevista, com o objetivo de obter informações sobre a presença de fatores locais e/ou sistêmicos envolvidos com as DTMs. Nos indivíduos do grupo controle foi aplicado questionário similar (APÊNDICE 2).

4.3 Obtenção do DNA

O DNA dos indivíduos de ambos os grupos foi extraído a partir de células epiteliais da mucosa bucal. As células foram obtidas por meio de bochecho com glicose a 3% (2 min). A solução foi centrifugada por 10 min a 2000 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 500 µL de tampão de extração (10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA, 0,5% SDS) (Aidar, 2005).

As amostras foram incubadas *overnight* (ON) com 100 ng/ml de proteinase K (*Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA*) a 37°C. O DNA foi extraído pela adição de 500 µL de solução de extração (acetato de amônio 10M e EDTA 1mM), seguida de centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o DNA foi precipitado pela adição de 540µL de isopropanol, seguido de centrifugação (5 min a 14000 rpm) e posterior adição de 1,0 mL de etanol 70%, seguida de centrifugação (5 min a 14000 rpm). Finalmente, o DNA cromossômico foi ressuspensado em 100 µL de solução tampão TE (10nM tris-Cl, 1mM EDTA ph8,0) (Aidar, 2005).

4.4 Análise dos polimorfismos genéticos

Com o auxílio de um termociclador convencional (*GeneAmp®PCR System 9600*), a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para a amplificação de fragmentos específicos dos genes estudados. Em seguida, para a identificação dos polimorfismos de nucleotídeo único foi utilizada a técnica de RFLP (polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição), na qual os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para a identificação dos alelos. Para o polimorfismo IL-1RN VNTR, a técnica de RFLP não foi aplicada, pois o produto da PCR permitiu a identificação dos 5 possíveis alelos que apresentam tamanhos diferentes de acordo com o número de repetições do fragmento de 86pb.

Finalmente, o produto total da PCR/RFLP foi misturado a 3 µL de tampão de amostra e submetido à eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 10 % sob corrente elétrica de 25 mA para a separação dos fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Posteriormente, os géis foram corados por sais de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994), possibilitando a visualização e interpretação dos resultados mediante comparação com padrão de massa molecular (*ϕX-174-RF DNA HaeIII digest, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*).

Todas as reações de PCR foram realizadas com um volume total de 50 µL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs e 2 unidades (U) de *Taq DNA polymerase*. Os *primers*, condições de amplificação e restrição dos polimorfismos estudados estão descritos a seguir.

4.4.1 Análise do polimorfismo IL-1A (-889C/T)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5'- AAGCTTGTTCTACCACCTGAACTAGGC - 3'

5'-TTACATATGAGCCTTCCATG - 3'

As soluções foram incubadas a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 min), 55°C (1 min) e 72°C (1 min), e extensão final de 72°C por 5 min. O fragmento amplificado apresentava 99 pb.

Após a reação de PCR, 12 µL do produto amplificado foram digeridos por 0,2 µL da enzima *NcoI* (10 U/µL – *Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) a 37°C ON para detecção do alelo C (16 pb + 83 pb) e do alelo T (99 pb) (Figura 1). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

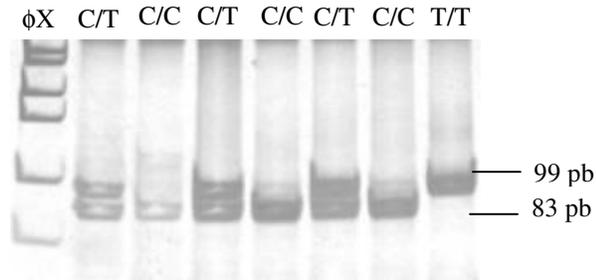


Figura 1 - Gel de poliacrilamida a 10% corado por sais de prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Nco* I) do polimorfismo IL-1A (-889C/T). C/T, pacientes heterozigotos; C/C, pacientes homozigotos para o alelo C; T/T, pacientes homozigotos para o alelo T; ϕ X, padrão de massa molecular.

4.4.2 Análise do polimorfismo IL-1B (-511C/T)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5'- TGGCATTGATCTGGTTCATC - 3'

5'- GTTTAGGAATCTTCCCACTT - 3'

As soluções foram incubadas a 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 min), 56°C (1 min) e 72°C (1 min), e extensão final de 72°C por 5 min. O fragmento amplificado apresentava 304 pb.

Após a reação de PCR, 12 μ L do produto amplificado foram digeridos por 0,2 μ L da enzima *Ava* I (10 U/ μ L – *Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) a 37°C ON para a detecção do alelo C (114 pb + 190 pb) e do alelo T (304 pb) (Figura 2). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

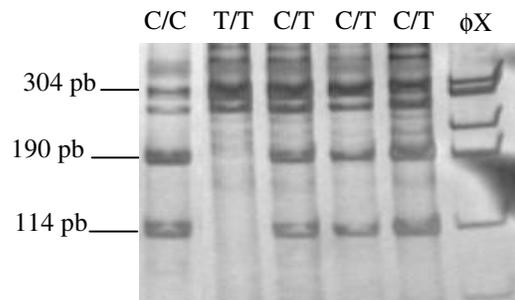


Figura 2 - Gel de poliacrilamida a 10% corado por sais de prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Ava* I) do polimorfismo IL-1B (-511C/T). C/T, pacientes heterozigotos; C/C, paciente homozigoto para o alelo C; T/T, paciente homozigoto para o alelo T; ϕ X, padrão de massa molecular.

4.4.3 Análise do polimorfismo IL-1B (+3953C/T)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5' - CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA - 3'

5' - GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG – 3'

As soluções foram incubadas a 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 min), 67,5°C (1 min) e 72°C (1 min), e extensão final de 72°C por 5 min. O fragmento amplificado apresentou 194 pb.

Após a reação de PCR, 12 µL do produto amplificado foram digeridos por 0,2 µL da enzima *Taq I* (10 U/µL – *Promega, Madison, WI, USA*) a 65°C ON para a detecção do alelo C (85 pb + 97 pb + 12 pb) e do alelo T (182 pb +12 pb) (Figura 3). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

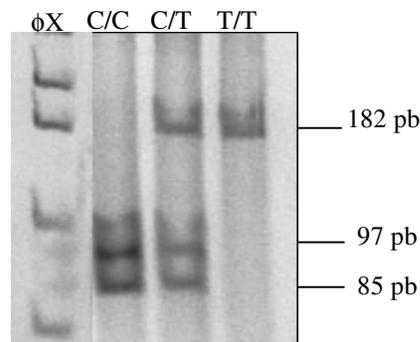


Figura 3 - Gel de poliacrilamida a 10% corado por sais de prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Taq I*) do polimorfismo IL-1B (+3953C/T). C/T, paciente heterocigoto; C/C, paciente homocigoto para o alelo C; T/T, paciente homocigoto para o alelo T; phiX, padrão de massa molecular.

4.4.4 Análise do polimorfismo IL-1RN VNTR (intron 2)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5'-CTCAGCAACTCCTAT-3'

5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'

As soluções foram incubadas a 96°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C (1 min), 60°C (1 min) e 70°C (1 min), e extensão final de 70°C por 3 min e 55°C por 3 min. A

análise desse polimorfismo não foi realizada por enzima de restrição, pois o próprio produto da amplificação permitiu a identificação dos alelos: alelo 1 (412 pb – 4 repetições), alelo 2 (240 pb – 2 repetições), alelo 3 (326 pb – 3 repetições), alelo 4 (498 pb – 5 repetições) e alelo 5 (584 pb – 6 repetições) (Figura 4). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

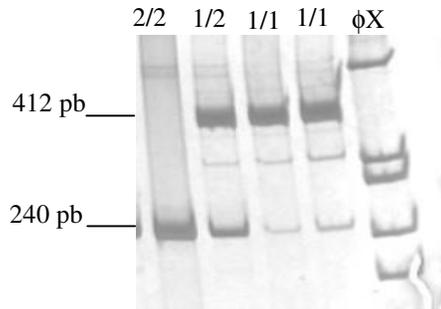


Figura 4 - Gel de poliacrilamida a 10% corado por prata, evidenciando produto da PCR do polimorfismo IL-1RN VNTR (intron 2). 1/2, paciente heterozigoto; 2/2, paciente homozigoto para o alelo 2; 1/1, pacientes homozigotos para o alelo 1; φX, padrão de massa molecular.

4.4.5 Análise do polimorfismo IL-6 (-174G/C)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5'-TTGTCAAGACATGCCAAGTGCT-3'

5'-GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC-3'

As soluções foram incubadas a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 min), 55°C (1 min) e 72°C (1 min), e por uma extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 299 pb.

Após a reação de PCR, 12 µL do produto amplificado foram digeridos por 0,2 µL da enzima *Hla* III (10 U/µL – *Q-biogene, Inc. Carlsbad, CA, USA*) a 37°C ON para detecção do alelo G (227 pb + 59 pb + 13 pb) e do alelo C (118 pb + 109 pb + 59 pb + 13 pb) (Figura 5). Esta técnica foi baseada em protocolo descrito por Olomolaiye *et al.* (1998).

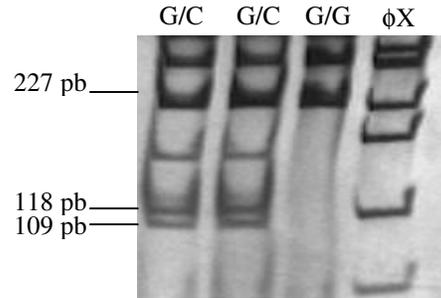


Figura 5 - Gel de poliácridamida a 10% corado por sais de prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Hla III*) do polimorfismo IL-6 (-174G/C). G/C, pacientes heterozigotos; G/G, paciente homozigoto para o alelo G; ϕX , padrão de peso molecular. Os fragmentos menores de DNA não são observados, pois saem do gel.

4.4.6 Análise do polimorfismo TNF-A (-308G/A)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5' AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT 3'

3' TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 5'

As soluções foram incubadas a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C (1 min), 60°C (1 min) e 72°C (1 min), e por uma extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 107 pb.

Após a reação de PCR, 12 μL do produto amplificado foram digeridos por 0, 2 μL da enzima *NcoI* (10 U/ μL – *Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) a 37°C ON para a detecção do alelo G (87 pb + 20 pb) e do alelo A (107 bp) (Figura 6). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

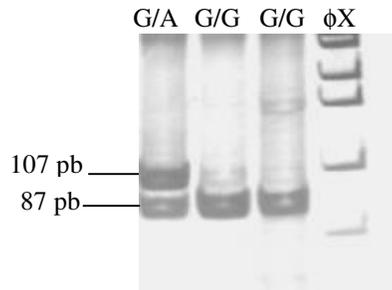


Figura 6 - Gel de poliácridamida a 10% corado por sais de prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Nco I*) do polimorfismo TNF-A (-308G/A). G/A, paciente heterozigoto; G/G, pacientes homozigotos para o alelo G; ϕX , padrão de massa molecular.

4.5 Análise estatística

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* de cada polimorfismo estudado foi calculado, tanto para o grupo teste como para o grupo controle, com auxílio do programa Arlequin ver. 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* determina a distribuição de genótipos homozigotos e heterozigotos de um polimorfismo em uma determinada população.

Como os genes da IL-1 se encontram próximos no mesmo cromossomo, foi calculado o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos para saber se estes estavam ocorrendo aleatoriamente ou em combinação. O desequilíbrio de ligação presente entre os *loci* polimórficos IL-1A (-889C/T), IL-1B (+3953C/T) e IL-1RN VNTR (intron 2) justificou a análise simultânea dos mesmos sob a forma de haplótipos. O cálculo do desequilíbrio de ligação e a determinação dos haplótipos foram realizados com auxílio do programa Arlequin ver.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

Todas as análises comparativas entre grupos teste e controle (dados do questionário, frequências dos alelos, genótipos e haplótipos) foram realizadas com auxílio do teste qui-quadrado (5%). O método de *Mantel-Haenszel* foi utilizado para o cálculo de *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) a 95% para estimar o risco de cada fator avaliado na ocorrência da doença. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Epi Info, ver. 6.04 (Dean *et al.*, 1990).

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas e fatores associados à doença

A média de idade apresentada pelos indivíduos do grupo teste foi 40,28 anos (15 – 76 anos), sendo que dos 92 pacientes estudados, 15 (16,30%) eram do gênero masculino e 77 (83,69%) do gênero feminino.

A avaliação das características clínicas revelou que a dor articular (associada ou não a outros sintomas, como dor muscular e/ou ruídos articulares) foi a queixa principal nos pacientes do grupo teste, acometendo 70 (76,08%) pacientes. Esses dados estão apresentados na figura 7.

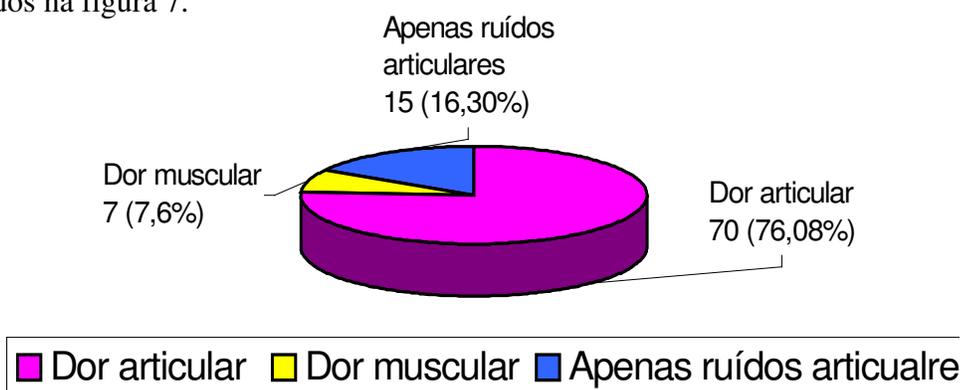


Figura 7 - Distribuição das características clínicas observadas entre os pacientes do grupo teste (n=92).

A duração dos sintomas variou muito entre os indivíduos do grupo teste, com média de 66,38 meses (variando de 7 dias a 420 meses). Treze (14,13%) pacientes apresentaram duração dos sintomas inferior a seis meses, enquanto que em 79 (85,86%) pacientes os sintomas tiveram duração superior a este período, caracterizando um processo crônico.

A tabela 1 apresenta a comparação das respostas do questionário entre os grupos analisados. Estresse e/ou ansiedade ($p=0,001$), uso freqüente de ansiolíticos ou antidepressivos ($p=0,000$), hábitos parafuncionais ($p=0,000$), histórico de trauma facial ($p=0,005$), queixas constantes de dores em outras articulações ($p=0,000$), presença de alterações sistêmicas ($p=0,000$) e histórico de familiares com DTM ($p=0,000$) mostraram-

se estatisticamente mais freqüentes nos pacientes do grupo teste, aumentando o risco de desenvolvimento de DTM. A condição da dentição ($p=0,292$) e o histórico de tratamento ortodôntico prévio ($p=0,521$) não demonstraram diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

Tabela 1 - Resultados das análises comparativas dos dados do questionário aplicado aos indivíduos dos grupos teste ($n=92$) e controle ($n=102$).

Dado analisado	Grupo teste n= 92 (%)	Grupo controle n = 102 (%)	χ^2	P	OR (IC 95%)
Consideram-se estressados e/ou ansiosos	n=59 (64,13)	n=42 (41,17)	10,21	0,001	2,55 (1,43-4,56)*
Uso freqüente de medicação antidepressiva ou ansiolítica	n=14 (15,21)	n=1 (0,93)	13,72	0,000	18,13 (2,33-140,85)*
Hábitos parafuncionais	n=70 (76,08)	n=39 (38,23)	29,56	0,000	5,14 (2,75-9,59)*
Histórico de trauma na face	n=16 (17,39)	n=5 (4,9)	7,82	0,005	4,08 (1,43-11,65)*
Histórico de tratamento ortodôntico anterior	n=19 (20,65%)	n=25 (24,5)	0,41	0,521	0,80 (0,41-1,58)
Dentição					
<i>Dentição completa</i>	n=45 (48,91)	n=63 (61,76)			1,0 (ref)
<i>Edêntulo total com prótese</i>	n=3 (3,26)	n=5 (4,9)	3,73	0,292	1,19 (0,27-5,24)
<i>Edêntulo parcial com prótese</i>	n=14 (15,21)	n=10 (9,8)			0,51 (0,21-1,25)
<i>Edêntulo parcial sem prótese</i>	n=31 (33,69)	n=27 (26,47)			0,62 (0,33-1,18)
Dores constantes em outras articulações	n=34 (36,95)	n=15 (14,70)	12,69	0,000	3,40 (1,70-6,80)*
Presença de alterações sistêmicas	n=19 (20,65)	n=4 (3,92)			
	n=9 osteoporose	n=3 osteoporose			
	n=4 diabetes	n=1 diabetes			
	n=3 psoríase				
	n=1 artrite reumatóide		12,96	0,000	6,38 (2,08-19,54)*
	n=1 febre reumática				
	n=1 hanseníase				
Familiares com histórico de DTM	n=41 (44,56)	n=21 (20,58)	12,79	0,000	3,10 (1,65-5,83)*

* Dados significativos

5.2 Análise dos polimorfismos nos genes da IL-1

O polimorfismo IL-1RN (intron 2) não alcançou o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos devido a um menor número de genótipos heterozigotos observado do que o esperado ($p < 0,05$). Em decorrência do excesso de genótipos heterozigotos ($p < 0,05$) no grupo controle, o mesmo equilíbrio também não foi alcançado pelas frequências alélicas do polimorfismo IL-1B (+3953C/T) apenas neste grupo. As demais frequências alélicas observadas em cada *locus* polimórfico se mostraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p > 0,05$).

O polimorfismo IL-1RN (intron 2) apresenta cinco possíveis alelos, sendo A1 e A2 os mais frequentes. O grupo teste apresentou 3 pacientes portadores do genótipo A1/A3 e 4 pacientes portadores do genótipo A1/A4. No grupo controle não foi detectado o alelo 3, entretanto, 4 indivíduos apresentaram o genótipo A1/A4, 1 indivíduo demonstrou o genótipo A4/A4 e o genótipo A2/A5 foi detectado em 3 voluntários. Estes genótipos menos frequentes foram agrupados como genótipos raros (Tabela 2).

A presença do genótipo C/T do polimorfismo IL-1A (-889C/T) aumentou em aproximadamente 2 vezes o risco em desenvolver DTM (OR: 1,87). Considerando o polimorfismo IL-1B (+3953C/T), o alelo C e genótipo C/C mostraram maior ocorrência no grupo teste ($p = 0,000$), aumentando em 3,24 e 6,35 vezes o risco de desenvolvimento de DTM, respectivamente. O genótipo T/T deste polimorfismo não foi observado em nenhum indivíduo de ambos os grupos. Os demais *loci* polimórficos da IL-1 apresentaram distribuição similar dos alelos e genótipos entre os grupos analisados (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos IL-1A (-889C/T), IL-1B (-511C/T), IL-1B (+3953C/T) e IL-1RN (intron 2) entre os indivíduos dos grupos teste (n=92) e controle (n=102).

Polimorfismo	Grupo Teste n=92 (%)	Grupo Controle n=102 (%)	χ^2	P	OR (IC 95%)
IL-1A (-889C/T)					
Alelo C	129 (70,10)	157 (76,96)	2,34	0,12	0,70 (0,45-1,11)
Alelo T	55 (29,89)	47 (23,03)			
Genótipo C/C	42 (45,65)	61 (59,80)	4,34	0,114	1,0 (ref)
Genótipo C/T	45 (48,91)	35 (34,31)			1,87 (1,03-3,37)*
Genótipo T/T	5 (5,43)	6 (5,88)			1,21 (0,35-4,23)
IL-1B (-511C/T)					
Alelo C	103 (55,97)	108 (52,94)	0,36	0,548	
Alelo T	81 (44,02)	96 (47,05)			
Genótipo C/C	26 (28,26)	24 (23,50)	0,57	0,752	1,0 (ref)
Genótipo C/T	51 (55,43)	60 (58,82)			0,78 (0,40-1,53)
Genótipo T/T	15 (16,30)	18 (17,64)			0,77 (0,32-1,86)
IL-1B (+3953C/T)					
Alelo C	156 (84,78)	129 (63,23)	23,03	0,000	3,24 (1,98-5,30)*
Alelo T	28 (15,21)	75 (36,76)			
Genótipo C/C	64 (69,56)	27 (26,47)	36,07	0,000	6,35 (3,40-11,86)*
Genótipo C/T	28 (30,43)	75 (73,52)			1,0 (ref)
Genótipo T/T	-	-			
IL-1RN (intron 2)					
Alelo 1	156 (84,78)	174 (85,29)	0,11	0,738	
Alelo 2	21 (11,41)	21 (10,29)			
Alelos raros	7 (3,80)	9 (4,41)			
Genótipo 1/1	71 (77,17)	78 (76,47)	5,0	0,171	1,0 (ref)
Genótipo 1/2	7 (7,60)	14 (13,72)			0,55 (0,21-1,44)
Genótipo 2/2	7 (7,60)	2 (1,96)			3,85 (0,77-19,12)
Genótipos raros	7 (7,60)	8 (7,84)			0,96 (0,33-2,79)

* Dados significativos

Os *loci* polimórficos IL-1B (+3953C/T), IL-1A (-889C/T) e IL-1RN (intron 2) se mostraram em desequilíbrio de ligação nos grupos estudados ($p < 0,05$). Este fato justificou a análise simultânea dos mesmos sob a forma de haplótipos. O programa Arlequin ver.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005) forneceu a existência de 13 haplótipos (dados não apresentados) na população estudada, porém apenas 5 deles se mostraram frequentes em ambos os grupos. A distribuição dos 5 haplótipos mais frequentes apresentou diferença estatística significativa entre os grupos teste e controle. Indivíduos portadores do haplótipo

TC1 se mostraram significativamente menos propensos para desenvolver DTM (OR: 0,11) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das frequências haplotípicas dos polimorfismos IL-1B (+3953C/T), IL-1A (-889C/T) e IL-1RN (intron 2) entre os grupos teste (n=92) e controle (n=102).

Haplótipos (IL-1B+3953/ IL-1A-889 / IL-1RN)	Grupo Teste n=184 (%)	Grupo Controle n=204 (%)	χ^2	P	OR (IC 95%)
CC1	103 (55,97)	90 (44,11)			1,0 (ref)
TC1	5 (2,71)	38 (18,62)	31,78	0,000	0,11 (0,04-0,30)*
TT1	21 (11,41)	32 (15,68)			0,57 (0,31-1,06)
CC2	17 (9,23)	17 (8,33)			0,87 (0,42-1,81)
CT1	27 (14,67)	14 (6,86)			1,69 (0,83-3,41)
Haplótipos raros	11 (5,97)	13 (6,37)			0,74 (0,32-1,73)

* Dado significativo

5.3 Análise dos polimorfismos IL-6 (-174G/C) e TNF-A (-308G/A)

As frequências alélicas dos polimorfismos IL-6 (-174G/C) e TNF-A (-308G/A) mostraram-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nos grupos estudados ($p > 0,05$).

Considerando o polimorfismo IL-6 (-174G/C), indivíduos portadores do alelo C e do genótipo C/G apresentaram, respectivamente, um risco 1,60 e 1,98 vezes maior em desenvolver DTM. As frequências alélica e genotípica do polimorfismo TNF-A (-308G/A) não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando os dois grupos foram comparados (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos IL-6 (-174G/C) e TNF-A (-308G/A) entre os indivíduos dos grupos teste (n=92) e controle (n=102).

Polimorfismo	Grupo Teste n=92 (%)	Grupo Controle n=102 (%)	χ^2	<i>P</i>	OR (IC 95%)
IL-6 (-174G/C)					
<i>Alelo C</i>	54 (29,34)	42 (20,58)	3,99	0,045	1,60 (1,01-2,55)*
<i>Alelo G</i>	130 (70,65)	162 (79,41)			
<i>Genótipo C/C</i>	8 (8,69)	7 (6,86)	4,98	0,083	1,66 (0,56-4,91)
<i>Genótipo C/G</i>	38 (41,30)	28 (27,45)			1,98 (1,07-3,66)*
<i>Genótipo G/G</i>	46 (50)	67 (65,68)			1,0 (ref)
TNF-A (-308G/A)					
<i>Alelo A</i>	25 (13,58)	19 (9,31)	1,76	0,185	
<i>Alelo G</i>	159 (86,41)	185 (90,68)			
<i>Genótipo A/A</i>	3 (3,26)	1 (0,98)	1,87	0,391	3,60 (0,37-35,38)
<i>Genótipo G/A</i>	19 (20,65)	17 (16,66)			1,34 (0,65-2,78)
<i>Genótipo G/G</i>	70 (76,08)	84 (82,35)			1,0 (ref)

* Dados significativos

6. DISCUSSÃO

Dos 92 pacientes com imagens de alterações degenerativas da ATM, 15 (16,30%) eram do gênero masculino e 77 (83,69%) do gênero feminino, apresentando média de idade de 40,28 anos (15–76 anos). Esses dados corroboram estudos epidemiológicos (Carlsson, 1999; Johansson *et al.*, 2003; Magnusson *et al.*, 2005 Casanova-Rosado *et al.*, 2006) que demonstraram maior prevalência de DTMs (principalmente associadas a sintomas dolorosos) em mulheres. Este fenômeno ainda não apresenta uma explicação definitiva, entretanto, sugere-se que hormônios sexuais devem estar envolvidos, como o estrógeno em atuação com os receptores de estrógeno- α e - β (Era e ER β) (Yamada *et al.*, 2003; Flake *et al.*, 2005). Polimorfismos genéticos no Era foram associados a maior percepção de dor em mulheres com OA e desarranjo interno da ATM, entretanto, não se sabe de que maneira estes polimorfismos podem influenciar o efeito do estrógeno na percepção da dor em DTMs (Ribeiro, 2005; Kang *et al.*, 2007).

No presente estudo, a dor articular foi a queixa principal de 70 (76,08%) pacientes do grupo teste, confirmando a relação entre alterações degenerativas da ATM e sintomatologia dolorosa da região (Bertram *et al.*, 2001; Emshoff *et al.*, 2002; Kurita *et al.*, 2004). Entretanto, a presença de 15 (16,30%) pacientes com alterações degenerativas que se queixaram apenas de ruídos articulares sugere que, em alguns indivíduos, os tecidos articulares devem sofrer um processo de adaptação sem desencadear uma percepção dolorosa. Os fatores responsáveis pelas diferentes respostas interindividuais às alterações na ATM ainda não estão completamente esclarecidos, podendo ter uma natureza local, psicológica ou sistêmica, bem como uma pré-disposição genética.

A aplicação do questionário em indivíduos dos grupos teste e controle demonstrou que fatores como estresse e ansiedade ($p=0,001$), presença de hábitos parafuncionais ($p=0,000$) e histórico de trauma na face ($p=0,005$) devem contribuir para o desenvolvimento de DTMs. Tais fatores foram considerados de risco para o desenvolvimento de sinais e sintomas de DTMs por estudos anteriores (Huang *et al.*, 2002; Johansson *et al.*, 2003; Martinez-Blanco *et al.* 2004; Mohlin *et al.*, 2004; Magnusson *et al.*, 2005; Casanova-Rosado *et al.*, 2006). A aplicação de questionários fornece dados de

natureza subjetiva, logo, os resultados observados devem ser interpretados com precaução. Desta forma, as associações estatisticamente significativas aqui apresentadas não provam uma relação de causa-efeito entre os fatores identificados e o desenvolvimento de DTMs.

O impacto de fatores oclusais sobre o desenvolvimento de DTMs ainda não está bem estabelecido. Em revisão de literatura realizada por Mohlin *et al.* (2007), associação significativa entre tais fatores e DTMs foi demonstrada por alguns estudos, entretanto, a maioria dos artigos analisados não apresentou associação significativa ou clinicamente relevante. Sugere-se que o sistema mastigatório apresenta uma grande capacidade de adaptação, portanto, indivíduos que sofrem perda de dentes podem apresentar uma função mastigatória aceitável sem aumento da ocorrência de sinais e sintomas de DTMs (Casanova-Rosado *et al.*, 2006). A condição da dentição (perda de dentes e uso de prótese) não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,292$) entre os grupos analisados. Entretanto, os resultados aqui apresentados não permitem uma conclusão sobre a influência de fatores oclusais nas DTMs, já que não foi realizada uma avaliação clínica dos voluntários para registro de interferências oclusais e maloclusão.

A experiência prévia de tratamento ortodôntico não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,521$) entre os grupos estudados. A influência de tratamento ortodôntico sobre o desenvolvimento de DTMs é um assunto controverso, entretanto, estudos longitudinais recentes afirmam que este tipo de tratamento não aumenta ou reduz o risco de desenvolvimento de DTMs (Mohlin *et al.*, 2004; Egermark *et al.*, 2005; Magnusson *et al.*, 2005).

A presença de dores constantes em outras articulações ($p=0,000$), o histórico de alterações sistêmicas ($p=0,000$) e o histórico familiar de DTM ($p=0,000$) se mostraram mais frequentes nos pacientes do grupo teste do que nos indivíduos do grupo controle. Em estudos prospectivos, observou-se que a dor em outras partes do corpo é um fator de risco para o desenvolvimento de DTM de natureza dolorosa em mulheres na idade adulta (John *et al.*, 2003) e na adolescência (LeResche *et al.*, 2007). A partir da aplicação de 5.696 questionários, Sipilä *et al.* (2006) observaram que mais da metade dos indivíduos com dor facial apresentaram em comorbidade dores em outras regiões do corpo. Esses dados podem

sugerir a existência para determinados indivíduos de uma pré-disposição à dor musculoesquelética em diversas regiões do corpo, incluindo a região orofacial. Esta pré-disposição pode estar baseada em fatores genéticos (LeResche *et al.*, 2007).

Dezenove (20,65%) pacientes do grupo teste relataram histórico de alterações sistêmicas, incluindo osteoporose (9 pacientes), diabetes (4 pacientes), psoríase (3 pacientes), artrite reumatóide (1 paciente), febre reumática (1 paciente) e hanseníase (1 paciente). Esses achados estão de acordo com estudos que sugerem uma possível associação de condições sistêmicas, como osteoporose (Gruber & Gregg, 2003), diabetes (Collin *et al.*, 2000), artrite reumatóide (Helenius *et al.*, 2005) e artrite psoriática (Dervis & Dervis, 2005), com sinais e sintomas de DTM. Johansson *et al.* (2006), através da aplicação de questionários em 12.468 indivíduos, observaram maior prevalência de sinais e sintomas de DTM em voluntários que relataram ter saúde geral debilitada. Adicionalmente, foi constatado que tratamentos para alterações sistêmicas, como a terapia com drogas anti-TNF- α para a artrite reumatóide, resultam também em melhoras na sintomatologia dolorosa da ATM, além de outras articulações (Moen *et al.*, 2005). Esses achados reforçam a idéia de que alterações na ATM podem apresentar patofisiologia comum a desordens musculoesqueléticas generalizadas e de que a resposta imunológica do paciente parece ter um papel relevante neste processo.

Os resultados desta pesquisa reforçam a natureza multifatorial das DTMs, entretanto, embora não apresentem a contribuição relativa dos fatores em cada paciente. Casanova-Rosado *et al.* (2006) propõem que no modelo etiológico multifatorial proposto para as DTMs as variáveis interagem entre si e, portanto, não devem ser estudadas de uma maneira independente. Posteriormente, os dados apresentados pelo presente estudo deverão ser estudados em análises multivariadas para demonstrar de forma apropriada a associação entre os diversos fatores envolvidos na doença.

Considerando-se que mesmo apresentando fatores locais, alguns indivíduos podem não desenvolver sinais e sintomas de DTM, a resposta tecidual deve desempenhar papel fundamental no estabelecimento da doença (Stegenga *et al.*, 1991). Neste contexto, torna-se relevante a investigação de uma pré-disposição genética. Recentemente, em estudo

prospectivo com 170 mulheres, polimorfismos no gene da catecol-O-metiltransferase (COMT), enzima cuja atividade influencia de forma substancial a sensibilidade à dor, foram associados à dor miofascial relacionada a DTM (Diatchenko *et al.*, 2005). Acredita-se que haplótipos específicos destes polimorfismos alteram a estrutura secundária do RNAm, influenciando a tradução protéica e, desta forma, também a atividade enzimática (Nackley *et al.*, 2006). Estes resultados apresentam importantes contribuições na tentativa de determinar uma influência genética sobre o desenvolvimento de DTMs, porém não apresentaram a influência de outros possíveis fatores no estabelecimento da doença.

O presente estudo parece ser o primeiro a analisar a ocorrência de polimorfismos nos genes da IL-1, IL-6 e TNF- α em pacientes portadores de DTMs. Portanto, não foi possível uma comparação direta dos resultados aqui apresentados com estudos prévios.

O alelo T do polimorfismo IL-1A (-889C/T) foi previamente associado ao aumento da transcrição gênica e dos níveis plasmáticos de IL-1 α (Dominici *et al.*, 2002) e de IL-1 β (Hulkkonen *et al.*, 2000), bem como, à suscetibilidade de artrite idiopática juvenil na população norueguesa (McDowell *et al.*, 1995), artrite psoriática na população inglesa (Ravidran *et al.*, 2004) e doença periodontal crônica na população brasileira (Moreira *et al.*, 2007). Esses dados estão de acordo com o resultado do presente estudo de que a presença do genótipo C/T aumentou cerca de 1,87 vezes (OR: 1,87) o risco de desenvolvimento de DTM em comparação ao genótipo C/C, sugerindo o potencial do alelo T em predispor à doença. Este alelo se mostrou mais freqüente no grupo teste do que no controle (29,89% vs 23,03%), apesar da ausência de diferença significativa entre os grupos. Como o genótipo T/T mostrou uma baixa freqüência na população (5 e 6 indivíduos no grupo teste e controle, respectivamente), uma amostra com maior número de indivíduos possivelmente evidenciaria o real risco deste alelo à doença.

O polimorfismo IL-1B (+3953C/T) apresentou freqüências alélica ($p=0,000$) e genotípica ($p=0,000$) significativamente diferentes entre os grupos analisados. O alelo C mostrou-se significativamente mais freqüente no grupo teste do que no controle (84,78% vs 63,23%), o mesmo ocorrendo com o genótipo C/C (69,56% vs 26,47%). O alelo e genótipo

referidos apresentaram aproximadamente 3,24 e 6,35 vezes maior risco de desenvolvimento de DTM, respectivamente. Em resultados semelhantes, o alelo T apresentou efeito protetor para o lupus eritematoso sistêmico na população colombiana e foi associado a uma produção diminuída de IL-1 β por monócitos (Camargo *et al.*, 2004). Entretanto, esses resultados divergem da maioria da literatura que associa o alelo T a níveis elevados de IL-1 β (Pociot *et al.*, 1992) e à suscetibilidade para doenças reumáticas, como a artrite reumatóide (Buchs *et al.*, 2001).

As frequências alélicas e genotípicas do IL-1B (-511C/T) e IL-1RN apresentaram distribuição similar entre os grupos analisados. Anteriormente, foi relatada ausência de associação dos referidos polimorfismos com artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico na população colombiana (Camargo *et al.*, 2004), gota na população chinesa (Chen *et al.*, 2005) e artrite reumatóide nas populações indiana (Grover *et al.*, 2006), francesa (Buchs *et al.*, 2001) e italiana (Tolusso *et al.*, 2006).

Em doenças multifatoriais, considera-se que a análise de haplótipos forneça um risco estimado superior em relação à análise dos alelos de forma independente (Mittal *et al.*, 2007). No presente estudo observou-se desequilíbrio de ligação entre os *loci* IL-1B(+3953), IL-1A(-889) e IL-1RN, sugerindo uma associação não aleatória dos alelos nas populações estudadas e justificando sua análise simultânea sob a forma de haplótipos. A distribuição das frequências haplotípicas se mostrou diferente entre os grupos analisados (p=0,000). A combinação TC1 dos respectivos *loci* polimórficos mostrou-se como um fator protetor no desenvolvimento de DTM, aumentando a proteção em 0,11 vezes em relação ao haplótipo CC1, mais frequente nos grupos teste (55,97%) e controle (44,11%).

Estudos demonstram que polimorfismos da IL-1 atuam em cooperação para influenciar os níveis plasmáticos desta citocina. Hurme & Santtila (1998) observaram que em indivíduos saudáveis, o alelo 2 (IL-1RN intron 2) estava associado a elevados níveis plasmáticos de IL-1ra na presença do alelo T (IL1B-511) ou na ausência do alelo T (IL1B+3953). Já em estudo *in vitro* com leucócitos mononucleares, o alelo 2 (IL-1RN intron 2) se relacionou com produção elevada de IL-1 β , independente da presença dos alelos do IL1B-511 ou IL1B+3953 (Santtila *et al.*, 1998). Os resultados da análise de

haplótipos apresentados pelo presente estudo sugerem que a combinação dos alelos deve influenciar o mecanismo da doença, entretanto, não se sabe qual o efeito destes haplótipos sobre a expressão gênica da IL-1 ou mesmo sobre a produção da proteína. O mecanismo de atuação destes haplótipos deverá ser esclarecido em investigações posteriores.

As citocinas pró-inflamatórias não atuam de forma isolada nos tecidos. Além de interagirem entre si, sua ligação com receptores determina a atividade destes mediadores na progressão ou supressão de doenças. Existem dois tipos de receptores de superfície celular da IL-1: o receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI) e receptor de IL-1 tipo II (IL-1RII). Após ligação com a IL-1, o primeiro é responsável pela indução de sinal intracelular, enquanto, o segundo é inativo. Adicionalmente, a forma solúvel do IL-1RII (sIL-1RII) atua similarmente ao IL-1ra, ligando-se a IL-1 para impedir a ligação celular desta citocina (Mantovani *et al.*, 2001). Em análise do fluido sinovial, pacientes com DTM apresentaram níveis elevados de sIL-1RII quando comparados a indivíduos do grupo controle. Adicionalmente, níveis de sIL-1RII foram positivamente correlacionados com níveis de IL-1 β e TNF- α (Tominaga *et al.*, 2004; Kaneyama *et al.*, 2005). A análise destes genes contribuiria para o melhor entendimento da influência dos polimorfismos genéticos da IL-1 sobre o desenvolvimento de DTMs.

No presente estudo, os alelos e genótipos do polimorfismo TNF-A (-308G/A) se distribuíram de forma similar entre os grupos analisados. Estudos caso-controle anteriores apresentaram distribuição alélica parecida e também não encontraram associação entre este polimorfismo e a artrite idiopática juvenil na população francesa (Cimaz *et al.*, 2007), artrite psoriática na população canadense (Rahman *et al.*, 2006) e hepatite auto-imune na população brasileira (Bittencourt *et al.*, 2001).

A contribuição de um único polimorfismo num simples *locus* pode não ser tão grande, portanto, a ausência de associação entre o TNF-A (-308G/A) neste estudo não significa que este gene não exerça influência na doença. Apesar desta limitação, a análise de um SNP não deve ser descartada, pois o mesmo pode fazer parte de um haplótipo com efeito sobre a expressão ou função proteica. Essa ligação gênica pode ocorrer em determinados indivíduos e não em outros. Outros polimorfismos descritos no gene TNF-A

mostraram-se em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo aqui estudado (Perry *et al.*, 2001) e parecem estar associados com elevada produção de TNF- α e doenças, como o Alzheimer (Perry *et al.*, 2001) e artrite psoriática (Rahman *et al.*, 2006). Posteriormente, a análise de um número maior de SNPs nos genes do TNF- α contribuirá para o esclarecimento da real influência destes genes sobre o desenvolvimento e severidade das DTMs.

Considerando o polimorfismo IL-6 (-174G/C) no presente estudo, o alelo C foi associado à doença, apresentando-se significativamente mais freqüente ($p=0,045$) no grupo teste do que no controle (29,34% vs 20,58%) e aumentando em 1,60 vezes o risco da doença. Indivíduos portadores do genótipo C/G apresentaram um risco 1,98 vezes maior em desenvolver DTM do que os portadores do genótipo G/G. A ausência de associação do genótipo C/C no presente estudo se deve, possivelmente, à baixa freqüência deste na população estudada: 8,69% no grupo teste e 6,86% no grupo controle. Apesar de estatisticamente significativa, não houve uma diferença alélica acentuada entre os dois grupos, o que torna questionável a importância clínica destes achados. Em estudos caso-controle na população brasileira, o genótipo C/C e alelo C foram associados com abortos espontâneos recorrentes (von Linsingen *et al.*, 2005), bem como, com a suscetibilidade em desenvolver leishmaniose mucosa (Castellucci *et al.*, 2006). Os autores sugerem que tais associações estão relacionadas à menor produção de IL-6, decorrente da presença do alelo C. A presença deste originaria sítios potenciais de ligação para fatores de transcrição que agem como repressores da expressão gênica.

Terry *et al.* (2000) compararam a influência do polimorfismo IL-6 (-174G/C), atuando individualmente e em combinação com outros 3 polimorfismos na região promotora (-596G/A, -572G/C e -373A_nT_n), sobre a transcrição em dois tipos celulares: HeLa (células tipo epitelial) e ECV304 (células tipo endotelial). Observou-se que a regulação da transcrição gênica da IL-6 é específica para o tipo celular e este fato deve ser considerado no estudo genético de diferentes patologias. Diferenças na transcrição da IL-6 resultaram de diferentes haplótipos e não do efeito individual do polimorfismo IL-6 (-

174G/C), sugerindo que polimorfismos em *loci* distintos atuam de forma interdependente por meio de interações complexas.

O polimorfismo IL-1RN (intron 2) não alcançou o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos, o mesmo ocorrendo com o polimorfismo IL-1B (+3953C/T) no grupo controle. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* determina a distribuição de genótipos homozigotos e heterozigotos em uma determinada população, podendo não ser alcançado se a amostra do estudo foi uma representação inadequada da população ou se fatores como mutações, seleção natural e a migração de indivíduos estão alterando a composição genética da população (Nussbaum *et al.*, 2002). Como as frequências alélicas dos demais *loci* analisados mostraram-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, a primeira hipótese foi excluída. A ausência de equilíbrio nos polimorfismos IL-1RN e IL-1B (+3953C/T) deve ser decorrente da baixa frequência do genótipo A2/A2 e ausência do genótipo T/T, respectivamente, na população estudada. Tais frequências estão de acordo com estudos anteriores na população americana (Stern *et al.*, 2003), chinesa (Chen *et al.*, 2005) e brasileira (Guimarães *et al.*, 2007).

Estudos que visam identificar marcadores genéticos da suscetibilidade de doenças complexas envolvem limitações como a heterogeneidade clínica e as diferentes frequências alélicas entre as diferentes etnias, proporcionando a associação de um determinado SNP em uma população e não em outra. Tais limitações devem também ser consideradas no presente estudo, como os diferentes períodos de duração da doença apresentados pelos pacientes do grupo teste e a ausência de exames de imagem da ATM nos indivíduos do grupo controle. Futuramente, a análise destes polimorfismos em indivíduos com diferentes subtipos de DTM estabelecerá a influência genética sobre a severidade da doença, enquanto que sua investigação em diferentes populações validará os resultados aqui apresentados.

Adicionalmente, em amostras do fluido e tecidos sinoviais de ATM com desarranjo interno foi detectada expressão aumentada de outros mediadores inflamatórios, como a ciclooxigenase-2 (Quinn *et al.*, 2000), e fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiogenina (Ang) e fator de crescimento

fibroblástico (FGF) (Matsumoto *et al.*, 2006). Baixas concentrações do fator inibidor de osteoclastogênese/osteoprogesterina (OCIF/OPG) foram ainda detectadas no fluido sinovial de pacientes com alterações ósseas no côndilo, sugerindo a participação deste mediador na indução de OA (Kaneyama *et al.*, 2003). Desta forma, dependendo do tipo de DTM, outros genes podem ter uma maior influência no desenvolvimento e/ou severidade da doença e deverão ser investigados em pesquisas futuras.

Sintomas de DTMs são comuns tanto na infância como na fase adulta, havendo uma flutuação substancial dos mesmos durante os anos. Entretanto, a progressão para quadros severos de dor e disfunção parece ser um evento raro (Magnusson *et al.*, 2005). ‘Porque a dor se torna crônica em apenas alguns indivíduos?’ ainda é uma questão que permanece sem resposta. A identificação de fatores genéticos, ambientais e comportamentais fornecerá um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de alterações articulares e no desencadeamento das respostas dolorosas. Desta forma, poderão ser estabelecidas bases científicas que proporcionem em vez de tratamentos paliativos, terapias teciduais capazes de reverter o processo patológico. Neste contexto, investigações genéticas poderão identificar indivíduos com alto risco às desordens severas, possibilitando terapias individualizadas e um melhor prognóstico.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados aqui apresentados e discutidos, concluiu-se que:

- Polimorfismos nos genes da IL-1 se mostraram associados ao desenvolvimento de DTM na população estudada. polimorfismo IL-6 (-174G/C) se mostrou associado ao desenvolvimento de DTM na população estudada. O polimorfismo TNF-A (-308G/A) não se mostrou associado ao desenvolvimento de DTM na população estudada. Fatores locais, psicológicos e sistêmicos devem atuar em conjunto para o desenvolvimento de desordens temporomandibulares.

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.

Aidar M. *Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando Acetato de amônio [dissertação]*. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Alstergren P, Benavente C, Kopp S. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, and interleukin-1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61(10): 1171-8.

Arabshahi B, Cron RQ. Temporomandibular joint arthritis in juvenile idiopathic arthritis: the forgotten joint. *Curr Opin Rheumatol*. 2006; 18(5): 490-5.

Ardic F, Gokharman D, Atsu S, Guner S, Yilmaz M, Yorgancioglu R. The comprehensive evaluation of temporomandibular disorders seen in rheumatoid arthritis. *Aust Dent J*. 2006; 51(1): 23-8.

Atsu SS, Ayhan-Ardic F. Temporomandibular disorders seen in rheumatology practices: A review. *Rheumatol Int*. 2006; 26(9): 781-7.

Bathi RJ, Taneja N, Parveen S. Rheumatoid arthritis of TMJ--a diagnostic dilemma? *Dent Update*. 2004; 31(3): 167-74.

Baykul T, Aydin MA, Nasir S. Avascular necrosis of the mandibular condyle causing fibrous ankylosis of the temporomandibular joint in sickle cell anemia. *J Craniofac Surg*. 2004; 15(6): 1052-6.

Bertram S, Rudisch A, Innerhofer K, Pumpel E, Grubwieser G, Emshoff R. Diagnosing TMJ internal derangement and osteoarthritis with magnetic resonance imaging. *J Am Dent Assoc*. 2001; 132(6): 753-61.

* 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.

- Bittencourt PL, Palacios SA, Cancado EL, Porta G, Drigo S, Carrilho FJ *et al.* Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor alpha polymorphisms at position -308. *J Hepatol.* 2001; 35(1): 24-8.
- Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun.* 2001; 2(4): 222-8.
- Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J, Anaya JM. Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. *Genes Immun.* 2004; 5(8): 609-14.
- Carlsson GE. Epidemiology and treatment need for temporomandibular disorders. *J Orofac Pain.* 1999; 13(4): 232-7.
- Casanova-Rosado JF, Medina-Solis CE, Vallejos-Sanchez AA, Casanova-Rosado AJ, Hernandez-Prado B, Avila-Burgos L. Prevalence and associated factors for temporomandibular disorders in a group of Mexican adolescents and youth adults. *Clin Oral Investig.* 2006; 10(1): 42-9.
- Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M *et al.* IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis.* 2006; 194(4): 519-27.
- Chen ML, Huang CM, Tsai CH, Tsai FJ. Interleukin-1beta gene polymorphisms in Taiwanese patients with gout. *Rheumatol Int.* 2005; 25(3): 179-82.
- Cimaz R, Cazalis MA, Raynaud C, Gerloni V, Zulian F, Biggioggero M *et al.* IL-1 and TNF gene polymorphisms in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with tnf inhibitors. *Ann Rheum Dis.* 2007;26 (*in press*).
- Collin HL, Niskanen L, Uusitupa M, Toyry J, Collin P, Koivisto AM *et al.* Oral symptoms and signs in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. A focus on diabetic neuropathy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 90(3): 299-305.

-
- Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers*. 1995a; 12(2): 127-33.
- Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol*. 1995b; 99(2): 303-10.
- De Bont LG, Stegenga B. Pathology of temporomandibular joint internal derangement and osteoarthritis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1993; 22(2): 71-4.
- De Leeuw R, Boering G, van der Kuijl B, Stegenga B. Hard and soft tissue imaging of the temporomandibular joint 30 years after diagnosis of osteoarthritis and internal derangement. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996; 54(11): 1270-80.
- Dean AD, Dean JA, Burton JH, Dicker RC. *Epi Info* [programa de computador]. Version 5: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta (Georgia): Centers for Disease Control; 1990.
- Dervis E, Dervis E. The prevalence of temporomandibular disorders in patients with psoriasis with or without psoriatic arthritis. *J Oral Rehabil*. 2005; 32(11): 786-93.
- Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I *et al*. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet*. 2005; 14(1): 135-43.
- Diatchenko L, Anderson AD, Slade GD, Fillingim RB, Shabalina SA, Higgins TJ *et al*. Three major haplotypes of the beta2 adrenergic receptor define psychological profile, blood pressure, and the risk for development of a common musculoskeletal pain disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006; 141(5): 449-62.
- Di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). *Hum Mol Genet*. 1992; 1(6): 450.

-
- Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM *et al.* Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics*. 2002; 54(2): 82-6.
- Egermark I, Carlsson GE, Magnusson T. A prospective long-term study of signs and symptoms of temporomandibular disorders in patients who received orthodontic treatment in childhood. *Angle Orthod*. 2005; 75(4): 645-50.
- Emshoff R, Puffer P, Rudisch A, Gassner R. Temporomandibular joint pain: relationship to internal derangement type, osteoarthritis, and synovial fluid mediator level of tumor necrosis factor-alpha. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000; 90(4): 442-9.
- Emshoff R, Rudisch A, Innerhofer K, Bosch R, Bertram S. Temporomandibular joint internal derangement type III: relationship to magnetic resonance imaging findings of internal derangement and osteoarthritis. An intraindividual approach *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 30(5): 390-6.
- Emshoff R, Innerhofer K, Rudisch A, Bertram S. The biological concept of "internal derangement and osteoarthritis": a diagnostic approach in patients with temporomandibular joint pain? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(1): 39-44.
- Excoffier, Laval LG, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005; 1: 47-50.
- Fang PK, Ma XC, Ma DL, Fu KY. Determination of interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 in synovial fluid aspirates of patients with temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999; 57(8): 922-9.
- Farah SB. DNA e a lei. In: Farah SB. DNA, segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier; 1997. p. 173-83.

-
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998; 102(7): 1369-76.
- Flake NM, Bonebreak DB, Gold MS. Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. *J Neurophysiol.* 2005; 93(3): 1585-97.
- Fu K, Ma X, Zhang Z, Chen W. Tumor necrosis factor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 53(4): 424-6.
- Goldblatt F, Highton J, Kumara GR. Temporomandibular joint pseudogout: an uncommon site for a familiar condition. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63(12): 1706-7.
- Greene CS. The etiology of temporomandibular disorders: implications for treatment. *J Orofac Pain.* 2001; 15(2): 93-116.
- Grover S, Tandon S, Misra R, Aggarwal A. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis in India. *Indian J Med Res.* 2006; 123(6): 815-20.
- Gruber HE, Gregg J. Subchondral bone resorption in temporomandibular joint disorders. *Cells Tissues Organs.* 2003; 174(1-2): 17-25.
- Guimaraes AL, Correia-Silva Jde F, Sa AR, Victoria JM, Diniz MG *et al.* Investigation of functional gene polymorphisms IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha in individuals with recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(3): 268-72.
- Habu M, Tominaga K, Sakedai M, Alstergren P, Ohkawara S, Kopp S *et al.* Immunohistochemical study of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist in an antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31(1): 45-54.

-
- Hamada Y, Kondoh T, Holmlund AB, Yamamoto M, Horie A, Saito T *et al.* Inflammatory cytokines correlated with clinical outcome of temporomandibular joint irrigation in patients with chronic closed lock. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(5): 596-601.
- Helenius LM, Hallikainen D, Helenius I, Meurman JH, Kononen M, Leirisalo-Repo M *et al.* Clinical and radiographic findings of the temporomandibular joint in patients with various rheumatic diseases. A case-control study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(4): 455-63.
- Hirota Y, Habu M, Tominaga K, Sakedai M, Matsukawa A, Nishihara T *et al.* Relationship between TNF-alpha and TUNEL-positive chondrocytes in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35(2): 91-8.
- Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2002; 21(3): 255-7.
- Huang GJ, LeResche L, Critchlow CW, Martin MD, Drangsholt MT. Risk factors for diagnostic subgroups of painful temporomandibular disorders (TMD). *J Dent Res.* 2002; 81(4): 284-8.
- Hulkkonen J, Laippala P, Hurme M. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw.* 2000; 11(2): 251-5.
- Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol.* 1998; 28(8): 2598-602.
- Ijima Y, Kobayashi M, Kubota E. Role of interleukin-1 in induction of matrix metalloproteinases synthesized by rat temporomandibular joint chondrocytes and disc cells. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109(1): 50-9.
- Imirzalioglu P, Biler N, Agildere AM. Clinical and radiological follow-up results of patients with untreated TMJ closed lock. *J Oral Rehabil.* 2005; 32(5): 326-31.

-
- Johansson A, Unell L, Carlsson GE, Soderfeldt B, Halling A. Gender difference in symptoms related to temporomandibular disorders in a population of 50-year-old subjects. *J Orofac Pain*. 2003; 17(1): 29-35.
- John MT, Miglioretti DL, LeResche L, Von Korff M, Critchlow CW. Widespread pain as a risk factor for dysfunctional temporomandibular disorder pain. *Pain*. 2003; 102(3): 257-63.
- Kaneyama K, Segami N, Nishimura M, Suzuki T, Sato J. Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 40(5): 418-23.
- Kaneyama K, Segami N, Nishimura M, Sato J, Suzuki T, Fujimura K. Osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in synovial fluid from patients with temporomandibular disorders. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 32(4): 404-7.
- Kaneyama K, Segami N, Sato J, Nishimura M, Yoshimura H. Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous changes in the temporomandibular joint disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 42(3): 246-50.
- Kaneyama K, Segami N, Sun W, Sato J, Fujimura K. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1beta, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99(3): 276-84.
- 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. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 36(5): 391-4.
- Kobayashi R, Utsunomiya T, Yamamoto H, Nagura H. Ankylosis of the temporomandibular joint caused by rheumatoid arthritis: a pathological study and review. *J Oral Sci*. 2001; 43(2): 97-101.
- Kopp S. The influence of neuropeptides, serotonin, and interleukin 1beta on temporomandibular joint pain and inflammation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998; 56(2): 189-91.

- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(1): 72-7.
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol.* 1997; 34(5): 391-9.
- Kubota E, Imamura H, Kubota T, Shibata T, Murakami K. Interleukin 1 beta and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55(1): 20-8.
- Kubota E, Kubota T, Matsumoto J, Shibata T, Murakami KI. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 56(2): 192-8.
- Kurita H, Kojima Y, Nakatsuka A, Koike T, Kobayashi H, Kurashina K. Relationship between temporomandibular joint (TMJ)-related pain and morphological changes of the TMJ condyle in patients with temporomandibular disorders. *Dentomaxillofac Radiol* 2004; 33(5): 329-33.
- Kurita H, Uehara S, Sakai H, Kamata T, Kurashina K. Radiographic follow-up of diseased temporomandibular joints. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(4): 427-32.
- Lai YC, Shaftel SS, Miller JN, Tallents RH, Chang Y, Pinkert CA *et al.* Intraarticular induction of interleukin-1beta expression in the adult mouse, with resultant temporomandibular joint pathologic changes, dysfunction, and pain. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(4): 1184-97.
- Larheim TA. Role of magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of the temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs.* 2005; 180(1): 6-21.
- LeResche L, Mancl LA, Drangsholt MT, Huang G, Von Korff M. Predictors of onset of facial pain and temporomandibular disorders in early adolescence. *Pain.* 2007; 129(3): 269-78.

-
- Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S *et al.* Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol.* 1998; 113(3): 401-6.
- Magnusson T, Egermarki I, Carlsson GE. A prospective investigation over two decades on signs and symptoms of temporomandibular disorders and associated variables. A final summary. *Acta Odontol Scand.* 2005; 63(2): 99-109.
- Major P, Ramos-Remus C, Suarez-Almazor ME, Hatcher D, Parfitt M, Russell AS. Magnetic resonance imaging and clinical assessment of temporomandibular joint pathology in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 1999; 26(3): 616-21.
- Makhatadze NJ. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Hum Immunol.* 1998; 59(9): 571-9.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21(2): 115-37.
- Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol.* 2001; 22(6): 328-36.
- Martinez Blanco M, Bagan JV, Fons A, Poveda Roda R. Osteoarthritis of the temporomandibular joint. A clinical and radiological study of 16 patients. *Med Oral.* 2004; 9(2): 110-15.
- Matsumoto K, Honda K, Ohshima M, Yamaguchi Y, Nakajima I, Micke P *et al.* Cytokine profile in synovial fluid from patients with internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary study. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006; 35(6): 432-41.
- McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum.* 1995; 38(2): 221-8.

- Mittal RD, Bid HK, Manchanda PK. Genotype and haplotype determination of IL1B (g. -511C>T and g. +3954C>T) and (IL1RN) in pediatric nephrolithiasis. *Clin Chim Acta*. 2007; 379(1/2): 42-7.
- Moen K, Kvalvik AG, Hellem S, Jonsson R, Brun JG. The long-term effect of anti TNF-alpha treatment on temporomandibular joints, oral mucosa, and salivary flow in patients with active rheumatoid arthritis: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 100(4): 433-40.
- Mohlin BO, Derweduwen K, Pilley R, Kingdon A, Shaw WC, Kenealy P. Malocclusion and temporomandibular disorder: a comparison of adolescents with moderate to severe dysfunction with those without signs and symptoms of temporomandibular disorder and their further development to 30 years of age. *Angle Orthod*. 2004; 74(3): 319-27.
- Mohlin B, Axelsson S, Paulin G, Pietila T, Bondemark L, Brattstrom V, *et al*. TMD in Relation to Malocclusion and Orthodontic Treatment. *Angle Orthod*. 2007; 77(3): 542-8.
- Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Hohlig K, Sieper J, Muller B. Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1beta or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(11): 2417-22.
- Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*. 2007; 42(1): 23-30.
- Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS *et al*. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*. 2006; 314(5807): 1930-3.
- Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics*. 1994; 19(2): 382-4.
- Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Suzuki T, Miyamaru M. Proinflammatory cytokines and arthroscopic findings of patients with internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 40(1): 68-71.

- Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Sato J, Fujimura K. Comparison of cytokine level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases in arthrocentesis of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(3): 284-7.
- Nordahl S, Alstergren P, Eliasson S, Kopp S. Interleukin-1beta in plasma and synovial fluid in relation to radiographic changes in arthritic temporomandibular joints. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(1): 559-63.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Variação genética em indivíduos: mutação e polimorfismo. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompsn & Thompson: Genética Médica.* 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2002. p. 69-81.
- Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet.* 1998; 25(2/3): 267.
- Pereira FJ Jr, Lundh H, Westesson PL. Morphologic changes in the temporomandibular joint in different age groups. An autopsy investigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(3): 279-87.
- Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2001; 22(6): 873-83.
- Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22(6): 396-402.
- Pola R, Flex A, Gaetani E, Lago AD, Gerardino L, Pola P *et al.* The -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter is associated with Alzheimer's disease in an Italian population. *Neuroreport.* 2002; 13(13): 1645-7.
- Puzas JE, Landeau JM, Tallents R, Albright J, Schwarz EM, Landesberg R. Degradative pathways in tissues of the temporomandibular joint. Use of in vitro and in vivo models to characterize matrix metalloproteinase and cytokine activity. *Cells Tissues Organs.* 2001; 169(3): 248-56.

- Quinn JH, Kent JH, Moise A, Lukiw WJ. Cyclooxygenase-2 in synovial tissue and fluid of dysfunctional temporomandibular joints with internal derangement. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58(11): 1229-32.
- Rahman P, Siannis F, Butt C, Farewell V, Peddle L, Pellett F *et al.* TNFalpha polymorphisms and risk of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(7): 919-23.
- Ravindran JS, Owen P, Lagan A, Lewis J, Korendowych E, Welsh K *et al.* Interleukin 1alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis. *Rheumatology.* 2004; 43(1): 22-6.
- Rea IM, Ross OA, Armstrong M, McNerlan S, Alexander DH, Curran MD *et al.* Interleukin-6-gene C/G 174 polymorphism in nonagenarian and octogenarian subjects in the BELFAST study. Reciprocal effects on IL-6, soluble IL-6 receptor and for IL-10 in serum and monocyte supernatants. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124(4): 555-61.
- Revilla M, Obach V, Cervera A, Davalos A, Castillo J, Chamorro A. A -174G/C polymorphism of the interleukin-6 gene in patients with lacunar infarction. *Neurosci Lett.* 2002; 324(1): 29-32.
- Ribeiro MC. Influência do polimorfismo genético no receptor α de estrógeno em mulheres com sinais e sintomas de Desordem Temporomandibulares [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.
- Rodriguez-Carreón AA, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, Montes de Oca JV *et al.* Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun.* 2005; 24(1): 63-8.
- Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM *et al.* TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(1): 129-34.
- Sallakci N, Akcurin G, Koksoy S, Kardelen F, Uguz A, Coskun M *et al.* TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF-alpha production. *J Autoimmun.* 2005; 25(2): 150-4.

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

Sanguinetti CJ, Dias EN, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17: 915-9.

Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol.* 1998; 47(3): 195-8.

Sato S, Takahashi K, Kawamura H, Motegi K. The natural course of nonreducing disk displacement of the temporomandibular joint: changes in condylar mobility and radiographic alterations at one-year follow up. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 27(3): 173-7

Savioli C, Silva CA, Ching LH, Campos LM, Prado EF, Siqueira JT. Dental and facial characteristics of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2004; 59(3): 93-8.

Scolozzi P, Bosson G, Jaques B. Severe isolated temporomandibular joint involvement in juvenile idiopathic arthritis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(9): 1368-71.

Sipila K, Ylostalo PV, Joukamaa M, Knuutila ML. Comorbidity between facial pain, widespread pain, and depressive symptoms in young adults. *J Orofac Pain.* 2006; 20(1): 24-30.

Spears R, Oakes R, Bellinger LL, Hutchins B. Tumour necrosis factor-alpha and apoptosis in the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2003b; 48(12): 825-34.

Spears R, Oakes R, Moore C, Bellinger LL, Hutchins B. A determination of tumor necrosis factor expression in TMJ inflammation with the use of microarray analysis. *J Dent Res.* 2003a; 82(10): 807-13.

- Spears R, Dees LA, Sapozhnikov M, Bellinger LL, Hutchins B. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. *J Orofac Pain*. 2005; 19(1): 34-40.
- Srinivas R, Sorsa T, Tjaderhane L, Niemi E, Raustia A, Pernu H *et al*. Matrix metalloproteinases in mild and severe temporomandibular joint internal derangement synovial fluid. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91(5): 517-25.
- Stegenga B, de Bont LG, Boering G, van Willigen JD. Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint: a review. *J Oral Maxillofac Surg*. 1991; 49(10): 1079-88.
- Stegenga B. Osteoarthritis of the temporomandibular joint organ and its relationship to disc displacement. *J Orofac Pain*. 2001; 15(3): 193-205.
- Stern AG, de Carvalho MR, Buck GA, Adler RA, Rao TP, Disler D *et al*. Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003; 11(6): 394-402.
- Sukedai M, Tominaga K, Habu M, Matsukawa A, Nishihara T, Fukuda J. Involvement of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med*. 2004; 33(2): 102-10.
- Suzuki T, Segami N, Nishimura M, Nojima T. Co-expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and synovial fluids of temporomandibular joint with internal derangement: comparison with histological grading of synovial inflammation. *J Oral Pathol Med*. 2002; 31(9): 549-57.
- Takahashi T, Kondoh T, Fukuda M, Yamazaki Y, Toyosaki T, Suzuki R. Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85(2): 135-41.
- Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, *et al*. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet*. 1993; 91(4): 403-4.

- Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol.* 1993; 64(5 Suppl): 416-31.
- Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2000; 275(24): 18138-44.
- Tolusso B, Pietrapertosa D, Morelli A, De Santis M, Gremese E, Farina G *et al.* IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: relationship with protein plasma levels and response to therapy. *Pharmacogenomics.* 2006; 7(5): 683-95.
- Tomas X, Pomes J, Berenguer J, Quinto L, Nicolau C, Mercader JM *et al.* MR imaging of temporomandibular joint dysfunction: a pictorial review. *Radiographics.* 2006; 26(3): 765-81.
- Tominaga K, Habu M, Sukedai M, Hirota Y, Takahashi T, Fukuda J. IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist and soluble type II IL-1 receptor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(6): 493-9.
- Twilt M, Moberg SM, Arends LR, ten Cate R, van Suijlekom-Smit L. Temporomandibular involvement in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2004; 31(7): 1418-22.
- van der Paardt M, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, Baudoin P, Kostense PJ, Alizadeh BZ *et al.* Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* 2002; 41(12): 1419-23.
- von Linsingen R, Bompeixe EP, Bicalho Mda G. A case-control study in IL6 and TGFB1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in southern Brazilian patients. *Am J Reprod Immunol.* 2005; 53(2): 94-9.
- Vozarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, *et al.* The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet.* 2003; 112(4): 409-13.
- Zarb GA, Carlsson GE. Temporomandibular disorders: osteoarthritis. *J Orofac Pain.* 1999; 13(4): 295-306.

Zarb GA, Carlsson GE, Sessle BJ, Mohl ND. Disfunções da articulação temporomandibular e dos músculos da mastigação. 2. ed. São Paulo: Santos; 2000.

Yamada K, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Kohno S, Amizuka N, Iwanaga T, *et al.* Expression of estrogen receptor alpha (ER alpha) in the rat temporomandibular joint. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003; 274(2): 934-41.

Yamaguchi A, Tojyo I, Yoshida H, Fujita S. *Arch Oral Biol.* Role of hypoxia and interleukin-1beta in gene expressions of matrix metalloproteinases in temporomandibular joint disc cells. 2005; 50(1): 81-7.

Yoshida K, Takatsuka S, Hatada E, Nakamura H, Tanaka A, Ueki K *et al.* Expression of matrix metalloproteinases and aggrecanase in the synovial fluids of patients with symptomatic temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(1): 22-7.

Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ. Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. *J Rheumatol.* 1994; 21(9): 1710-5.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992; 1(5): 353.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(7): 3195-9.

APÊNDICE 1

Paciente Nº: _____ Data da coleta: _____

Nome: _____

Sexo: _____ Data de nascimento: _____ Profissão: _____

End. _____ Tel: _____

Raça (cor de pele, morfologia do nariz, cabelo): Pais ou avós negros? _____

Branco Mestiço Negro **História clínica**

Queixa principal: _____

Considera-se tenso ou estressado: Sim _____ Não _____

Toma remédio para dormir? Sim _____ Não _____

Progressão da doença: Súbito _____ Progressivo _____ Duração dos sintomas: _____

Fator desencadeador da dor :

Ocorreu crise aguda de dor? Quanto tempo?

Sente dor na face? Sim _____ Não _____ / Unilateral _____ Bilateral _____

Sente dor na ATM? Sim _____ Não _____ / Unilateral _____ Bilateral _____

Ouve ruídos na ATM? Sim _____ Não _____ Estalo ou crepitação ? Quando? _____

Tem dificuldade para abrir a boca? Sim _____ Não _____

Luxação ou travamento?

Hábito parafuncional? Sim _____ Não _____

bruxismo _____ apertamento _____ onicofagia _____ morder lábios e/ou objetos _____

É respirador bucal ? Sim _____ Não _____

Fez tratamento ortodôntico? Sim _____ Não _____ Por quanto tempo? _____

Sofreu traumatismo craniofacial? Sim _____ Não _____

Ausência dentária? Sim _____ Não _____

É portador de prótese? Sim _____ Não _____ / Fixa _____ Removível _____ Total _____ Implantes _____

Há quanto tempo utiliza prótese? _____

História Médica

Sente dores em outras articulações do corpo com frequência? Sim _____ Não _____

Apresenta algum problema de saúde? Sim _____ Não _____ / Diabetes _____ Osteoporose _____

Hipertensão _____ Doença reumática _____ Doença cardiovascular _____

História familiar de DTM? Sim _____ Não _____ Qual o parentesco? _____

Usa medicamentos atualmente? Sim _____ Não _____ Qual? _____

APÊNDICE 2

Paciente Nº: _____ Data da coleta: _____

Nome: _____

Sexo: _____ Data de nascimento: _____ Profissão: _____

End. _____ Tel: _____

Raça (cor de pele, morfologia do nariz, cabelo): Pais ou avós negros? _____

Branco Mestiço Negro

Você tem tido dor em sua face, mandíbula, têmpora, na frente do ouvido ou no ouvido nos últimos dias?

Sim () Não ()

Você percebe sua mandíbula travar ou dificuldade em abri-la a ponto de não conseguir abri-la totalmente?

Sim () Não () Essa limitação de abertura é severa ao ponto de atrapalhar sua habilidade em comer?

Sua mandíbula faz um click ou pula quando você abre ou fecha sua boca? Sim () Não ()

Você percebe barulho de chiado, rangido ou esmirilhamento nas suas articulações quando fecha sua mandíbula ou quando mastiga? Sim () Não ()

Nos últimos 6 meses você teve problemas com dores de cabeça ou enxaqueca? Sim () Não ()

Considera-se tenso ou estressado: Sim _____ Não _____

Toma remédio para dormir? Sim _____ Não _____

História de depressão? Sim _____ Não _____

Hábito parafuncional? Sim _____ Não _____

bruxismo _____ apertamento _____ onicofagia _____ morder lábios e/ou objetos _____

É respirador bucal? Sim _____ Não _____

Fez tratamento ortodôntico? Sim _____ Não _____ Por quanto tempo? _____

Sofreu traumatismo craniofacial? Sim _____ Não _____

Ausência dentária? Sim _____ Não _____

É portador de prótese? Sim _____ Não _____ / Fixa _____ Removível _____ Total _____ Implantes _____

Há quanto tempo utiliza prótese? _____

História Médica

Sente dores em outras articulações do corpo com frequência? Sim _____ Não _____

Apresenta algum problema de saúde? Sim _____ Não _____ / Diabetes _____ Osteoporose _____

Hipertensão _____ Doença reumática _____ Doença cardiovascular _____

História familiar de DTM? Sim _____ Não _____ Qual o parentesco? _____

Usa medicamentos atualmente? Sim _____ Não _____ Qual? _____

ANEXO 1

Exame anamnésico dirigido à doença

Paciente: _____ Sexo: ___ Idade: ___ anos

1. História da doença atual:

2. Em caso de sintomatologia dolorosa, indicar a localização:

- articulação
 direita esquerda ambas
 ouvido(s) correspondente
 cabeça (lado correspondente)
 frontal parietal occipital
 cervical (pescoço)
 face (lado correspondente)
 dentes (lado correspondente)

3. Referenciar fator desencadeante da dor:

4. A dor interfere nas atividades diárias?

- Sim Não

5. Qual o nível de severidade da dor, numa escala de 1 a 10?

- Lado direito Lado esquerdo

6. Ocorrem estalidos articulares?

- Não Sim Lado direito Lado esquerdo

7. No movimento de abertura e fechamento, observa-se:

- Limitação
 Desvio à direita com correção da trajetória ao final do movimento
 Desvio à direita sem correção da trajetória ao final do movimento
 Desvio à esquerda com correção da trajetória ao final do movimento
 Desvio à esquerda sem correção da trajetória ao final do movimento

8. Condição Bucal:

- 8.1. História de bruxismo/ apertamento Sim Não
 8.2. Dentição completa Sim Não
 8.3. Edêntulo com prótese Superior Inferior
 8.4. Portador de prótese fixa Sim Não
 8.5. Experimentou tratamento ortodôntico Sim Não

9. Ângulo condilar horizontal: Direito Esquerdo

10. Abertura: Observada clinicamente Estabelecida no exame

Observações:

ANEXO 2



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



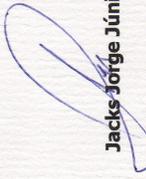
CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise de polimorfismos genéticos em pacientes com sinais clínicos e radiográficos de alterações degenerativas da articulação temporomandibular**", protocolo nº **096/2005**, dos pesquisadores **SERGIO ROBERTO PERES LINE e MARIA ISABELA GUMARÃES CAMPOS**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 26/09/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**Genetic polymorphism analysis on patients with clinical and radiographic signs of degenerative alterations of temporomandibular joint**", register number **096/2005**, of **SERGIO ROBERTO PERES LINE and MARIA ISABELA GUMARÃES CAMPOS**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 26/09/2005.



Cinthia Pereira Machado Tabchoury
 Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP



Jacks Jorge Júnior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.