



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
DEPARTAMENTO DE PRÓTESE E PERIODONTIA



Margarete Cristiane Ribeiro
Cirugiã Dentista

**Influência do polimorfismo genético no receptor α de
estrógeno em mulheres com sinais e sintomas de
Desordem Temporomandibulares**

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

Piracicaba
2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
DEPARTAMENTO DE PRÓTESE E PERIODONTIA



Margarete Cristiane Ribeiro
Cirugiã Dentista

Influência do polimorfismo genético no receptor α de estrógeno em mulheres com sinais e sintomas de Desordem Temporomandibulares

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

Orientadora : Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti-Barbosa

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa
Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line
Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia
Profa. Dra. Maria da Glória Chiarello de Mattos
Prof. Dr. Manoel Gomes Tróia Junior

Piracicaba
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

R354i	<p>Ribeiro, Margarete Cristiane. Influência do polimorfismo genético no receptor α de estrógeno em mulheres com sinais e sintomas de desordens temporomandibulares. / Margarete Cristiane Ribeiro. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Célia Marisa Rizzatti-Barbosa. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Articulação temporomandibular. 2. Dor. I. Rizzatti-Barbosa, Célia Marisa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	--

Título em inglês: Influence of estrogen α receptor genetic polymorphism in women with signal and symptoms of temporomandibular disorders

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Temporomandibular joint. 2. Pain

Área de concentração: Prótese Dental

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Célia Marisa Rizzatti-Barbosa, Sérgio Roberto Peres Line, Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, Maria da Glória Chiarello de Mattos, Manoel Gomes Tróia Junior

Data da defesa: 28/10/2005

Dedico este trabalho

A Deus, que sempre me ajudou nos momentos de maior aflição e por me ter dado a oportunidade de chegar tão longe e de aprender tanto com meus erros

A Judith e Joel (in memoriam), meus pais, pelo exemplo de luta e dedicação. Por terem me ensinado a nunca desistir, mesmo nas adversidades!

A minha irmã Maria Teresa e meu cunhado Nelson por vibrarem com minhas vitórias e por estarem sempre tão presentes em minha vida.

A meus irmãos José Carlos e Alexandre pela amizade e carinho.

Ao Walter pela alegria que colocou em minha vida e pelo carinho, amizade, compreensão e amor dedicado a mim mesmo estando tão longe.

Agradecimentos Especiais

Agradeço primeiramente a minha orientadora Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa, por ter sido, nos 5 anos que passamos juntas, muito mais do que uma pessoa a qual me transformou na profissional que hoje sou, mas principalmente pela sua amizade, seu companheirismo e amor!

Agradeço de forma especial também, ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line que me acolheu de forma muito amável em seu departamento, esclarecendo minhas dúvidas e me fazendo fascinar pela área de Biologia Molecular.

Agradeço também aos amigos Carolina Meloto, Cristiane Borges, Fabio Bianchi, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, sem os quais não teria conseguido terminar essa tese.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, na pessoa de seu Diretor Professor Doutor Thales Rocha de Mattos Filho;

Ao coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Professor Doutor Pedro Luis Rosalen;

Ao coordenador dos Cursos de Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Professor Doutor Roger William Fernandes Moreira;

As pacientes voluntárias de minha pesquisa, que com muita boa vontade colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo para realização desse trabalho;

À Coordenação da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão do auxílio pesquisa que viabilizou a realização desse trabalho.

A todos os professores da FOP, os quais participaram de minha formação como Cirurgiã Dentista, Mestre em Prótese Dental.

Aos funcionários do departamento de Morfologia: Eliene Aparecida Narvaes Romani, Eli Cristina Gomes Alves, Maria Aparecida Santiago Varella, Suzete Regina Tobias Neder, pela amizade e apoio.

Às secretárias Juliana de Souza e Shirley Rosana Sbrovatti Moreto pela atenção e carinho com que sempre prontamente me atenderam.

Às secretárias de pós-graduação - Érica A. Pinho Sinhoreti e Raquel Q. Marcondes Cesar Sacchi e a secretária da Clínica Odontológica - Mônica, que além de muito competentes, sempre me atenderam com muito carinho e atenção.

À funcionária Joselena Casati Lodi, pelo carinho, atenção, amor, companheirismo dispensado a todos os alunos que passam pelo laboratório de Prótese Parcial Removível.

Às amigas Juliana Silva Moura, Noeli Boscatto e Priscila de Oliveira Serrano, o meu muito obrigado pela companhia pela atenção e o carinho com que me receberam.

Aos meus amigos de graduação: Leonardo Cunha, Roberta Alonso, Tatiana Normanha, Larissa Belotserkovts, Mariana Primo Nogueira, Cátia Cristina Ribeiro Vilela, Patrícia Freitas, Patrícia Damasceno, Vanessa Beber, Carla Sato, Eduardo Fregnani e Ana Cecília Fregnani, o meu muito obrigado por todos esses anos de companheirismo.

Sumário

Resumo	01
Abstract	03
I - Introdução	05
II - Revisão da Literatura	07
III - Proposição	17
IV – Materiais Métodos	18
4.1-Sujeitos	18
4.2-Obtenção do DNA	18
4.3-Amplificação dos genes e digestão através de enzimas de restrição	20
4.4- Análise estatística	23
V - Resultados	24
VI- Discussão	26
VII – Conclusão	31
VIII – Referências Bibliográfica	32
IX - Anexos	42

Resumo

Desordem Temporomandibular (DTM) é um termo utilizado para determinar as condições de patologias clínicas que envolvem os músculos mastigatórios e articulações temporomandibulares (ATM). Ocorre freqüentemente entre as mulheres em idade fértil, aumentando a prevalência após a puberdade e diminuindo na pós-menopausa, o que sugere uma correlação com os hormônios reprodutivos, principalmente o estrógeno. O objetivo deste trabalho foi correlacionar a freqüência de dois polimorfismos do gene receptor α de estrógeno (Pvu II no intron 1 e Xba I no intron 1), com a presença de sinais e percepção de dor relacionados aos desarranjos interno da articulação temporomandibular (DI/ATM) em mulheres da região de Piracicaba, Brasil. Para tanto foram analisados os polimorfismos genéticos em 300 pacientes do sexo feminino com idade variando entre 18-45 anos, divididos em três grupos segundo análise feita através do exame RDC/TMD: grupo controle composto por 100 voluntárias que não apresentavam DTM; grupo experimental 1, composto por 100 voluntárias portadoras de DI/ATM e presença de dor; grupo experimental 2, composto por 100 voluntárias portadoras de DI/ATM e com ausência de dor. A obtenção do ácido desoxirribunucleico (DNA) das voluntárias foi feita através de células epiteliais da mucosa bucal obtidas por bochecho de glicose 2% , e posteriormente foi amplificado pela reação de PCR (polimerase chain reaction). Para a identificação dos alelos foi realizada a técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism), na qual os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão

por enzimas de restrição. Finalmente, o produto do RFLP foi submetido à eletroforese em géis de poliacrilamida a 10%, que posteriormente foram corados pela técnica da prata. Foram utilizados primers para determinar as condições de amplificação e restrição dos polimorfismos genéticos que foram estudados. A análise estatística foi realizada utilizando o teste χ^2 (significância de 5%), e o teste de Odds Ratio (OR) foi usado para avaliar o risco das pacientes apresentarem dor. Não houve diferença estatística significativa na distribuição dos alelos do polimorfismo XbaI (A-357G) e PvuII (T-391C). No entanto houve diferença significativa para o sítio polimórfico (A-357G) quanto à distribuição genotípica entre as voluntárias portadoras de DI/ATM com dor e o grupo controle ($p=0,03$). O teste OR ($P<0,05$) demonstrou que o genótipo GG (Xba I no intron 1) aumenta a suscetibilidade de mulheres portadoras de DI/ATM apresentarem dor (Odds Ratio (OR) = 2,55). As evidências observadas no experimento sugerem que o polimorfismo no receptor de estrógeno α (A-357G) está associado com a percepção da dor de ATM em mulheres da região de Piracicaba portadoras de DI/ATM. Entretanto não foi conclusivo quanto à maior prevalência de DI/ATM na população feminina.

Abstract

Temporomandibular disorders are common pain conditions that have the highest prevalence among women of reproductive age. The pattern of onset after puberty and lowered prevalence rates in the postmenopausal years suggest that female reproductive hormones may play an etiologic role in temporomandibular disorder

OBJECTIVES: The purpose of the present study was to analyze the association between two polymorphisms (Pvu II in intron 1 and Xba I in intron 1) and signal and symptoms of internal disarrangements of Temporomandibular Joint (IDTMJ) in Brazilian women. **MATERIAL AND METHODS:** Three hundred women volunteers, 18-45 years old, not taking contraceptive, was selected throughout Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD) and divided in: Control group: 100 women without signal and symptoms related to IDTMJ; Test Group 1 - 100 women with symptoms but without pain related to IDTMJ and Test Group 2 - 100 women with symptoms and pain related to IDTMJ. Genomic DNA from buccal mucosa was amplified by the polymerase chain reaction (PCR), followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and submitted to polyacrylamide gel electrophoresis to distinguish the alleles. Differences in the allele and genotype frequencies between control and test groups were assessed by chi (2) test ($P < 0.05$). And the risk of pain in women was assessed by Odds Ratio test ($p < 0.05$). **RESULTS:** No statistically significant differences were found in the allele distribution. Nevertheless, XbaI polymorphic site was significantly different to genotype distribution between TMD with pain and control group ($p = 0.03$). The GG genotype seemed to increase susceptibility to have pain in

women (odds ratio (OR) =2.55). CONCLUSION: This study suggests that GG presence in the estrogen receptor α (A-357G) polymorphism is associated with pain in Brazilian women with ID/TMJ and was not conclusive with the higher prevalence of this disease in Brazilian women.

I - INTRODUÇÃO

As Desordens Temporomandibulares (DTM) caracterizam-se por um conjunto de sinais e sintomas associados a anormalidades do Sistema estomatognático, afetando a Articulações Temporomandibulares (ATM) e/ou os músculos mastigatórios, assim como os tecidos contíguos (Aufdemorte *et al*;1986; Dao *et al*,1998).

Os dois achados clínicos mais comuns na maioria das DTM são a disfunção e a dor, constituindo-se esta na principal razão da maioria da população procurar os cuidados de um profissional. A percepção de dor, que geralmente é mais uma consequência da DTM do que sua causa pode ser definida como uma experiência sensorial desagradável, associada ou não por um dano real dos tecidos. (Mersky, 1986).

A percepção da dor ligada a DTM é 1,5 a 2 vezes mais prevalente em indivíduos do sexo feminino do que no sexo masculino, onde as mulheres em idade fértil apresentam maior percepção à dor do que aquelas em idade pós menopausa (Friction & Schiffman, 1987; Dworkin & Leshere, 1990).

Ao longo da vida, as parafunções iniciam alterações adaptativas e, por fim, degenerativas nas ATMs. Sob certas condições de trauma, os defeitos morfológicos dentários e estas alterações podem atravessar o limiar de um estado assintomático para o sintomático. Em alguns indivíduos a DTM assume tal gravidade que causa limitações funcionais gerando incapacidade tanto para o trabalho quanto para o convívio social. Embora muitas pesquisas sobre DTM tenham sido feitas nas últimas décadas, o dimorfismo na percepção da dor

presente entre homens e mulheres, assim como a patofisiologia relacionada à DTM continuam desconhecidos (Sarlani *et al*, 2003). A severidade dos sintomas e progressão da doença varia muito para cada indivíduo, sugerindo que fatores intrínsecos ao paciente tais como aprendizado anterior, hormônios reprodutivos, composição genética individual e estado psicológico, possam ter um papel importante no processo.

Embora estudos da anatomia, eletrofisiologia e farmacologia tenham contribuído sensivelmente para a compreensão de como a dor é codificada e processada nos seres humanos, estas pesquisas pouco acrescentaram para o desenvolvimento de uma terapêutica definitiva para esta sintomatologia. Como conseqüência, existe uma tendência para identificar novas descobertas no processamento da dor com a finalidade de desenvolver componentes terapêuticos mais eficazes. Este esforço tem sido beneficiado pela revolução da Biologia Molecular, que possibilitou investigar a influência genética e fisiológica no processamento da dor (Mogil e McCarson, 2000).

Muitas vezes os estudos de ligação para mapeamento de um gene são feitos em relação a uma seqüência de DNA conhecida que pode ser facilmente identificada. Tais seqüências são designadas *marcadores* e, dada sua abundância, desde a descoberta dos *loci* (posição definida em um determinado cromossomo) marcadores, o mapa do genoma humano teve um incremento significativo. *Marcadores genéticos* são pequenas variações normais na seqüência de nucleotídeos (unidade das moléculas de DNA e RNA, composto de uma molécula de açúcar, um grupo fosfato e uma base nitrogenada), chamada

polimorfismos, espalhadas em centenas de milhares de posições no genoma (conjunto completo de cromossomos haplóides). Muitas dessas modificações não prejudicam qualquer função vital e não apresentam efeito no fenótipo [Fenótipo = constituição genética de um indivíduo, mais especificamente, os alelos presentes em um *locus* gênico (Genótipo)+ Fatores ambientais].

O presente estudo optou por estudar o polimorfismo do receptor α de estrógeno, por ser este um importante mediador no caminho de transdução dos estímulos da dor e por estar expresso em uma ampla variedade de tipos de células, incluindo os condrócitos articulares e células do tecido ósseo (Ushiyama *et al*, 1999). O ER α está localizado no cromossomo 6q25, e pode apresentar inúmeras variações na seqüência do DNA, que resultam em alteração na estrutura desta proteína (Bergink *et al*, 2003) e em sua atividade fisiológica. Estas alterações poderiam conduzir a modificações significativas do efeito do estrógeno na percepção da dor relacionada aos desarranjos internos das ATMs, com alta prevalência nos indivíduos do sexo feminino.

A inexistência de publicações que correlacionem estas alterações genéticas e a presença de dor nos desarranjos internos das ATM motivou a investigação dos polimorfismos genéticos do ER α , nas posições Pvu II no intron 1 T-397C, e Xba I no intron 1 A-351G respectivamente, porque ambos apresentam correlação comprovada com a artrite reumatóide (Ongphiphahakal *et al*, 1998; Bergin *et al*, 2003) e com a alteração das dimensões esqueléticas em mulheres portadoras de osteoartrite nas ATMs (Lee *et al*, 2005).

A descoberta de que algum polimorfismo genético, determinante no desencadeamento dos sinais e sintomas da DTM, seria de grande valia no meio odontológico, pois determinaria um tratamento mais específico, oferecendo ao paciente melhor qualidade de vida.

II - Revisão de Literatura

As desordens temporomandibulares (DTM) compreendem um conjunto de condições que se expressam principalmente através da percepção de dor difusa nas articulações temporomandibulares, músculos mastigatórios e áreas adjacentes da face e pescoço, que se caracterizam como principal causa de procura por cuidados do cirurgião dentista (Aufdemorte *et al*, 1986; Dao *et al*, 1998).

A DTM afeta aproximadamente 7 a 15% da população adulta norte americana (Friction & Schiffman, 1987) e atinge 1,5 a 2 vezes mais as mulheres do que os homens, sendo que 80% dos casos tratados são mulheres (Dworkin & Le Shere, 1990).

A correlação entre diferenciação sexual, influência dos hormônios reprodutivos na percepção da dor e a prevalência de DTM são confirmadas através dos estudos que observam a baixa prevalência desse sintoma correlacionando à DTM (2 a 4%) em adolescentes e pré-adolescentes e da pequena diferenciação das características desta desordem entre crianças de ambos os sexos (Goulet *et al*, 1995). Esta evidência também é confirmada pela alta taxa de prevalência em mulheres adultas em relação aos homens, e pela menor prevalência nas mulheres em período pós-menopausa do que nas mulheres em idade fértil (Vliagoftis *et al*, 1992).

Quando se trata de definir dor, é quase impossível dizer o que ela realmente é (Douglas CR, 2000). Segundo Mersky (1986), a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada ou não a dano real ou

potencial nos tecidos, podendo ser descrita tanto em termo desses danos, quanto por ambas às características. Isto em função de que a percepção da dor é codificada nos seres humanos através de uma composição genética individual, hormônios reprodutivos, aprendizado anterior, estado psicológico, estado de humor, fatores ambientais e convívio social (Turk 2002; Craft *et al*, 2004).

Considerando a forte correlação entre a percepção da dor proveniente da DTM e sexo feminino (Edwards *et al*, 2005), e que os hormônios gonodais agem em muitas áreas do cérebro ligadas à dor desde o início de seu desenvolvimento e no transcorrer da vida (Pilgrim & Hutchinson 1994) os hormônios estrogênicos e androgênicos têm sido estudados com intuito de avaliar a sua influência na percepção da dor (McEwen *et al*, 1991, Fillingim *et al* 2001, Craft 2004).

Segundo Vanderhorst *et al* (2005), a ação modulatória do estrógeno no Sistema Nervoso Central (SNC) através de neurônios sensíveis ao estrógeno permanece desconhecida. Os autores comprovaram, através de testes imunohistoquímicos em ratos, a correlação existente entre os neurônios imunoreativos (ER-IR) aos receptores alfa e beta de estrógenos, os sistemas monoaminérgico e colinérgico, e as projeções espinais. Concluíram que há similar distribuição dos ER-IR entre machos e fêmeas, e que a possível ação modulatória destes é explicada através de sua distribuição no SNC, e através das ações específicas desse hormônio. Estas incluem o comportamento sexual, a ejaculação, o controle cardiovascular e respiratório, o processamento sensorial tátil nociceptivo e antinociceptivo, e a regulação endócrina.

Os efeitos do estrógeno no cérebro são mediados por dois receptores nucleares conhecidos: receptores de estrógeno (ER) α e β . Estes hormônios pertencem à superfamília dos esteroidais. O ER- α está relacionado com o comportamento reprodutor feminino e modula, além da atividade locomotora, o comportamento maternal e agressivo. O ER- β também afeta o comportamento reprodutor e social, porém numa escala menor (Vanderhorst *et al*, 2005). Nas células de expressão dos ER, sua ligação ao receptor intracelular resulta de uma complexa atividade entre o receptor ligante e os outros co-fatores da célula. Este complexo pode se ligar diretamente com um elemento resposta-estrógeno localizado em um gene promotor específico, com o efeito de alterar a transcrição do gene. O efeito genômico do estrógeno, agindo através do ER nuclear, pode ser contrastado com o mecanismo não genômico e mais rápido do estrógeno, que provavelmente envolve a membrana dos ER, e que não é um fator de transcrição (McEwen & Alves 1999; Falkenstein *et al*, 2002).

O ER α é encontrado em várias partes do cérebro associados com o sistema reprodutivo. Porém áreas do cérebro não ligadas tradicionalmente com o sistema reprodutivo também apresentam grande quantidade de ER α mRNA, como as regiões do olfato, do cerebelo, da área postrema, da substância gelatinosa e do córtex espinal (Simerly *et al*,1998; Belcher, 1999; Chakraborty & Gore ,2004). O estrógeno pode agir no cérebro em diversos tecidos alvos, e exercer uma larga escala de ação, o que pode ser explicado pela vasta distribuição dos ER no SNC. O estrógeno, por exemplo, desempenha papel na neuroproteção, na atividade

locomotora, no humor, na memória, na cognição e na sensibilidade à dor (Aloisi & Cecarelli, 2000, McEwen & Alves SE, 1999).

Os hormônios esteroidais entram na célula, ocupam o receptor e, em combinação com o mesmo interagem com moléculas de DNA, no núcleo da célula para gerar uma resposta funcional. Nessa situação as moléculas de DNA agem como segundos-mensageiros e a informação essencial para desencadear uma resposta reside no hormônio e no receptor acoplado. A ocupação pelo hormônio de um número relativamente pequeno de receptores provoca a inativação dos receptores adjacentes não ocupados por esse hormônio. Porém, a ocupação de apenas 5 a 10% do total de moléculas receptoras disponíveis é suficiente para a ação máxima do hormônio. Portanto, nesses casos, o declínio da afinidade do receptor pelo hormônio não afeta quantitativamente a ação hormonal, mas pode reduzir a duração do efeito do hormônio ou proteger a célula de excesso súbito e maciço de hormônio (Berne & Levy, 1998).

É importante relatar que existem diferenças fundamentais entre a resposta cerebral a estímulos dolorosos entre homens e mulheres. Geralmente os homens demonstram grande ativação das áreas cognitivas, área simpática central e de inibição da região límbica, enquanto que as mulheres apresentam grande ativação da região afetiva e regiões autonômicas (Naliboff *et al*, 2003). Variações de experiência de dor através de grupos étnicos (Edwards & Fillingim, 1999; Edward *et al*, 2001) sugerem a importância dos fatores genéticos na experiência interindividual da percepção da dor clínica e experimental. Fillingim *et al* (2005) relatam que a resposta a estímulos dolorosos é caracterizada por uma grande

variabilidade entre indivíduos, e que fatores genéticos exercem influências nessa variabilidade.

As moléculas alvo para variações genéticas incluem principalmente os receptores de transdução da dor expressos nos neurônios aferentes (Caterina *et al*, 2000, Mc Kemy *et al* 2002). Moléculas moduladoras da dor que são expressas periférica e centralmente, como por exemplo, os receptores de opióide, (Backer, 1997) podem também causar impacto na sensibilidade à dor.

Os hormônios gonadais modulam a analgesia opióide, interferindo na farmacodinâmica e/ou farmacocinética da droga opióide. Em relação à farmacocinética, testosterona e estradiol, por exemplo, podem alterar a absorção, distribuição, e metabolismo do opióide, sendo que o último interfere na ativação e inativação de metabólitos. Quanto à farmacodinâmica, hormônios gonadais esteroidais, especialmente o estrógeno, podem modular os níveis de peptídeos opióides mRNA no cérebro, densidade de receptor opióide, e transdução do sinal mediado pelo receptor opióide. O estrógeno também pode atenuar os efeitos endógenos e exógenos do opióide, ligando-se diretamente aos seus receptores (Craft *et al*, 2004).

A percepção da dor parece ser modulada e processada por mecanismos distintos para cada sexo, que pode ser dissociado genética e neuroquimicamente. As mulheres são mais sensíveis à analgesia gerada pelo κ -opióide, por exemplo (Craft *et al*, 2004).

Num estudo realizado por Zubieta *et al* (2002) foi observado que os homens apresentam grandes magnitudes de liberação de opióides endógenos e ativação do sistema μ -opióide nas regiões do cérebro, implicadas na supressão sensorial e qualidades afetivas de dor quando comparada às mulheres. Os autores relatam ser possível que, nas intensidades de dor observadas, o sistema do receptor opióide é menos ativo durante a fase folicular do ciclo menstrual na mulher, no qual o nível dos hormônios esteroidais é baixo, o que indica que outro mecanismo de receptor pode suportar a supressão da dor nas mulheres (ex. κ -opióide). No entanto, pesquisas na literatura têm demonstrado que o receptor μ -opióide é essencial para indução das respostas nociceptivas tanto em homens quanto mulheres. Os resultados implicam que durante a fase folicular, quando os níveis de esteróides gonodais estão baixos, as mulheres são menos capazes de suprimir a dor profunda pela ativação desses mecanismos. Nesta pesquisa houve uma menor tolerância das mulheres para desafios prolongados e repetitivos de dor.

Trevisani *et al* (2004), investigaram o efeito das alterações hormonais decorrentes da gravidez e do antagonista do receptor κ -opióide sobre a sensibilidade ao teste com formalina na articulação temporomandibular de ratas. O estudo observou que as fêmeas prenhas apresentaram uma redução estatisticamente significativa da nocicepção ao teste da formalina na ATM, em relação às fêmeas com baixo nível de estrógeno. O antagonista do receptor κ -opióide, nor-BNI, quando administrado 24 horas antes da formalina, induziu um aumento dos comportamentos nociceptivos somente nas fêmeas prenhas. O

aumento dos níveis de hormônios sexuais decorrente da gravidez induziu uma redução da nocicepção ao teste de formalina na ATM. A ativação de receptores κ -opióide periféricos pela liberação de agonistas opióides endógenos está envolvida na analgesia induzida pela gravidez no teste de formalina na ATM.

Uma outra possível explicação para a correlação do hormônio estrógeno e presença algesia nas DTMs é que os desarranjos dos músculos mastigatórios e das ATMs são acompanhados de um processo inflamatório e os esteróides interagem não só em inúmeros mediadores inflamatórios, como também na modulação da atividade do óxido nítrico, diretamente sobre as fibras musculares. Estudos *in vitro* mostram que o nível de 17 β -estradiol aumenta quando o tamoxifen (um antagonista dos receptores de estrógeno) inibe a secreção de histamina e serotonina dos mastócito de ratos (Stewart *et al*, 1992; Thomsen 2002). O estrógeno também age nos processos inflamatórios, reduzindo a atividade da acetilhidrolase, responsável pela degradação do fator ativador de plaquetas (FAP) (Stewart *et al*, 1992; Tarbet *et al* 1991), aumentando a sua concentração sanguínea e nos espaços extracelulares. Este, assim como os leucócitos eosinófilos, atua no edema, aumentando a permeabilidade vascular e liberação de histamina presentes na inflamação (Tchernitchin 1983; Tarbet *et al*, 1991). A injeção de estradiol na veia jugular de ratos eleva a degranulação leucocitária de 10% para 70% em 6 horas e 24 horas respectivamente após tratamento (LeResche, 1997; Tarbet *et al*, 1991). Recentes evidências demonstram claramente que o papel do estrógeno na dor e inflamação é em parte mediada

pelo Óxido Nítrico (ON), que possui importante papel biológico, incluindo vasodilatação, inflamação e processamento central da dor (Meller *et al*, 1994). Se o estrógeno induz a liberação de ON, e este se encontra envolvido na inflamação e transmissão da dor, é possível supor que o estrógeno esteja indiretamente envolvido nos processos desencadeados pela ação do ON (Nekora-Azak, 2004).

Certamente a percepção da dor não é causada por um fator único mais sim por um conjunto de fatores citado anteriormente, tendo sido comprovado que fatores psicológicos incluindo depressão e ansiedade, alteram a percepção da dor. Pacientes com depressão são 3 a 7 vezes mais susceptíveis a desenvolver sintomas de dor crônica múltipla quando comparados com indivíduos sem depressão (Ohayon & Schatzberg, 2003). Assim como outros estudos demonstram que, a percepção à dor tende a aumentar em indivíduos com traços de ansiedade (Edward *et al*, 2000).

Poucos estudos identificam a correlação da percepção à dor com características genéticas em humanos (Fillingim *et al*, 2005). Isto também se verifica quanto à observação de alterações genéticas com relação à presença de sinais e sintomas nas DTM. Lee *et al* (2005), investigaram a influência do polimorfismo do gene receptor alfa de estrógeno (ER α) sobre o crescimento ósseo craniofacial em mulheres com osteoartrite sintomática (OA) na articulação temporomandibular (ATM). No estudo, diagnosticaram OA nas ATMs de 76 mulheres através do Critério de Diagnóstico para Desordem Temporomandibular (RDC-TMD). Nestas foram avaliados os haplótipos dos polimorfismos genéticos

PvuII e *XbaI*, presentes no ER α , sugerindo que o mesmo contribui para alterar as dimensões esqueléticas em mulheres portadoras de osteoartrite nas ATM.

Porém existem alguns estudos (Olesen *et al*,1993; Millan *et al*,1994; Bergink *et al*,2003) que confirmam que os polimorfismos *XbaI* e/ou *PvuII* no receptor alfa de estrógeno, em pacientes do sexo feminino, predispõe estas à osteoartrite, uma doença de caráter inflamatório que afeta predominantemente as mulheres de forma semelhante aos padrões que ocorre com as DTM.

Ongphiphadhanakul *et al* (1998), estudando o polimorfismo no receptor α (*PvuII*) de estrógeno em pacientes sexo feminino com osteoartrite, relatou que esse polimorfismo estava associado com a densidade mineral do osso em mulheres em idade pré-menopausa e não diferia entre as pacientes em período pós menopausa. Relata também que o polimorfismo do gene receptor de estrógeno pode ter um papel modulatório no metabolismo do cálcio e ósseo durante a adolescência e início da idade adulta.

A presença de um polimorfismo no gene receptor de estrógeno poderia conduzir à alteração da atividade deste hormônio sobre o limiar de dor, interagindo, por exemplo, com o sistema opióide e alterando a percepção algica. Isto possibilitaria estabelecer correlações entre o dimorfismo sexual e a percepção da dor, o que permitiria maior compreensão do fenômeno e conseqüentemente o estabelecimento de propostas terapêuticas mais específicas para dor crônica relacionada à DTM.

III - PROPOSIÇÃO

O objetivo deste presente estudo foi analisar a correlação entre dois polimorfismos genéticos ligados ao receptor α do estrógeno (Pvu II no intron 1 T-397C, e Xba I no intron 1 A-351G) e a predisposição de sinais e sintomas dos desarranjos internos da articulação temporomandibular (ATM) (deslocamento de disco com e sem redução e artralgia), em mulheres da região de Piracicaba.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1– VOLUNTÁRIOS

Neste estudo foi realizada a frequência dos polimorfismos genéticos em 300 voluntárias do sexo feminino que se enquadrassem nos seguintes critérios de inclusão e exclusão: *inclusão* - idade variando entre 18 a 45 anos e possuírem no mínimo de 20 dentes tendo obrigatoriamente ter os dentes posteriores para oferecer o suporte posterior, para o grupo controle deveriam apresentar ausência de sinais e sintomas de DTM, para o grupo experimental 1 deveriam apresentar sinais de desarranjos internos na articulação sem presença de sintomas, para o grupo experimental 2 as voluntárias deveriam apresentar sinais e sintomas de desarranjos interno na ATM. As voluntárias que possuíam sintomatologia dolorosa deveriam apresentar este sintoma por pelo menos 6 meses; *exclusão*: fazer uso de nenhum medicamento anticoncepcional, serem portadoras de doença de inflamação sistêmica (dados obtidos através de questionamento direcionado), doenças neurológicas (como por exemplo neuralgia do trigêmio), portadoras de neoplasias, gravidez ou usuárias de entorpecentes. Elas foram divididas em três grupos: grupo controle composto por 100 voluntárias que não apresentavam sinais e sintomas de DTM; grupo experimental 1, composto por 100 voluntárias portadoras de desarranjo interno nas ATMs e com presença de dor; grupo experimental 2, composto por 100 voluntárias portadoras de desarranjo interno nas ATMs e ausência de dor.

A seleção dos indivíduos foi realizada através do RDC/TMD composto de dois axis (axis I = muscular e axis II articular), sendo utilizado o axis II (Dworkin &

LeReshe,1992), contemplando questionário anamnésico e exame clínico com dados suficientes para diagnosticar a presença de sinais e sintomas de DTM.

Foi realizado a calibração intra examinador, onde o operador realizou o RDC/TMD em 10% da amostra (30 voluntárias) no início da coleta de dados e repetiu o exame nas mesmas voluntárias após 1 mês para analisar o grau de concordância.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa FOP/Unicamp (protocolo CEP nº. 137/2004), e as voluntárias que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 - OBTENÇÃO DO DNA

De cada voluntária dos grupos teste e controle, foram obtidas células epiteliais da mucosa bucal a partir de um bochecho com solução de glicose a 3%. Dessas células foi extraído o DNA cromossômico, seguindo o protocolo desenvolvido na Área de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-Unicamp) (Aidar, 2005), conforme o descrito a seguir:

1. Foi adicionado 1 ml de solução de TNE (10mM tris pH8, 150mM NaCL, 2mM EDTA) na saliva coletada. Cada amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm.
2. O sobrenadante foi desprezado, e ao pellet formado no fundo do tubo de vidro foi adicionado mais 1 ml de TNE para uma segunda lavagem. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e, depois de transcorrido este tempo, o sobrenadante foi novamente desprezado.

3. Foi adicionado 1,3 ml de solução de extração de DNA (10 mM tris pH 8, 0,5% SDS, 5mM EDTA) contendo 10µl de proteinase K (20 mg/ml, solução mãe) em cada amostra. Em seguida as mesmas foram vortexadas por 5 segundos para desmanchar o pellet e, posteriormente, permaneceram por 12 horas na estufa a 50°C.
4. No dia seguinte foram colocados 1,4 ml de cada amostras em tubos de 2 ml. Estes tubos foram completados com 500 µl de solução de precipitação de DNA (acetato de amônio 10M, EDTA 1mM) e vortexados por 5s. Depois de realizados estes procedimentos, os tubos foram levados para centrífuga, onde permaneceram por 10 minutos a 17000 g, obtendo-se assim um sobrenadante límpido com a formação de um pellet no fundo do tubo.
5. 1800µl do sobrenadante de cada amostra foi dividido em dois tubos contendo 900 µl em cada tubo, nos quais foi adicionado 540µl de isopropanol. Os tubos foram levados a centrifuga novamente por 5 minutos. Depois de transcorrido este tempo, o sobrenadante foi desprezado e nestes, foram acrescentados 1,0 ml de etanol 70% e levados a centrifuga por mais 5 minutos.
6. O sobrenadante foi desprezado e os tubos com pellet formado foram deixados secar por 15 minutos na estufa a 50° C.
7. Em cada tubo foi acrescentado 100 µl de TE (10nM tris-Cl, 1mM EDTA ph8,0) e estas amostras permaneceram 12 horas à temperatura ambiente para que o pellet fosse dissolvido.

8. Após 24 horas, os dois tubos de cada amostra foram juntados em um único tubo e centrifugados na microcentrifuga por 1 minuto. As amostras foram então congeladas.

4.3– AMPLIFICAÇÃO DOS GENES E DIGESTÃO ATRAVÉS DE ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Através de reação de PCR (polimerase chain reaction) foi realizado a amplificação de fragmentos específicos do gene ER α com o auxílio de um termociclador convencional (*GeneAmp*®PCR System 9600).

Em um tubete de 0,5 ml foram adicionados dinucleotídeos livres (dntp), primer 1 (reward); primer 2 (foward), tampão (buffer), enzima Taq-DNA polimerase e amostras de DNA extraído, segundo a metodologia descrita por Aidar (2005).

Foi então preparado gel de agarose a 10% onde a amostra foi corrida através da técnica de eletroforese. Após esse procedimento o gel foi fixado por 5 minutos (etanol a 10% e ácido acético 0,5%) e corado em solução de prata por 15 minutos. O gel foi lavado em imersão de água destilada, e colocado numa solução reveladora (Hidróxido de Sódio 3%, formaldeído 0,5%) até o aparecimento das bandas.

Em seguida, foi realizada a técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism), na qual os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição (Xbal e PvuII) para a identificação dos alelos.

Finalmente, o produto do RFLP foi submetido à eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% que posteriormente foram corados pela técnica da imersão em solução de prata (Sanguinetti *et al*, 1994) para possibilitar a interpretação dos resultados. A localização do polimorfismo (figura1), tamanho dos cortes de restrição (figura 2) , os primers, condições de amplificação e restrição do polimorfismos genéticos que foram estudados estão descritos abaixo:

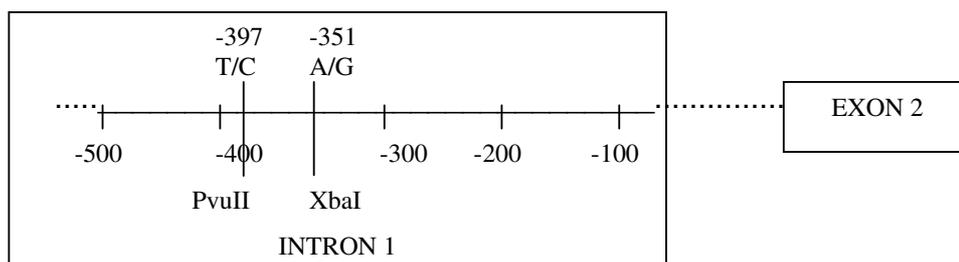


Figura 1 - Localização dos polimorfismos XbaI e PvuII no intron 1 do gene receptor alfa de estrógeno

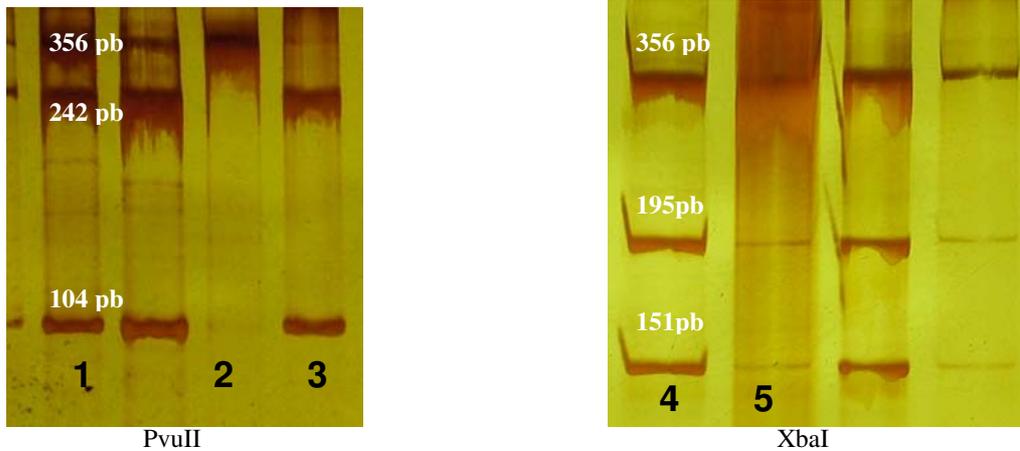


Figura 2: Géis de restrição mostrando os cortes para PvuII e XbaI respectivamente, onde **1** representa o paciente heterozigoto (TC) para os alelos T e C; **2** representa que este paciente é homozigoto (TT) para o alelo T; **3** representa que este paciente é homozigoto (CC) para o alelo C; **4** representa o paciente heterozigoto (AG) para os alelos A e G; **5** representa que este paciente é homozigoto (GG) para o alelo G.

1) ER α (T-397C) Primers 5' – GATATCCAGGGTTATGTGGCA – 3'

5' – AGGTGTTGCCTATTATATTAACCTTGA – 3'

PCR: 35 ciclos de 95°C, 61°C, 72°C 6°C (janela 1 – 5'40''; 0;0;0; janela 2 - 1'40''; 1'40''; 1'40'';0; janela 3 -0;0; 7'40'';0; janela 4 – 0;0;0;30') 10 μ L do produto foram digeridos com 5U de *Pvu* II por 16 horas (37°C) para detecção do alelo C (104 pb + 242 pb) e do alelo T (346 pb) (*Bergink et al. 2003*).

12) ER α (A-351G): Primers 5' – GATATCCAGGGTTATGTGGCA – 3'

5' – AGGTGTTGCCTATTATATTAACCTTGA – 3'

PCR: 35 ciclos de 95°C, 61°C, 72°C, 6°C (janela 1 – 5'40''; 0;0;0; janela 2 - 1'40''; 1'40''; 1'40'';0; janela 3 -0;0; 7'40'';0; janela 4 – 0;0;0;30') 10 μ L do produto foram digeridos com 5U de *Xba*I por 16 horas (37°C) para detecção do alelo A (151 pb + 195 pb) e alelo G (346pb) (*Bergink et al. 2003*).

4.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o polimorfismo estudado, as frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os dois grupos teste, e entre cada grupo experimental e o controle com o auxílio do teste de χ^2 (significância de 5%). E o risco associado com os genótipos e alelos foi calculado através do teste Odds Ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (CI).

V - RESULTADOS

Após a análise dos polimorfismos Xbal e PvuII no Intron 1 no gene receptor α de estrógeno, observa-se na Tabela 1 que não houve diferença significativa na frequência dos genótipos e dos alelos entre as voluntárias do grupo controle, grupo experimental 1 (DTM sem dor) e grupo experimental 2 (DTM com dor).

Tabela 1- Frequência dos genótipos e dos alelos do ER α

Grupos	Genótipo ER α			Alelos ER α				
		Controle (%)	DTM (%)	DTM/dor (%)	Controle	DTM	DTM/dor	
PvuII	TT	15	10	11	T	83	85	78
(T/C)	TC	68	75	67	C	85	90	97
	CC	17	15	22	p	0.75		
P		0.6281						
Xba	AA	6	6	8	A	89	78	85
(A/G)	AG	83	74	68	G	94	94	103
	GG	11	20	24				
P		0.0615			p	0.75		

Na Tabela 2 pode-se observar que houve diferença significativa entre os genótipos para os dois grupos portadores de DTM (com dor e sem dor) comparados com o grupo controle ($p=0,0556$). Também houve diferença estatística para o grupo de DTM com dor e o grupo controle ($p= 0.0368$), porém não houve diferença significativa entre o grupo controle e DTM sem dor ($p=0,24$).

Tabela 2- Frequência dos genótipos do ER α para pacientes dos grupos Controle x DTM*, Controle X DTM com dor e controle X DTM sem dor, para p<0.05; *DTM (DTM com dor + DTM sem dor).

Grupos		Genótipos ER α				
		Controle (%)	DTM (%)	Controle	DTM Dor	
Xba (A/G)	AA	6	14	AA	6	8
	AG	83	142	AG	83	68
	GG	11	44	GG	11	24
	p	0.0556		p	0.0368	

O teste Odds Ratio (OR) demonstrado na Tabela 3, permite observar que na presença do genótipo GG, ocorre aumento de 2,55 vezes na chance da paciente apresentar algisia nos desarranjos internos articulares das ATMs.

Tabela 3- Risco associado com o genótipo GG do ER α para predisposição a dor através do teste Odds Ratio

		Controle (n=100)	DTM com Dor (n=100)	p	RO	IC
Xba I(A/G)	AA/AG	89	77	0,025	2,55	1,753
	GG	11	23			

VI- DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o genótipo homozigoto recessivo GG foi significativamente mais freqüente ($p=0,03$) nas mulheres com maior percepção de dor relacionada aos desarranjos internos da ATM. O teste Odds Ratio permitiu observar que na presença desse genótipo, ocorre aumento de 2,5 vezes na chance da paciente apresentar algia nos desarranjos internos articulares da ATM. Isto comprova que existem fatores genéticos interagindo na experiência interindividual da percepção da dor e na resposta cerebral a estímulos dolorosos, como o que foi suposto por Edward e Fillingim (1999); Edward *et al* (2001); Naliboff *et al* (2003) e Fillingim *et al* (2005)

A atividade do estrógeno é predominantemente intra-nuclear, necessitando de apenas 5 a 10% dos receptores ativos para desempenhar sua potência máxima hormonal. Como relatado por Zubieta *et al* 2002, quando os níveis deste hormônio são baixos, as mulheres são menos capazes de suprimir a dor profunda pela ativação do sistema μ -opióide. Esse polimorfismo nas pacientes que possuem maior percepção da dor (Tabela 2) pode estar favorecendo a inativação de alguns destes receptores para níveis menores que 5%, fazendo com que o hormônio esteroide não tenha sua ação total. Essa menor quantidade de hormônio ativo pode estar interagindo nos receptores de transdução da dor expressos pelos neurônios aferentes (Caterina *et al*, 1997,2000). Ou pode estar interagindo nos receptores opióides, que são moléculas moduladoras da dor

expressas periférica e centralmente (Blanck *et al* 1990; Craft *et al* 2004; Franco, 2004; Mc Kemy *et al*, 2002).

Por outro lado, outra hipótese seria considerar que o genótipo GG (Tabela 2) poderia estar ativando os receptores de estrógeno em níveis superiores a 10% provocando assim uma ação exacerbada desse hormônio. Conseqüentemente, isto poderia estar aumentando a liberação do Óxido Nítrico e de mediadores inflamatórios, provocando maior resposta inflamatória e conseqüentemente maior percepção de dor, conforme afirmam Tarbet *et al* (1991); Thomsen *et al* (1993); Olesen *et al* (1993) e Meller & Gelhart (1994).

Não há como afirmar de que maneira o polimorfismo no receptor α de estrógeno poderia estar agindo no efeito fisiológico deste hormônio, visto que nem na literatura há um consenso sobre a real ação do estrógeno na percepção da dor. Alguns trabalhos relatam que, dependendo da fase do ciclo menstrual na mulher, o estrógeno tem efeito álgico (Fricton & Schiffman, 1987; Dworkin & Leshere, 1990). Entretanto, outros autores relatam que o estrógeno age na analgesia através da ativação do sistema opióide (Trevisani *et al*, 2005; Zubieta *et al*, 2002).

Na realidade, o efeito do estrógeno na nocicepção parece estar associado a sua localização nos neurônios. Pode-se supor que, o receptor de estrógeno estiver localizado num neurônio responsável pela ativação do sistema de inibição da dor, como por exemplo, o sistema opióide, ele irá ativar a modulação da dor; porém se o mesmo estiver localizado nos neurônios inibidores da analgesia, sua ação será álgica. Segundo Vanderhort *et al* 2005, embora os neurônios imunoreativos aos

receptores de estrógenos (ER- α -IR) estejam localizados em diferentes áreas do SNC, vinculadas a outras funções fisiológicas, os mesmos são encontrados em grande concentração naquelas áreas envolvidas no processamento das informações algica e anti-algica viscerais e provenientes da face .

Este estudo comprovou que o estrógeno está relacionado com a percepção da dor crônica nas mulheres, visto que um polimorfismo em seu receptor esteve significativamente mais presente nas portadoras de dor crônica relacionada à DTM (Tabela 2), o que reforça a hipótese de que fatores genéticos estão também relacionados ao processamento da dor crônica nas mulheres com desarranjo interno da ATM, conforme o suposto por vários autores (Fillingim *et al*, 2005; Kim *et al*, 2004). Porém resta ainda saber se este polimorfismo atua sobre o receptor ativando-o ou inativando-o, para que se possa estabelecer o real papel do estrógeno na percepção da dor em mulheres com desarranjos internos da articulação temporomandibular.

Pode-se verificar também, através da Tabela 2, mesmo diante de diferença estatística significativa ($p=0.05$), que esse polimorfismo não predispõe as mulheres a apresentarem desarranjos internos nas ATMs. Ao verificar a Tabela 1, o valor de “p” para a correlação grupo controle X DTM sem dor X DTM com dor foi igual a 0.06. Ao se relacionar o grupo controle com o grupo DTM* (DTM sem dor + DTM com dor), o valor de “p” diminuiu para 0.05; porém esse decréscimo foi devido ao grupo DTM com dor.

Embora o valor de “p” não tenha sido significativo, este se apresentou muito próximo do valor de significância ($p<0,005$). O aumento no número das amostras

poderia conduzir à diminuição desse valor ao nível de significância. Biologicamente pode-se relatar que o genótipo homozigoto GG pode estar predispondo a maior prevalência de Desordem Temporomandibular. Esse polimorfismo no receptor de estrógeno pode estar associado com um papel modulatório no metabolismo ósseo durante a adolescência e durante a idade de adulto jovem (Ongphiphadhanakul et al, 1998). Isto possibilitaria ao aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento do desarranjo interno das ATMs, que somados a outros fatores predisponentes, como por exemplo, a má oclusão, trauma, hábitos parafuncionais entre outros, poderiam levar ao desenvolvimento da doença.

Deve também ser considerada a interferência de outros receptores nos desarranjos internos da ATMs. Portanto, novos estudos precisam ser desenvolvidos com esta finalidade, uma vez que os desarranjos internos da ATM são prevalentes e estabelecem conseqüências clínicas de relevância à clínica odontológica.

VII- CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados pudemos concluir que:

1. Existe correlação entre o polimorfismo Xba I e a presença de percepção e dor relacionada aos desarranjos internos da ATM.
2. A presença do genótipo GG (Xba I no intron 1) aumenta em 2,5 vezes a chance de mulheres em idade fértil com desarranjo interno na ATM apresentarem dor articular.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aidar M. **Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando Acetato de amônio. Piracicaba,2005, 40p. Dissertação** (Mestrado em Biologia Buco-Dental, área de Histologia e Embriologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

Aloisi AM, Ceccarelli I. Role of gonadal hormones in formalin induced pain responses of male rats. Modulation by estradiol and naloxone administration. **Neuroscience**. 2000;95:559-66

Aufdemorte TB, Van Sickels JE, Dolwick Mf, Sheridan PJ, Holt GR, Aragon SB *et al*. Estrogen receptor in the temporomandibular joint of the baboon (*Papio cynocephalus*) na autoradiographic study. **Oral Surg Oral Med Oral Phatol** 1986; 61:307-14.

Belcher SM. Regulated expression of estrogen receptor alpha and beta mRNA in granule cells during development of the rat cerebellum. **Brain Res Dev Brain Res**. 1999;115(1):57-69.

Bergink AP, Van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, Van Leeuwen JP, Van Duijn CM, Uitterlinden AG, Pols HA. Estrogen receptor alpha gene

haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. **Arthritis Rheum.** 2003; 48(7):1913-22.

Berne RM, Levy MN. **Fisiologia.** In: Princípios gerais da fisiologia endócrina. Guanabara Koogan. 4^a. ed. 1998, 740-741

Blanck A, Hansson T, Naslund B, Rane. A Sex differences and endocrine regulation of morphine oxidation in rat liver. **Biochem Pharmacol.** 1990;39(11):1820-2.

Carlsson G, Le Reshe L. Epidemiology of temporomandibular disorders. In Sessle B, Bryant P, Dione R, editors. Progress in pain research and management Seattle, **WA: IASP Press**; 1995. P 211-26.

Caterina MI, Schumacher MA, Tominaga M, TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature.** 1997;389(6653):783-4.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D .Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.**Science.**2000;288(5464):306-13.

Chakraborty TR, Gore AC. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. **Exp Biol Med** (Maywood). 2004;229(10):977-87.

Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, Macmillan J, Griffiths LR. The estrogen receptor 1 G594A polymorphism is associated with migraine susceptibility in two independent case/control groups. **Neurogenetics**. 2004 Jun;5(2):129-33.

Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. **Eur J Pain**. 2004;8(5):397-411.

Dao TT, Knight K, Ton-That V. Modulation of myofascial pain by the reproductive hormones: a preliminary report. **J Prosthet Dent**. 1998;79(6):663-70.

Douglas RD. **Tratado de Fisiologia aplicado à saude**. In: Nocicepção. Cap. 15 4^a. ed. 1999-2000, 740-741.

Dworkin SF, Huggins KH, Lereshe L, Von Forff M, Howard J, Truelove E, Sommers E. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: Clinical signs in cases and controls. **J Am Dent Assoc**. 1990a; 120 (3): 273-81.

Dworkin SF, Lereshe L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. **J Craniomandb Disord. Facial Oral Pain** 1992; 6:301-55.

Edwards R, Fillingim Rb. Ethnic differences in thermal pain responses. **Psychosom Med.** 1999;61(3):346-54.

Edwards R, Auguston EM, Fillingim RB Sex-specific effects of pain-related anxiety on adjustment to chronic pain. *Clin J Pain.* 2000 Mar;16(1):46-53.

Edwards R, Fillingim RB, Keefe F. Race, ethnicity and pain. **Pain.** 2001;94(2):133-7.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacol Rev.** 2000;52(4):513-56.

Fillingim RB, Edwards RR, Doleys DM.Re: McCracken *et al.* A comparison of blacks and whites seeking treatment for chronic pain. **Clin J Pain** 2001 ; 17 (2): 249-55.

Fillingim RB, Kaplan L, Staud R, Ness TJ, Glover TL, Campbell CM, Mogil JS, Wallace MR The A118G single nucleotide polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) is associated with pressure pain sensitivity in humans. **Pain.** 2005; 6(3): 159-67.

Fricton JR, Schiffman EL. The craniomandibular index: Validity. **J Prosthet Dent.** 1987; 58:222-8.

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

Keogh E, Mansoor L. Investigating the effects of anxiety sensitivity and coping on the perception of cold pressor pain in healthy women. **Eur J Pain.** 2001; 5(1): 23-5.

Kim H, Neubert JK, San Miguel A, Xu K, Krishnaraju RK, Ladarola MI, Goldman D, Dionne RA. Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. **Pain.** 2004; 109 (3): 488-96.

Laflamme N, Nappi Re, Drolet G, Labrie C, Rivest S. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. **J Neurobiol.** 1998; 36(3): 357-78.

Lee DG, Kim TW, Kang SC, Kim ST. Estrogen receptor gene polymorphism and craniofacial morphology in female TMJ osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Sep 7; [Epub ahead of print]

LeResche L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. **Crit Ver Oral Biol Med**. 1997; 8 (3): 291-305.

Mc Ewen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocr Rev**. 1999; 20(3): 279-307.

Mc Ewen BS, Coirini H, Westlind-Danielson A, Frankfurt M, Gould E, Schumacher M, Woolley C. Steroid hormones as mediators of neural plasticity. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1991; 39 (2): 223-32

Mc Ewen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocr Rev**. 1999; 20(3):279-307.

Meller ST, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience** 1994; 60 (2): 367-74.

Meller ST, Gebhart GF. Spinal mediators of hyperalgesia *Drugs* 1994;47 (suppl5):10-20.

Mersky YH. Classification of chronic pain. Description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the international Association for the Study of Pain, Subcommittee on taxonomy **Pain**.1986; 3 Suppl S1-S226

Mogil JS, McCarson KE. Identifying pain genes: bottom-up and top-down approaches. *J Pain*. 2000 Sep;1(3 Suppl):66-80.

Naliboff BD, Berman S, Chang L, Derbyshire SW, Suyenobu B, Vogt BA, Mandelkern M, Mayer EA. Sex-related differences in IBS patients: central processing of visceral stimuli. **Gastroenterology**. 2003; 124(7): 1738-47.

Nekora-Azak A. Temporomandibular disorders in relation of female reproductive hormones: A literaratura Review. **J Prosthet Dent** 2004; 91(5): 491-3

Ohayon MM, Schatzberg AF. Using chronic pain to predict depressive morbidity in the general population. **Arch Gen Psychiatry**. 2003; 60(1): 39-47.

Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL Nitric oxide supersensitivity: a possibile molecular mechanism of migraine pain. **Neuroreport** 1993; 4(8):1027-30

Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chanprasertyothin S, Piaseu N, Chailurkit L, Sirisriro R, Komindr S. Estrogen receptor gene polymorphism is associated with bone mineral density in premenopausal women but not in postmenopausal women.

J Endocrinol Invest. 1998; 21(8): 487-93.

Pilgrim C, Hutchinson JB. Developmental regulation of sex difference in brain: can the role of gonadal steroids be redefined? **Neuroscience** 1994; 60 (4):843-55

Ratka A. Effects of estradiol and progesterone on pharmacodynamics and pharmacokinetics of morphine in male rats. **J Idaho Acad Sci.** 1995; 31:217-28.

Sanguinetti, C.J., Dias, E.N. & Simpson, A.J.G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 17: 915-919

Sarlani E, Greenspan JD Evidence for generalized hyperalgesia in temporomandibular disorders patients. **Pain** 2003, 102 (3): 221-6.

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. **J Comp Neurol.** 1990;294(1):76-95.

Stewart WF, Lipton RB, Celentano DD, Reed ML. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation age, income, race and other sociodemographic factors. **J Am Med Assoc** 1992; 267:64-9.

Tarbet EB, Stafforini DM, Elstad MR, Zimmerman Ga, McIntyre Tm, Prescott Sm
Liver cells secrete plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. **J Biol Chem** 1991; 266(25): 16667-73.

Tchernitchin NA. Eosinophil-mediated non genomic parameters of estrogen stimulation-a separate group of responses mediates by independent mechanism. **J Steroid Biocheml** 1983; 19:95-100.

Thomsen LL, Iversen Hk, Brinck TA, Olesen J. Arterial supersensitivity to nitric oxide (nitroglicerin) in migraine sufferers. **Chephalalgia** 1993;13:395-3.

Toran-Allerand CD, Guan X, Maclusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly Es Jr, Nethrapalli IS, Tinnikov AA. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. **J Neurosci**. 2002; 22(19): 8391-401

Trevisani MA, Gameiro GH, Tameli CH, Veiga MCFA. Periferal effect of kappa opioid receptor antagonist on nociception evoked by formalin injected in TMJ of pregnant rats. *Life Sci*. 2005, 76:1177-1188.

Turk DC. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for patients with chronic pain. **Clin J Pain**. 2002; 18(6):355-65.

Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**. 1999;7(6):560-6.

Vanderhorst VG, Gustafsson JA, Ulfhake B. Estrogen receptor-alpha and -beta immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *J Comp Neurol*. 2005; 25; 488 (2):152 - 79.

Vliagoftis H, Dimitriadou V, Boucher W, Roznieck JJ, Correia I, Raam S *et al*. Estradiol arguments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. **Int Arch Allergy Immunol** 1992; 98:398-409.

Von Korff M, Dworkin SF, Lereshe L, Kruger A. An epidimiologic comparison of plain complaints. **Pain** 1988; 32:173-83

Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, Meyer CR, Koeppe RA, Stohler CS. mu-opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. **J Neurosci**. 2002;22(12):5100-7.

Anexo 1

ANÁLISE ESTATÍSTICA χ^2

GENÓTIPO

POLIMORFISMO Xba I

DTMX DTM DORX CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 3

Qui-Quadrado = 6.756

Graus de liberdade = 4

(p) = 0.1493

DTM + DTM DOR x CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 2 x 3

Qui-Quadrado = 5.780

Graus de liberdade = 2

(p) = 0.0556

DTM DOR X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 2

Qui-Quadrado = 6.604

Graus de liberdade = 2

(p) = 0.0368

DTM sem dor X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 2

Qui-Quadrado = 3.129

Graus de liberdade = 2

(p) = 0.2092

POLIMORFISMO Pvull

DTM X DTM DOR X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 3

Qui-Quadrado = 2.593

Graus de liberdade = 4

(p) = 0.6281

DTM + DTM DOR x CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 2

Qui-Quadrado = 1.656

Graus de liberdade = 2

(p) = 0.4368

DTM DOR X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 2

Qui-Quadrado = 1.653

Graus de liberdade = 2

(p) = 0.4375

DTM X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 2

Qui-Quadrado = 1.468

Graus de liberdade = 2

(p) = 0.4801

ALELOS

POLIMORFISMO XbaI

DTM X DTM DOR X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 2

Qui-Quadrado = 0.550

Graus de liberdade = 2

(p) = 0.7595

DTM X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 2 x 2

Qui-Quadrado = 0.549

Graus de liberdade = 1

(p) = 0.4585

Correção de Yates = 0.423

(p) = 0.5155

DTM DOR X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 2 x 2

Qui-Quadrado = 0.436

Graus de liberdade = 1

(p) = 0.5091

Correção de Yates = 0.309

(p) = 0.5781

POLIMORFISMO PvuII

DTM X DTM DOR X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 3 x 2

Qui-Quadrado = 0.927

Graus de liberdade = 2

(p) = 0.6291

DTM X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 2 x 2

Qui-Quadrado = 0.549

Graus de liberdade = 1

(p) = 0.4585

Correção de Yates = 0.423

(p) = 0.5155

DTM DOR X CONTROLE

Resultados

Tabela de Contingência = 2 x 4

Qui-Quadrado = 0.405

Graus de liberdade = 3

(p) = 0.9392