

CAROLINA BERALDO MELOTO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS PARA O RECEPTOR
ALFA DE ESTRÓGENO EM MULHERES BRASILEIRAS COM
DESARRANJO INTERNO DA ATM**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica, Área de Prótese Dental.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti-Barbosa
Co-orientadores: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line
Prof. Dr. Aarão Mendes Pinto Neto

PIRACICABA
2008

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

M492a Meloto, Carolina Beraldo.
Análise de polimorfismos genéticos para o receptor alfa de estrógeno em mulheres brasileiras com desarranjo interno da ATM. / Carolina Beraldo Meloto. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Célia Marisa Rizzatti-Barbosa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Disfunção temporomandibular. 2. Menopausa. 3. Genótipo.
I. Rizzatti-Barbosa, Célia Marisa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(mg/fop)

Título em Inglês: Analyses of estrogen receptor alpha genetic polymorphisms in Brazilian women with TMJ internal derangement

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Temporomandibular disorder. 2. Menopause. 3. Genotype

Área de Concentração: Prótese Dental

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Célia Marisa Rizzatti-Barbosa, Rubens Nelson Amaral de Assis Reimão, Altair Antoninha Del Bel Cury

Data da Defesa: 18-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata CAROLINA BERALDO MELOTO aprovada.



PROFa. DRa. CELIA MARISA RIZZATTI BARBOSA



PROF. DR. RUBENS NELSON AMARAL DE ASSIS REIMÃO



PROFa. DRa. ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY

Este trabalho é dedicado a Deus, força criadora e inspiradora de tudo o que é bom e cujos mistérios me instigam a eterna busca pela verdade.

Do começo ao fim, esta dissertação é dedicada especialmente aos meus pais, Alaor e Rosana, meus maiores incentivadores e admiradores, a quem devo tudo o que sou, tudo o que posso e todas as oportunidades que tenho.

Ao meu irmão, Raphael, meu melhor amigo, meu eterno cúmplice e meu porto seguro.

A Vocês, com muito amor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, Professora Dra. Célia Marisa Rizzatti-Barbosa, que tão prontamente me acolheu ainda durante a graduação e tão grandemente me orientou até este momento. Mais do que uma orientadora, uma amiga, um exemplo de profissional e uma mãe de coração. Obrigada por tudo;

Ao Professor Dr. Sérgio Roberto Peres Line, do Departamento de Morfologia (FOP-Unicamp), que me abriu as portas do Laboratório de Biologia Molecular para possibilitar a execução desta pesquisa e do conhecimento sobre esta fascinante ciência;

Ao Professor Dr. Aarão Mendes Pinto Neto, do Departamento de Tocoginecologia (FCM-Unicamp) a quem devo a possibilidade de realização deste trabalho por ter gentilmente me recebido no Ambulatório de Menopausa (CAISM-Unicamp) e permitido o acesso às pacientes;

Ao Professor Dr. Wei Hou, da Universidade da Flórida (Gainesville/FLA-EUA) pelo auxílio prestado na análise estatística desta dissertação;

À Professor Altair Antoninha Del Bel Cury, do Departamento de Prótese e Periodontia (FOP-Unicamp) pelo exemplo de competência e por todo o conhecimento transmitido ao longo da Pós-Graduação;

À minha avó, Maria, por tudo e principalmente pela acolhida amorosa em todos os momentos em que este trabalho exigiu idas e vindas entre Piracicaba e Campinas;

À grande amiga Priscila de Oliveira Serrano, que dividiu comigo momentos de trabalho, descanso, alegria e angústia durante os três anos que precederam este momento. São imensamente gratas as surpresas que Deus coloca em nosso caminho;

À amiga Margarete Cristiane Ribeiro, que me introduziu nesta linha de pesquisa e mesmo distante foi imprescindível na realização deste estudo. Saudades;

À grande amiga Tatiana Meulman Leite da Silva Bortolaci, pelos oito anos de amizade, de convivência, de carinho e de muita confiança. Estamos juntas nessa;

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, na pessoa do Diretor Professor Doutor Francisco Haiter Neto;

Ao coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Unicamp, Professor Doutor Jacks Jorge Júnior;

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

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 meus mestres, que me orientaram na formação como Cirurgiã-Dentista e ao longo da Pós-Graduação;

Às amigas de infância, Maria Clara Biajoli e Ana Cláudia Chaves. Vocês foram indispensáveis à realização deste sonho por dividirem comigo absolutamente todas as suas etapas, me apoiando sempre em todas as decisões;

Às minhas amigas de graduação, que hoje são uma grande família unida por todo o amor, apoio e incentivo cultivado entre nós ao longo de oito anos: Camila Boer, Fernanda Hass, Letícia Costa, Maria Fernanda Grando, Marina Pace, Tatiana Meulman, Tatiana Sanches e Thais Emidio;

À amiga querida Laís Regiane Silva-Concílio, pelo companheirismo, carinho e amizade sinceros;

À Dona Joselena Casatti, técnica do laboratório de Prótese Parcial Removível, que sempre tornou tão agradáveis os longos dias de trabalho e carinhosamente aconselhou nos momentos difíceis;

Aos colegas e companheiros de Pós-Graduação em Prótese de hoje, e todos os que tive a oportunidade de conviver e compartilhar momentos de aprendizado e descontração: Marinaldo Zampieri, Nelson Tetsu (*in memoriam*), Leonardo Panza, Tatiana Pereira, Cristiane Machado, Fernanda Faot, William Custodio, Simone Gomes, Antônio

Pedro Ricomini, Alfonso Sánchez, Thaís Gonçalves, Priscila Gomes, Silvia Lucena, Fabiana Straioto, Wander José da Silva, Frederico Fernandes;

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular, pela carinhosa acolhida em seu laboratório e principalmente pela disponibilidade em ajudar e ensinar: Marise Aidar, Maria Cristina, Liza Lima Ramenzoni, Cristina Salmon, Carolina Vieira de Almeida, Mariana Martins Ribeiro, Aline Cristiane Planello, Gylci Raymundo Damm, Naila Francis Paulo de Almeida;

A todas as mulheres que se voluntariaram a participar desta pesquisa, sem o que este sonho jamais se tornaria realidade.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”
(Louis Pasteur)

RESUMO

Disfunções temporomandibulares (DTM) são condições encontradas na clínica que causam disfunção e dor no sistema mastigatório, promovidas por uma combinação de fatores, dentre os quais se incluem os hormonais e genéticos. Mulheres são marcadamente mais acometidas por estas desordens e, ao mesmo tempo, indivíduos submetidos à multifatoriedade etiológica das DTM respondem diferentemente quanto ao desenvolvimento e progressão da doença. Em conjunto, essas informações permitem sugerir uma correlação entre os hormônios sexuais femininos estrogênicos e a fisiopatologia das DTM, além de indicarem que condições genéticas inerentes ao indivíduo possam modular a capacidade patogênica do estrógeno. Os efeitos dos estrógenos no organismo são mediados pela sua ligação a receptores específicos localizados no citosol e núcleo celular, dos quais o receptor α (RE α) é o mais conhecido e estudado. Em face disso, esta dissertação teve como objetivo investigar a associação de dois polimorfismos de nucleotídeo único localizados no íntron 1 do gene que codifica o receptor de estrógeno alfa e que são identificados pelas enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI*, com os sinais e sintomas de desarranjos internos da articulação temporomandibular (ATM) em mulheres brasileiras na pós-menopausa, fazendo ou não terapia por reposição hormonal. Para isso, foi realizada a genotipagem destes polimorfismos para 284 mulheres na pós-menopausa, divididas em seis grupos de acordo com a presença ou ausência de desarranjos internos da articulação temporomandibular – dada pelo critério de diagnóstico em pesquisa para desordens temporomandibulares (RDC/TMD) – e com seu estado hormonal – hipoestrogenia ou sob terapia de reposição hormonal (TRH): Controle (Menopausa); DTM sem dor (Menopausa); DTM com dor (Menopausa); Controle (TRH); DTM sem dor (TRH); e DTM com dor (TRH). A ausência dos sítios de restrição para as enzimas *PvuII* e *XbaI* foi convencionalmente indicada com as letras maiúsculas *P* e *X*, e sua presença com as letras minúsculas *p* e *x*, respectivamente. Os sujeitos, portanto, foram designados como homocigotos *PP* ou *XX*, *pp* ou *xx*, ou ainda, heterocigotos *Pp* ou *Xx*. A comparação da frequência dos genótipos entre os grupos controles e cada um dos grupos de pacientes portadores de desarranjos internos de DTM foi realizada através do teste χ^2 , com

nível de significância em 5%. O risco associado aos alelos foi calculado, quando pertinente, através do teste *Odds Ratio* (OR) com 95% de intervalo de confiança (CI). Como resultados, o genótipo homozigoto *PP* no grupo DTM sem dor (TRH) representou, em relação ao heterozigoto *Pp*, um risco 0,3125 vezes maior para DTM sem dor quando comparado com o grupo Controle (Menopausa) e um risco 0,2051 vezes maior para a mesma condição quando comparado ao grupo Controle (TRH). Já para o sítio polimórfico reconhecido pela enzima de restrição *XbaI*, nenhuma associação efetiva pôde ser encontrada. Consideradas as limitações deste estudo, os resultados encontrados permitiram sugerir que o genótipo homozigoto *PP* no íntron 1 do *REα* pode, na presença de estrógeno, ser considerado um marcador de risco para o desenvolvimento de patologias articulares na ATM de mulheres brasileiras.

Palavras-chave: Disfunção temporomandibular, Estrógenos, Menopausa, Polimorfismo genético, Genótipo.

ABSTRACT

Temporomandibular disorders (TMD) are conditions found at the clinic that manifest through dysfunction and pain in the masticatory system and are caused by a combination of factors, including hormonal and genetic factors. Women are markedly more affected by these disorders and, at the same time, individuals submitted to the multifactorial etiology of TMD respond differently when it comes to the development and progression of the disease. Taken together, these informations suggest a connection between the female estrogenic sexual hormones and the TMD pathophysiology, as well as they can indicate that individual genetic conditions may modulate estrogens pathogenic capacity. Estrogen effects in the organism are mediated by its binding to specific receptors in the cell cytosol and nucleus, of which the α receptor (ER α) is the most known and studied one. Face to that, this dissertation aimed to investigate the association of two single nucleotide polymorphisms located at the first intron of the estrogen receptor alpha gene which are identified by the restriction enzymes *PvuII* and *XbaI* with signs and symptoms of temporomandibular joint (TMJ) internal disarrangements, in post-menopausal Brazilian women, undergoing or not hormonal replacement therapy (HRT). For that matter, these polymorphisms genotyping was performed for 284 post-menopausal women, divided into six study groups, according to the presence or absence of internal disarrangements of the temporomandibular joint – obtained through the research diagnostic criteria for temporomandibular disorders (RDC/TMD) – and to their hormonal status – hypoestrogenic or undergoing hormonal replacement therapy: Control (Menopause); Painless TMD (Menopause); Painful TMD (Menopause); Control (HRT); Painless TMD (HRT); and Painful TMD (HRT). The absence of the restriction sites for the endonucleases *PvuII* and *XbaI* was conventionally indicated with the upper case letters *P* and *X*, and its presence, with the lower case letters *p* and *x*, respectively. Subjects, therefore, were designated as *PP* or *XX*, or *pp* or *xx* homozygotes, or still, *Pp* or *Xx* heterozygotes. The comparison of the genotype frequency between control groups and each of the groups composed by patients carrying TMJ internal disarrangements was performed using the χ^2 test, with significance level set at 5%. The alleles associated risk was calculated,

when appropriate, using the *Odds Ratio* test (OR), with a 95% confidence interval (CI). As results, de *PP* homozygote genotype in the Painless TMD (HRT) group represented, in relation to the *Pp* heterozygote, a 0,3125 higher risk for painless TMD when compared to the Control (Menopause) group, and a 0,2051 higher risk for the same condition when compared to the Control (HRT) group. As for the polymorphic site recognized by the *XbaI* restriction enzyme, no effective associations could be shown. Within the limitations of this study, the results obtained allowed to suggest that *PP* homozygote genotype in the *ERα* gene first intron can, in the presence of estrogen, be considered a risk marker to the development of articular pathologies of the TMJ in Brazilian women.

Key-words: Temporomandibular disorder, Estrogens, Menopause, Genetic polymorphism, genotype.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	-	Articulação temporomandibular
DTM	-	Disfunções temporomandibulares
PCR	-	Polimerase chain reaction
RE α	-	Receptor de estrógeno alfa
RFLP	-	Restriction fragment length polymorphism
SNP	-	Single nucleotide polymorphism
TRH	-	Terapia de reposição hormonal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
3 OBJETIVOS	32
4 SUJEITOS E MÉTODOS	33
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6 RESULTADOS	42
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE 1	74

1 INTRODUÇÃO

As desordens temporomandibulares (DTM) podem ser genericamente definidas como um grupo de condições clínicas que causam disfunção e dor no sistema mastigatório. É caracterizada por uma tríade de sintomas que inclui sons articulares, dor e limitação da função mandibular (Kuttila *et al.*, 1998).

Essas variáveis sintomáticas indicam que as DTM são causadas por uma combinação de fatores, tais como: oclusão, estresse mental, força muscular, fatores hormonais e genéticos. No entanto, a etiologia desta doença ainda não é completamente entendida (Yamada *et al.*, 2003).

O fato de mulheres serem marcadamente acometidas por esta desordem é extensivamente documentado na literatura em estudos epidemiológicos, embora não unânimes. Estima-se que indivíduos do gênero feminino sejam de 1,5 a 2 vezes mais acometidos por esta desordem do que indivíduos do gênero masculino e que cerca de 80% dos pacientes tratados para DTM sejam mulheres (Dworkin *et al.*, 1990).

A prevalência e severidade dos sintomas de DTM também parecem estar relacionadas à idade dos indivíduos: o início desta condição patológica tende a acontecer após a puberdade, parece estar associada à fase do ciclo menstrual, tem seu pico máximo entre mulheres em idade reprodutiva e mínimo entre crianças e idosos (LeResche *et al.*, 1997; LeResche *et al.*, 2003).

Consideradas em conjunto, essas informações acerca da distribuição por gênero, idade e período do ciclo menstrual das desordens temporomandibulares sugerem uma possível ligação entre a sua patogenia e o eixo hormonal feminino ou nível de estrógeno (Warren & Fried, 2001).

No que diz respeito à dor temporomandibular, ainda não há um consenso na literatura sobre o efeito do estrógeno sobre esta variável subjetiva. Existem estudos que indicam uma associação entre períodos de maiores níveis circulantes de estrógeno e períodos de maiores níveis de dor (LeResche *et al.*, 1997; Suenaga *et al.*, 2001), enquanto outros apontam na direção contrária (LeResche *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2008). Mediante esta

controvérsia, é possível hipotetizar que condições inerentes ao indivíduo e que sejam capazes de afetar sua responsividade ao estrógeno, tais como sua composição genética, possam modular a capacidade fisiopatológica e nociceptiva relacionada a este hormônio.

Os estrógenos são hormônios sexuais endógenos derivados de precursores androgênicos, como a testosterona, com inúmeras funções fisiológicas que extrapolam àquelas referentes ao sistema reprodutor feminino. Dentre as formas naturais de estrógeno a mais potente é o 17 β -estradiol, que predomina no período pré-menopausa, e é secretado pelos ovários, seguido da estrona, a principal forma circulante de estrógeno após a menopausa (Coelingh-Bennink, 2003). Seus efeitos são mediados pela sua ligação a receptores específicos localizados no citosol e núcleo celular. Estes receptores pertencem à superfamília dos receptores de hormônio nucleares e são fatores de transcrição induzidos por ligantes específicos, no caso, os estrógenos e seus agonistas. (Gennari *et al.*, 2005).

Neste modelo clássico de ação dos estrógenos, a via genômica, receptores não ocupados em células-alvos se ligam a agonistas, como o 17 β -estradiol, o que modifica sua conformação permitindo a dimerização espontânea e subsequente interação do dímero com elementos responsivos aos estrógenos nos genes-alvos (Henry *et al.*, 2008).

O receptor clássico de estrógeno (RE α) já foi identificado em vários tecidos. Além de estar presente no sistema reprodutor, os tecidos cardiovascular, esquelético, conjuntivo e nervoso também compreendem tecidos-alvos dos estrógenos (Yamada *et al.*, 2003). Estudos demonstraram a presença de RE α na cartilagem articular (Ushiyama *et al.*, 1999), osteoblastos e células superficiais do osso trabecular humanos (Hoyland *et al.*, 1997; Kusec *et al.*, 1998). Também foram identificados na ATM tanto de animais (Aufdemorte *et al.*, 1986; Milam *et al.*, 1987; Yamada *et al.*, 2003), como de humanos (Abubaker *et al.*, 1993), o que nos permite supor uma modulação periférica por parte dos estrógenos nas desordens que acometem essas articulações.

O gene que codifica este receptor se localiza no cromossomo 6 e abrange 8 éxons e 7 íntrons. No primeiro íntron deste gene, dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) já foram descritos: uma troca T – C localizada 397 pares de base (pb) acima do éxon 2 e identificada pela enzima de restrição

PvuII, e uma troca A – G encontrada a 351pb acima do mesmo éxon e reconhecida pela enzima de restrição *XbaI* (Langdahl *et al.*, 2000).

Apesar de íntrons corresponderem a porções não traduzidas dos genes, estes SNP intrônicos podem agir através de um dos mecanismos ou combinação de mecanismos a seguir: é sugerido que eles possam amplificar a transcrição do RE α (Herrington *et al.*, 2002) ou estar em desequilíbrio de ligação com polimorfismos funcionais em outro ponto do gene ou, menos provavelmente, com algum outro gene (Becherini *et al.*, 2000; Iwashita *et al.*, 2001).

Seja isoladamente ou em conjunto, estes dois SNP – identificados pelas enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI* – têm sido associados a desordens ósseas e articulares em diferentes populações de mulheres ao redor do mundo (Kobayashi *et al.*, 1996; Gennari *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1999; Ushiyama *et al.*, 1999; Loughlin *et al.*, 2000; Ongphiphahakaul *et al.*, 2000; Sapir-Koren *et al.*, 2001; Albagha *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2002; van Meurs *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2004; , Jin *et al.*, 2004; Valdes *et al.*, 2004; Koshizuka *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2007). Especificamente com relação às desordens temporomandibulares, três estudos foram desenvolvidos e relataram associações entre a DTM e estes polimorfismos para o RE α . (Ribeiro, 2005; Lee *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007).

Apesar dos mecanismos através dos quais os estrógenos exercem todas as suas funções biológicas permanecerem obscuros e estimularem o desenvolvimento de um número crescente de pesquisas, os achados biológicos moleculares de distribuição dos RE α em conjunto com estudos epidemiológicos que demonstraram associação entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* e condições osteoartríticas (Ushiyama *et al.*, 1998; Bergink *et al.*, 2003), admitem especular sobre o papel destes componentes genéticos na desregulação da integridade da ATM e estruturas mandibulares.

Vale ressaltar que o efeito das possíveis variações alélicas nestes sítios polimórficos - *PvuII* e *XbaI* – sobre estas desordens será mais prontamente esclarecido se for verificado em populações com diferentes níveis circulantes de estrógeno, o que pode ser acessado comparando-se mulheres na pós-menopausa sob efeito ou não da terapia de

reposição hormonal. No entanto, estudos que acessem populações com estas características não são encontrados na literatura.

É possível que estas variações alélicas para o RE α causem diferenças na responsividade ao estrógeno, tornando alguns indivíduos mais susceptíveis ao acometimento por desordens que podem ter seu desenvolvimento e progressão afetados pelos efeitos biológicos deste hormônio, além de poder modular individualmente o fenômeno de nocicepção.

Assim sendo, o presente estudo foi conduzido com o intuito de investigar a se há associação entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* no íntron 1 do receptor alfa de estrógeno e os sinais e sintoma de dor articular de desarranjos internos da ATM em mulheres brasileiras na pós-menopausa submetidas ou não à terapia de reposição hormonal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DTM E ESTRÓGENOS

As desordens temporomandibulares (DTM) abrangem um número de condições clínicas envolvendo a musculatura mastigatória, articulações temporomandibulares (ATM) e/ou estruturas associadas (Min *et al.*, 2007). Em se tratando das desordens articulares, as principais alterações são os deslocamentos de disco e processos degenerativos, como a osteoartrite (Zarb *et al.*, 2000).

O deslocamento anterior do disco em relação ao côndilo mandibular em posição de boca fechada descreve anatomicamente os desarranjos internos de ATM. Este posicionamento pode ocorrer como uma conseqüência de estiramento, ruptura ou degeneração do ligamento posterior da ATM. A etiologia dessa condição permanece especulativa (Henry *et al.*, 2008).

Os deslocamentos de disco são definidos como variações anatômicas e funcionais 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, em situação medial ou lateral em relação ao côndilo quando a boca está fechada e, durante a abertura de boca, o côndilo se movimenta para uma posição protrusiva, recapturando total ou parcialmente o disco. Clinicamente, a redução do disco se reflete em um ruído ou estalo. Quando o côndilo volta para a posição de fechamento pode ocorrer o ruído recíproco, pois o disco se recoloca à sua posição patológica original. No deslocamento de disco sem redução, há o deslocamento permanente do disco à frente, para lateral ou medial em relação ao 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).

Os deslocamentos de disco podem manifestar clinicamente sintoma de dor articular. Entretanto, a extensa observação de pacientes assintomáticos propõe um novo

conceito que considera a posição patológica do disco uma variação anatômica normal, podendo persistir por décadas sem progressão do quadro (Stegenga, 2001).

Em muitos casos, porém, este quadro pode evoluir para uma doença articular degenerativa, caracterizando a osteoartrite de ATM. A osteoartrite envolve basicamente dois processos: a degeneração e a inflamação. A degeneração é caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem articular e do osso subcondral, acompanhada por neoformação de osso e de tecido mole e o acúmulo de material degradado poderá desencadear uma resposta inflamatória (Stegenga, 2001).

A prevalência de DTM ainda é tema de discussão na literatura. Apesar de existirem fortes evidências de que mulheres compõem a maioria dos pacientes portadores desta desordem, este assunto ainda é controverso. Além disso, existem fortes evidências sobre o padrão de prevalência e severidade das desordens temporomandibulares que permitem hipotetizar sobre a implicação dos hormônios sexuais femininos estrogênicos na fisiopatologia desta condição clínica.

Já em 1988, Von Korff *et al.* conduziram um levantamento focado em condições comuns de dor e estresse psicológico numa amostra de probabilidade composta por 1265 adultos participantes de uma grande organização para manutenção de saúde em Seattle, nos Estados Unidos. Dentre seus resultados, cabe ressaltar aqui que os autores encontraram que as dores nas costas e no peito não demonstraram qualquer relação com idade ou gênero. Já as dores abdominais, de cabeça e facial tiveram menor prevalência a partir da idade de 65 anos e foram mais comuns em mulheres do que em homens. Os autores ponderaram que a diminuída prevalência com o avançar da idade e a predileção pelo gênero feminino destas condições de dor, podem ter importantes implicações para a explicação da etiologia destas condições e ressaltaram a importância de se pesquisar os efeitos da idade e do gênero sobre as mesmas.

No mesmo ano e em virtude da escassez de estudos epidemiológicos específicos para as desordens temporomandibulares, Locker & Slade (1988) desenvolveram este tipo de estudo com o objetivo de estimar a prevalência e distribuição de sintomas comumente associados a estas desordens em uma amostra populacional de adultos de Toronto, no

Canadá. Uma técnica de discagem digital aleatória foi utilizada para identificar 1002 indivíduos com idade acima de 18 anos. Destes, 67,7% responderam ao questionário para acesso de sinais e sintomas de DTM, dos quais 48,8% responderam positivamente para uma ou mais das questões que abordavam tais sinais ou sintomas. Sons articulares, fadiga e rigidez musculares e mastigação desconfortável foram os sintomas mais frequentemente relatados. Dor funcional ou em repouso estiveram presente em 12,9% dos entrevistados. Diferenças entre os gêneros e faixas etárias foram estatisticamente significantes, com mulheres e indivíduos mais jovens tendendo a relatar um ou mais sintomas mais do que homens e indivíduos de faixas etárias mais avançadas.

Em 1990, Dworkin *et al.*, conduziram o primeiro estudo epidemiológico sobre as disfunções temporomandibulares na população norte-americana. Neste estudo, utilizaram o mesmo método para avaliar pacientes sintomáticos e buscando tratamento para DTM (casos clínicos), pessoas selecionadas aleatoriamente da comunidade que relataram DTM (casos da comunidade) e pessoas da mesma comunidade livres de DTM (controles da comunidade), totalizando um número de 1016 pessoas envolvidas no estudo. Dentre seus achados, destacam-se aqueles que demonstraram taxas elevadas de DTM em mulheres: 84% dos casos clínicos foram compostos por elas, assim como cerca de três quartos dos casos da comunidade com dor relacionada à DTM eram do gênero feminino.

No mês seguinte, Dukro *et al.* (1990) publicaram seus resultados de prevalência de cinco sintomas de DTM e sintomas associados de dor, dor de cabeça e estresse obtidos através de um levantamento telefônico aleatório em uma grande área metropolitana dos Estados Unidos. Dentre os sintomas avaliados estiveram o bruxismo noturno, sons articulares durante a função, sensibilidade dolorosa ao acordar ou em função e apertamento diurno. Do geral, 149 dos 500 entrevistados no estudo relataram um ou mais desses sintomas. Os mesmos não foram mais prevalentes em mulheres do que em homens, porém o foram em indivíduos mais jovens

Baseados no fato de que a descrição da prevalência de DTM na população é de grande valia para cientistas, responsáveis por políticas de saúde e clínicos, Glass *et al.* (1993) publicaram um estudo epidemiológico feito através de um levantamento telefônico

que buscou acessar a prevalência de sintomas relacionados às DTM em uma amostra aleatória e não-clínica da área metropolitana de Kansas City, nos Estados Unidos. Das 534 pessoas entrevistadas, 246 relataram um ou mais dos seguintes sintomas: bruxismo noturno, apertamento diurno, sensibilidade mandibular, e sons articulares. Os sintomas não foram mais prevalentes em mulheres do que em homens, porém o foram em indivíduos com idade inferior a 45 anos.

Ainda em 1993, um grupo de estudo da Grécia publicou resultados de um trabalho que propôs especificar o papel do gênero e da idade no desenvolvimento de sintomas de desordens craniomandibulares. Para isso, Koidis *et al.* compuseram um grupo de 195 pacientes com idades entre 16 e 70 anos que foram avaliados pelo Índice Craniomandibular (CMI). A proporção mulher:homem de pacientes foi de 4:1. e a prevalência de ruídos articulares, dor de cabeça, apertamento dental, hipomobilidade, dificuldade ao mastigar e sintomas neuromusculares foi maior entre mulheres jovens (até 30 anos de idade) do que entre outras faixas etárias ou homens. Houve uma correlação estatisticamente significativa entre a severidade dos sintomas e a idade para as mulheres, que apresentou declínio com o avançar da idade.

Com o objetivo de estimar a prevalência de auto-relatos de sintomas de DTM na população canadense de Québec e de analisar a inter-relação entre estes sintomas e fatores potencialmente predisponentes, Goulet *et al.* (1995), realizaram um levantamento a partir de população das áreas rural e urbana e ajustaram as estimativas de prevalência de acordo com gênero, idade e outras variáveis sociodemográficas. Em um primeiro momento, 1675 pessoas acima de 18 anos foram contatadas por telefone e responderam a um questionário. Em seguida, foi-lhes enviado um questionário em escrito, dos quais um total de 897 respondeu. Com relação à dor, mulheres relataram acometimento cerca de duas vezes maior que homens, sendo que dor severa esteve presente em uma a cada sete mulheres, enquanto apenas em um a cada vinte e cinco homens. No que diz respeito aos ruídos articulares e dificuldade ao abrir a boca, as mulheres mostraram-se duas vezes mais acometidas que os homens, resultados estatisticamente significantes. Sinergicamente, os indivíduos do gênero

feminino mostraram-se mais propensos a buscarem por tratamento para sua DTM numa proporção de 3:1.

Em 1997, LeResche *et al.* conduziram dois estudos epidemiológicos para avaliar se o uso de hormônios exógenos está associado a um maior risco de dor temporomandibular. Ambos utilizaram dados farmacológicos de prontuários de mulheres participantes de uma grande organização para manutenção de saúde para identificar prescrições de terapia de reposição hormonal (TRH) para mulheres na menopausa (Estudo 1) ou de contraceptivos orais (CO) para mulheres em idade fértil (Estudo 2). No primeiro estudo, 1291 mulheres acima de 40 anos de idade e indicadas para tratamento de DTM foram comparadas a 5164 controles. A chance de ser portadora de DTM foi aproximadamente 30% maior entre aquelas usando estrógeno quando comparadas aquelas não expostas a ele; uma clara relação dose-dependente ficou evidente. A relação com uso de progesteronas não foi estatisticamente significativa. No segundo estudo, 1473 casos de DTM foram comparados a 5892 controles, todas com idade entre 15 a 35 anos. O uso de CO esteve associado a um risco cerca de 20% maior de DTM. Estes resultados sugerem que o hormônio sexual feminino estrógeno pode desenvolver um papel etiológico nas dores orofaciais.

Contraditoriamente, Kuttilla *et al.* (1998) avaliaram a associação entre a necessidade de tratamento para DTM e idade, gênero e estresse em uma amostra da população adulta Finlandesa composta de 506 indivíduos. Após análise de regressão logística, idade e gênero não foram considerados preditores de tal necessidade e os autores supuseram que a maior prevalência de sinais e sintomas de DTM encontrada entre as mulheres pode ser explicada pelo maior nível de estresse apresentado por elas.

No mesmo ano, Dao *et al.* (1999) publicaram um estudo piloto que realizaram para testar a hipótese de que, se os hormônios reprodutivos desempenham papel na modulação da dor, os níveis de dor miofascial de pacientes deveriam demonstrar um padrão de variação consistente e paralelo à flutuação dos hormônios reprodutivos endógenos ao longo do ciclo menstrual. Seria esperado que este padrão fosse alterado em usuárias de contraceptivos orais, já que suas flutuações hormonais são estabilizadas pelos hormônios

exógenos. De fato, como resultados, os autores encontraram que as variações nos níveis de dor das usuárias de contraceptivos orais tenderam a ser menores do que os valores correspondentes observados em não-usuárias. Além disso, os níveis de dor nas usuárias de contraceptivo oral se mantiveram positivos ao longo dos três ciclos menstruais estudados, enquanto nas não-usuárias, picos de dor se alternaram com períodos livres de dor.

No ano 2000, Kamisaka *et al.*, acompanharam uma população de pacientes não tratados para DTM composta por 672 indivíduos selecionados aleatoriamente por quatro anos com o objetivo de investigar o curso natural dos sintomas de DTM e de estimar a força da relação entre diversos fatores considerados de risco para estas desordens e a precipitação e perpetuação dos seus sintomas. Publicaram seus resultados mostrando, entre outros achados, que o gênero feminino tem 2,81 mais chances de perpetuação da sua disfunção do que o masculino.

Já Hatch *et al.* (2001), baseados nos trabalhos anteriores que sugeriram uma associação entre o uso de estrógeno exógeno e risco de DTM, propuseram um novo estudo para acessar esta relação. Contaram com um examinador calibrado para aplicar o Índice Crânio-mandibular (CMI) que avaliou 510 mulheres com idades entre 37 e 82 anos, das quais 174 estavam fazendo uso de medicação contendo estrógenos, seja sob a forma de contraceptivos orais ou de terapia de reposição hormonal. Após controlar as variáveis demográficas, nível sociocultural e acesso a convênio médico, os autores não encontraram diferenças estatísticas significantes entre mulheres fazendo ou não uso de estrógenos exógenos para os sinais e sintomas de desordem temporomandibular, sejam eles musculares ou articulares.

Todavia, em seu estudo avaliando 42 mulheres com ciclos menstruais regulares e desarranjos internos de ATM, Suenaga *et al.* (2001) obtiveram resultados que correlacionam os hormônios sexuais femininos com a patogenia das DTM. Tiveram como objetivo correlacionar a fase do ciclo menstrual com dor articular e imagens de ressonância magnética mostrando alterações patológicas do ligamento posterior do disco articular e, como resultados, encontraram correlação entre a fase de maior concentração de estrógeno circulante e maiores níveis de dor articular, concluindo então que as fases do ciclo menstrual

podem desempenhar papel no grau de dor articular e patologia inflamatória do ligamento posterior do disco articular.

Em um estudo conduzido em uma população brasileira sem diagnóstico prévio de DTM, os participantes foram avaliados através de questionário e os autores encontraram uma prevalência de disfunção quase quatro vezes maior em mulheres do que em homens (Pedroni *et al.*, 2003).

Poucos estudos já foram publicados investigando o papel de flutuações hormonais na frequência ou intensidade de dores musculoesqueléticas, como as DTM. Por este motivo, LeResche *et al.* (2003) desenvolveram um estudo com o objetivo de acessar alterações nos níveis de dor temporomandibular muscular e articular em relação às fases do ciclo menstrual. Os grupos de casos de DTM foram compostos por 35 mulheres não usuárias de contraceptivos orais (CO), 35 usuárias de CO e 21 homens. O grupo controle foi composto por 35 mulheres não-usuárias de CO e livres de DTM ou outras dores crônicas. Para testar as variações cíclicas, os ciclos menstruais foram padronizados em 28 dias e os dados foram agrupados em nove períodos de três dias por ciclo. Os níveis gerais de dor média e pior dor não diferiram entre os grupos de DTM. Para pior dor, a análise multivariada revelou diferença estatisticamente significativa ao longo dos períodos de três dias tanto para o grupo de não-usuárias como para o de usuárias de CO. Nos dois grupos, os níveis de dor aumentaram em direção ao final do ciclo e tiveram seu pico durante a menstruação. Apenas em mulheres não-usuárias de CO, houve um pico de dor secundário no período dos dias 13-15, em torno do período de ovulação. Com estes resultados, os autores sugeriram que a dor temporomandibular em mulheres é maior em períodos em que o nível de estrógeno é mais baixo e que rápidas alterações neste nível também podem estar associadas à dor aumentada.

Para acessar a relação entre condições de dor, dentre as quais a dor temporomandibular, e o gênero e grau de desenvolvimento pubertal, LeResche *et al.* (2005) conduziram um estudo transversal baseado em uma população de adolescentes. Os autores testaram a hipótese de que a prevalência de condições de dor aumentariam com a progressão da puberdade em mulheres, mas não em homens. Os sujeitos, 3101 garotos e

garotas com idade entre 11 e 17 anos, relataram a presença de cada sintoma de dor e completaram escalas acessando o grau de desenvolvimento pubertal, sintomas somáticos e depressivos. A prevalência de dor nas costas, dor de cabeça e dor temporomandibular aumentaram significativamente com o avanço da puberdade para as mulheres. Os níveis de somatização, depressão e probabilidade de experimentar dores múltiplas também demonstraram o mesmo padrão em meninas. Para os meninos, a prevalência de dor nas costas e facial aumentou, a de dor no estômago diminuiu um pouco e a de dor de cabeça permaneceu inalterada com o avanço da maturidade. Os autores concluíram que para os dois gêneros, o grau de desenvolvimento pubertal é um melhor preditor de dor do que a idade em si. Ainda, acrescentaram que, aparentemente, a dor, outros sintomas somáticos e depressão aumentam sistematicamente com o desenvolvimento pubertal em mulheres.

Considerando a hipótese de que alguns tecidos articulares da ATM possam ser alvo para hormônios sexuais, Landi *et al.* (2005) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os níveis séricos de estrógeno e progesterona em uma amostra de população de adultos jovens italianos afetados pelas formas articulares de DTM diagnosticadas pelo *Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD)* e compararam aos de pacientes saudáveis. Um total de 40 pacientes (20 homens e 20 mulheres) diagnosticados com deslocamento de disco e/ou artralgia, osteoartrite ou osteoartrose de ATM e de 32 voluntários controle participaram do estudo e seus níveis séricos de 17β -estradiol e progesterona foram determinados utilizando radioimunoensaio. Como resultados significantes, os autores encontraram que apenas os níveis de 17β -estradiol foram maiores para o grupo de paciente, tanto para mulheres na fase lútea do ciclo menstrual como para homens. Estes resultados sugerem que níveis séricos elevados de estrógeno podem estar implicados na fisiopatologia das desordens temporomandibulares.

No ano de 2008, Fischer *et al.* conduziram um estudo com o objetivo de investigar a influência do gênero e dos hormônios ovarianos na nocicepção da ATM induzida pela injeção de formalina e glutamato em ratos. O comportamento nociceptivo dos machos foi similar ao das fêmeas na fase proestro do ciclo estral (altos níveis de estrógeno) mas foi significativamente menor do que o das fêmeas na fase diestro (baixos níveis de

estrógeno). Já que os níveis séricos de estradiol mas não de progesterona foram significativamente maiores na fase proestro do que na fase diestro, esses dados sugerem que as fêmeas com níveis endógenos de estrógeno mais baixos sofrem uma exacerbação da nocicepção na ATM. O comportamento nociceptivo dos animais ovariectomizados foi similar àquele das fêmeas na fase diestro e foi significativamente maior do que o exibido pelas fêmeas proestro. Apesar da administração de estradiol e progesterona ter reduzido significativamente a nocicepção na ATM nas fêmeas ovariectomizadas, a combinação dos dois hormônios não aumentou o efeito antinociceptivo induzido por cada um deles. Estes achados indicam que estradiol e progesterona reduzem nocicepção na ATM de uma maneira independente. Com isso, os autores concluem que os hormônios ovarianos têm efeito antinociceptivo nos modelos de comportamento nociceptivo da ATM induzido por formalina e glutamato. Portanto, a maior prevalência e severidade da dor temporomandibular em mulheres na idade reprodutiva pode ser uma consequência das flutuações hormonais a que ocorrem ao longo do ciclo menstrual e dos períodos de baixos níveis séricos de estrógeno endógeno, aumentando o risco de mulheres experimentarem dor temporomandibular nestes períodos.

Ainda em 2008, foi conduzido mais um estudo para se avaliar a aparente relação entre o uso exógeno de hormônios e a DTM. Nele, Nekora-Azak *et al.* trabalharam com 180 mulheres turcas na pós-menopausa, com idades entre 42 e 72 anos que foram avaliadas clinicamente e por questionário para os sinais e sintomas de DTM, estado geral de saúde e uso de terapia de reposição hormonal (TRH). Neste estudo, não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa para os sinais e sintomas de DTM quando comparadas mulheres fazendo ou não TRH e os autores concluíram que não há associação entre o uso exógeno de hormônios e risco de sinais ou sintomas de DTM.

Isto posto, no que concerne à relação entre desordens temporomandibulares e estrógenos, estes hormônios têm sido sugeridos como fator impactante definindo a capacidade adaptativa da ATM do hospedeiro (Arnett *et al.*, 1996).

Entretanto, tendo em vista o conteúdo apresentado até aqui, é possível notar que os estudos examinando os efeitos dos hormônios sexuais na DTM têm encontrado

resultados contraditórios. Enquanto uns encontraram associação entre o uso exógeno de estrógenos e os sintomas de DTM, outros poucos falharam ao encontrar esta associação.

Em conjunto, essas informações nos permitem supor que fatores intrínsecos ao hospedeiro, como sua composição genética, por exemplo, possam desempenhar importante papel na diferença de resposta inter-individual no que se refere ao desenvolvimento de condições patológicas. Isto é, torna-se plausível considerar que indivíduos expostos à multifatoriedade etiológica das disfunções temporomandibulares, podem ou não vir a ser acometidos por esta desordem em função da composição do seu genoma.

2.2 DTM E ESTRÓGENOS: SEUS RECEPTORES E MECANISMOS DE AÇÃO

Indubitavelmente, pacientes com DTM compõe um grupo heterogêneo no qual complexos fatores fisiológicos, psicológicos e sociais estão presentes. Entretanto, uma vez que parece existir dimorfismo sexual entre os indivíduos acometidos por DTM com marcada predileção pelos do gênero feminino, é importante que dados a respeito da fisiopatologia do complexo articular temporomandibular sejam apresentados para melhor se entender os objetivos deste estudo.

Especificamente no que concerne às desordens temporomandibulares, alguns estudos já foram publicados apontando a articulação envolvida, através de seus tecidos constituintes, como tecido-alvo para a ação do estrógeno.

Em 1986, Aufdemorte *et al.* utilizaram um método autoradiográfico para avaliar a presença de receptores para 17β -estradiol no complexo articular temporomandibular de cinco babuínos fêmeas idosas. O estudo foi conduzido num esforço para aprender mais sobre a fisiopatologia deste complexo e numa tentativa de fornecer bases científicas para explicar a preponderância de mulheres buscando ou sob tratamento para DTM relatada na literatura. O experimento revelou que o complexo da ATM contém numerosas células com receptores para estrógeno, principalmente na superfície articular do côndilo, disco e cápsula articulares. Os músculos da mastigação apresentaram relativamente menos receptores. Com bases nesses achados, os autores se permitiram postular um papel para os hormônios sexuais esteroidais na manutenção, reparo e/ou patogenia das DTM.

No ano seguinte, o mesmo grupo de autores publicou um segundo estudo autoradiográfico para tentar identificar receptores de estrógeno no complexo articular temporomandibular de babuínos machos. Este estudo falhou em demonstrar presença nuclear de estrógeno radio-marcado em qualquer tecido do complexo estudado. Nos mesmos animais, a presença de estrógeno foi notada em outros tecidos, como na glândula pituitária. Concluíram, então, que seus achados forneciam evidências adicionais de um dimorfismo sexual no que diz respeito à distribuição de receptores de estrógeno no complexo articular temporomandibular (Milam *et al.*, 1987).

Abubaker *et al.* (1993) justificaram seu estudo esclarecendo que numerosos estudos já haviam sido feitos para se demonstrar a presença de receptores de estrógeno e de efeitos mediados pelo estrógeno através deste receptor na cartilagem articular de várias espécies, inclusive em humanos. Uma vez que os sintomas de DTM são mais prevalentes em mulheres, desenvolveram seu estudo para investigar a presença de receptores de estrógeno e progesterona na ATM humana. Para tanto, sete espécimes de disco articular de mulheres com desarranjos internos de ATM foram analisados para a presença destes receptores e comparados a 15 espécimes obtidos de homens e mulheres sem sinais ou sintomas de ATM que foram submetidos a cirurgia de base do crânio e tiveram sua ATM extirpada para tal acesso. Os receptores foram detectados tanto em homens como em mulheres, sintomáticas ou não. Em conclusão, os autores afirmaram que o disco articular é, pelo menos em alguns homens e mulheres, um tecido-alvo em potencial para os hormônios sexuais femininos.

Em 1996, Abubaker *et al.* trouxeram a público os resultados de outro trabalho, suportando a hipótese de que os estrógenos estejam envolvidos na patogenia dos desarranjos internos de ATM. Com a intenção de avaliar o efeito dos hormônios sexuais sobre o conteúdo de colágeno e proteína do disco articular em ratos fêmeas e machos, os autores trabalharam com 144 animais divididos em grupos controle – machos e fêmeas sem receber nenhum tipo de tratamento -, grupo placebo – machos e fêmeas que receberam simulação de cirurgia e tratamento com placebo – e outros grupos constituídos de variações na combinação entre ooforectomia/ovariectomia e administração de estrógeno, progesterona, combinação de estrógeno e progesterona ou testosterona. O conteúdo de

colágeno foi maior nos ratos machos controles do que nas fêmeas, característica que desapareceu entre os ratos castrados recebendo placebo. Para ratos fêmeas recebendo estrógenos combinados com progesteronas, houve diminuição estatisticamente significativa na quantidade total de proteína do disco articular; de forma semelhante, os machos tratados apenas com estrógenos apresentaram quantidade significativamente menor de conteúdo de colágeno.

Os efeitos do estrógeno sobre o tecido ósseo são bem documentados. No entanto, comparativamente pouco ainda é sabido sobre seus efeitos sobre a cartilagem. Baseando-se nisso, Ng *et al.* (1999) conduziram um estudo com os objetivos de determinar se os receptores de estrógeno estão presentes na cartilagem condilar da mandíbula de ratos e acessar o efeito de concentrações variadas de 17β -estradiol (E2) no conteúdo de proteoglicanos deste tecido. Células da cartilagem condilar de ratos foram extraídas e cultivadas em meios com diferentes concentrações de E2. Em seguida, a cartilagem foi analisada para conteúdo de proteoglicanos e presença de receptores de estrógeno e comparada com espécimes cultivadas em meios que não continham E2. Os receptores de estrógeno mostraram-se equivalentemente distribuídos nas zonas condroblástica e hipertrófica dos grupos controle e de concentração de 10^{-11} mol/L de E2. Nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-6} mol/L de E2, houve decréscimo qualitativo nos condroblastos hipertróficos, espessura da cartilagem articular e no conteúdo de proteoglicanos. Os autores puderam concluir que os receptores de estrógeno estão presentes na cartilagem articular do côndilo mandibular de ratos e que este hormônio tem potencial para causar decréscimo na matriz extracelular e espessura desta cartilagem, dependendo de sua concentração sérica.

Buscando esclarecer se a articulação temporomandibular é ou não um tecido-alvo para o estrógeno, Yamada *et al.* (2003) examinaram a expressão da proteína e do RNAm de RE α na ATM de ratos machos adultos por imunohistoquímica e hibridização histoquímica *in situ*, respectivamente. Uma intensa imunoreatividade para RE α foi localizada na camada de células sinoviais, células do estroma no disco articular e condrócitos na ATM. A hibridização histoquímica *in situ* confirmou sinais intensos de RNAm de RE α na camada de células sinoviais e nos fibroblastos subjacentes. Os núcleos de condrócitos mostraram

uma intensa imunoreação para RE α nas camadas madura e hipertrófica da cartilagem articular. Em adição à localização nuclear de RE α , uma fraca imunoreação pareceu no citoplasma de algumas células positivas para RE α . Com isto, os autores concluíram que seus achados suportam a hipótese de que o tecido articular da ATM é potencialmente um tecido-alvo para o estrógeno.

Mediante o exposto, é plausível supor que a interação RE α -estrógeno possa, de alguma maneira ainda não esclarecida, exercer seus efeitos sobre as desordens que acometem as articulações temporomandibulares.

Nesse sentido, estudos em animais já foram conduzidos a fim de elucidar através de quais mecanismos ou como o estrógeno pode influenciar a ATM e predispor à DTM.

Em 1996, Okuda *et al.* investigaram os efeitos da ovariectomia na ATM de ratos jovens. Para isso, foi realizada análise histomorfométrica da articulação de ratos que passaram apenas pela simulação de cirurgia e comparada a de ratos castrados que foram sacrificados 1, 2, 4 e 8 semanas após a ovariectomia. Os níveis séricos de estrógeno, calcitonina e paratormônio também foram determinados para todos os animais. Nos ratos que passaram apenas pela simulação cirúrgica, os níveis de calcitonina e estrógeno aumentaram com o tempo, assim como aumentaram o volume ósseo e a superfície osteóide. Nos ratos operados, obviamente, o estrógeno não pode ser detectado. Além disso, foi observada uma alteração bifásica nos níveis de paratormônio, com aumento nas duas primeiras semanas e decréscimo nas semanas 4 e 8, enquanto o nível de calcitonina se manteve constante. Nestes mesmos animais, a espessura do tecido mole articular aumentou nas porções central e anterior do côndilo mandibular e o volume ósseo decresceu ao longo do experimento, principalmente na porção posterior. Com estes resultados, os autores concluíram que a deficiência de estrógeno durante a puberdade pode predispor a alterações da ATM através de modificações nos níveis séricos de calcitonina e paratormônio.

Num estudo que buscou avaliar os efeitos da idade e da ovariectomia no côndilo mandibular de ratos, Tanaka *et al.* (1998) avaliaram 120 animais que foram sacrificados 7, 14, 30 e 60 dias após a cirurgia ou a simulação da mesma. As variáveis avaliadas foram a densidade mineral óssea e a área medular. Nenhuma diferença foi observada na DMO entre

os grupos operado e controle. Alterações osteoscleróticas relacionadas à idades foram vistas no grupo controle e , em contraste, o grupo castrado mostrou pouca alteração na área medular em função da idade. Por outro lado, este valor foi significativamente maior em comparação ao grupo de simulação cirúrgica a partir do décimo quarto dia de ovariectomia. Os autores inferiram que a deficiência de estrógeno causou significativo aumento na área medular vista no côndilo mandibular de ratos e se permitiram especular que alterações osteoporóticas podem ocorrer nesta estrutura em mulheres na pós-menopausa.

Na tentativa de entender a relação entre estrógeno e DTM, Min *et al.* (2007), investigaram os padrões de expressão de marcadores de formação óssea em ratos fêmeas. *Runx2* é um fator de transcrição importante para a diferenciação osteoblástica a partir de células mesenquimais multi-potenciais, que aumenta esta diferenciação em estágios iniciais e a inibe em estágios avançados do crescimento. A proteína morfogênica de osso (BMP-4) é um polipeptídeo que pertence a superfamília dos fatores transformadores de crescimento beta e induz a formação de cartilagem e osso na proliferação celular, apoptose, diferenciação e morfogênese. A sialoproteína óssea (BSP) é uma proteína não colagenosa presente em sítios de formação de osso. Os padrões de expressão de *Runx2*, BMP-4 e BSP foram avaliados e comparados entre os grupos controle e uma, quatro e oito semanas após a ovariectomia. Como resultados, a expressão de *Runx2* e BMP-4 aumentou enquanto a de BSP decresceu gradualmente nos grupos ovariectomizados. Os autores concluíram que o estrógeno desempenha um importante papel no metabolismo e manutenção da ATM via regulação de moléculas sinalizadoras como *Runx2*, BMP-4 e BSP, sugerindo que a deficiência de estrógeno é uma causa em potencial para DTM.

RANK é o receptor ativador do fator nuclear kappa B, um fator de transcrição que uma vez ativado por seu ligante (RANKL) induz a osteoclastogênese e ativação de osteoclastos maduros. O fator 1 de estimulação de colônia de macrófagos (M-CSF) age através de seu receptor, *c-fms*, para também induzir a osteoclastogênese e garantir a sobrevivência de osteoclastos maduros. Investigações ultra-estruturais demonstraram que a membrana sinovial da ATM consiste principalmente de dois tipos celulares: macrófagos e fibroblastos. Em seu estudo, Galal *et al.* (2007) avaliaram os efeitos do estrógeno sobre a

expressão de RANK, *c-fms* e receptores de estrógeno em culturas de células precursoras de osteoclastos. Obtiveram os seguintes resultados: houve um aumento tempo-dependente na expressão de RANK e *c-fms* após a aplicação da concentração máxima de estradiol; ocorreu aumento gradual na expressão de receptores de estrógeno α e β após a aplicação da concentração mínima de estrógeno e as expressões de RANK e *c-fms* aumentaram conforme de aumentou a concentração de estrógeno no meio de cultura. Em conclusão, os autores relataram que as células macrofágicas da camada sinovial expressam receptores de estrógeno, o que é aumentado pelo tratamento com o hormônio e hipotetizaram um aumento na colonização por macrófagos via o aumento relatado de *c-fms*. Ainda acrescentaram que seus achados podem fornecer uma interpretação para a maior tendência de mulheres sofrerem com desordens articulares de ATM.

No ano seguinte, o mesmo grupo de autores publicou um segundo estudo no qual avaliaram o efeito do estrógeno sobre a expressão de RANKL, OPG, M-CSF/CSF-1 e *c-fms* e receptores de estrógeno em células sinoviais fibroblásticas humanas e células ATDC5. Neste trabalho, demonstraram a expressão de M-CSF/CSF-1 e *c-fms* num efeito tempo-dependente após a administração de estrógeno. Baseados em estudos prévios relatando que M-CSF/CSF-1 regulam a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas progenitoras em macrófagos, estes achados somam-se aos seus primeiros para explicar a maior tendência de indivíduos do gênero feminino de sofrerem com DTM (Galal *et al*, 2007).

Em 2008, Yun *et al.* avaliaram os efeitos do estrógeno sobre a síntese de citocinas por células da ATM de ratos. As células da cartilagem condilar foram cultivadas em meios contendo diferentes concentrações de 17β -estradiol e as concentrações de citocinas foram mensuradas através de imunoensaio (ELISA). Em seus resultados, os autores encontraram que a expressão das citocinas Il-1 β , -6 e -8 aumentaram à medida em que aumentou a concentração de estrógeno; já com a expressão das Il-4 e -10, que têm papel anti-inflamatório, não aconteceu o mesmo os resultados não diferiram entre os grupos experimentais e controle. Estes achados sugerem que o estrógeno tem potencial de causar

doenças da articulação temporomandibular através da indução de citocinas pró-inflamatórias.

Todas estas observações sugerem um papel em potencial para o hormônio sexual feminino estrogênico na fisiopatologia da DTM. No entanto, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos da dor temporomandibular e mecanismos através dos quais o estrógeno também pode contribuir para essa dor.

Apesar das bases fisiológicas para o dimorfismo sexual de diversas condições de dor não serem conhecidas, é muito provável que o estrógeno seja um importante fator subjacente. Flake *et al.* (2005) conduziram um estudo em ratos fêmeas ovariectomizados, recebendo e não recebendo reposição de estrógeno, para testar a hipótese de que este hormônio pode aumentar a excitabilidade de neurônios aferentes da ATM e a sensibilização induzida por inflamação desses mesmos neurônios. Os autores encontraram que tanto a inflamação como o estrógeno foram capazes de aumentar a excitabilidade dos neurônios pela diminuição do limiar do potencial de ação e reobase e por aumento na incidência de dor espontânea. O efeito foi cumulativo para ratos recebendo tanto o estímulo inflamador como o estrógeno, que exibiram a maior excitabilidade. Concluíram, então, que a influência do estrógeno na excitabilidade neuronal da ATM pode ajudar a explicar a diferença entre os gêneros observada na dor temporomandibular.

Baseados no fato de que muitas condições de dor que são mediadas pelo nervo trigêmio - como as dores de cabeça e a DTM, por exemplo - são mais prevalentes em mulheres do que em homens e de que não se sabe a distribuição de neurônios positivos para RE α no sistema trigeminal, Bereiter *et al.* (2005) usaram imunocitoquímica quantitativa para comparar a distribuição de neurônios marcados por RE α no complexo do trigeminal do tronco encefálico (TBC) e gânglio trigeminal de ratos machos e fêmeas e em diferentes fases do ciclo estral. Uma alta densidade de neurônios marcados por RE α foi vista na lâmina superficial (I-III) ao longo do subnúcleo caudal trigeminal (Vc) e do corno dorsal cervical superior. A contagem de neurônios positivos para RE α na lâmina I-III foi similar para fêmeas proestro e diestro, enquanto machos tiveram menos células positivas. A lâmina profunda (IV-V) do Vc e o corno dorsal cervical tiveram menos neurônios positivos para

RE α em todos os grupos. Na região ao redor do canal central nos níveis caudais do Vc, fêmeas proestro tiveram mais neurônios positivos do que fêmeas diestro ou machos. Poucas células marcadas foram vistas rostralmente a região de transição entre aos subnúcleos trigeminais interpolar e caudal (Vi/Vc) em qualquer grupo. No gânglio trigeminal, fêmeas proestro e diestro tiveram um número moderado (8-10%) de neurônios médios ou pequenos marcados no núcleo, enquanto os machos tiveram menos células marcadas (4,5%). Qualitativamente, o padrão de coloração para RE β foi similar, porém mais fraco, no corno dorsal e gânglio trigeminal. Com estes resultados, os autores afirmaram que seus achados são consistentes com a hipótese de que o estrógeno pode agir através de células do gânglio trigeminal e porções caudais do Vc para modular aspectos autonômicos e sensoriais da dor craniofacial de uma maneira gênero-dependente.

Grelina é um ligante natural do secretagogo hormônio de crescimento que tem funções sobre a regulação do apetite, inflamação e estruturas vasculares. O gene da grelina humana apresenta sítios de ligação para os elementos responsivos ao estrógeno, o que pode permitir a regulação da sua expressão gênica pelo estrógeno. Neste estudo, Puri *et al.* (2006) analisaram a expressão de grelina no gânglio trigeminal de ratas com ciclos menstruais normais e esta análise revelou que a expressão da proteína é aumentada em mais de cinco vezes nas fases do ciclo em que o nível de estrógeno é maior – fase proestro e início da estral – quando comparadas à fase de baixas concentrações de estrógeno – diestro. Além disso, a análise imunohistoquímica duplamente marcada permitiu identificar o fenótipo dos neurônios contendo grelina, que foi encontrada em axônios amielinizados, mielinizados e neurônios nociceptores. Portanto, praticamente todas as principais populações de neurônios trigeminais contém grelina. Estes resultados permitiram concluir que a grelina, um polipeptídeo multifuncional, pode contribuir para os mecanismos que ligam síndromes de dor orofacial à mulheres, incluindo a DTM e migrâneas, às alterações hormonais cíclicas.

2.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS PARA REA E PATOLOGIAS ÓSSEAS E ARTICULARES

Ao estudar doenças ou desordens que mostrem predileção por determinado gênero é importante acessar três possíveis fatores causais: o primeiro abrange as diferenças biológicas e fisiológicas que podem tornar um dos gêneros mais vulnerável a uma determinada condição patológica; em segundo lugar, devem-se considerar os fatores comportamentais que podem levar a essa distinção entre os gêneros; e finalmente, há de se considerar a genética para ponderar até que ponto fatores genéticos associados aos gêneros são responsáveis pela discrepância na incidência.

Neste estudo, o foco foi direcionado ao terceiro fator, isto é, à composição genética individual que pode predispor determinados indivíduos ao risco de desenvolver condições patológicas. Até o presente momento, desordens ósseas e ósseo-articulares, como a osteoporose e diferentes tipos de artrites, já foram associadas aos SNP *PvuII* e *XbaI* para o RE α .

Em 1996, Kobayashi *et al.* investigaram a relação entre densidade mineral óssea (DMO) e os fragmentos de restrição *PvuII* e *XbaI* para o RE α em 238 mulheres japonesas saudáveis na pós-menopausa com idade entre 45 e 91 anos de idade. Os fragmentos de restrição são representados como Pp (*PvuII*) e Xx (*XbaI*), em que letras maiúsculas indicam a ausência do sítio de restrição e minúsculas a presença. Indivíduos carregando o genótipo PPxx apresentaram escores de DMO significativamente menores do que aqueles carregando os outros genótipos. Os autores então sugeriram que alguma variação no gene RE α está associada à baixa DMO, o que explicaria, em parte, a causa da osteoporose pós-menopausa vista em mulheres japonesas.

Gennari *et al.* (1998), levando em consideração a constante interação entre genética e fatores ambientais na determinação da massa óssea, conduziram pela primeira vez um estudo em um grande grupo de mulheres na pós-menopausa de apenas um grupo étnico, descendentes de italianos. A partir do sangue de 426 participantes do estudo, avaliaram a relação entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* para o RE α e para o receptor de vitamina D (VDR) e a densidade mineral óssea. No que diz respeito aos receptores alfa de estrógeno, os

pesquisadores sugeriram com seus resultados que os polimorfismos para o RE α podem exercer um papel adicional para contribuir na redução da determinação da massa óssea, quando associados a polimorfismos para o VDR.

Já em seu trabalho, Han *et al.* (1999) não encontraram nenhuma associação entre os SNP *PvuII* e *XbaI* e DMO em mulheres coreanas. Em seu estudo, os autores avaliaram 598 mulheres saudáveis com idades entre 20 e 74 anos e não encontraram diferenças significantes na frequência de distribuição dos genótipos, mesmo quando agruparam os indivíduos em grupos de pré-, peri- e pós-menopausa. Concluíram, então, que estes polimorfismos intrônicos para o RE α não estão associados à DMO de mulheres coreanas.

A fim de identificar os efeitos genéticos das variações alélicas *PvuII* e *XbaI* para o RE α , Sapir-Koren *et al.* (2001) analisaram a associação entre esses fragmentos de restrição e o escore de DMO em 344 membros de famílias nucleares de uma população Russa, sendo 183 homens e 161 mulheres, com idades entre 18 a 84 e 23 a 79 anos, respectivamente. A análise foi realizada separadamente entre os gêneros e gerações (progenitores e descendentes). Entre os homens, tanto pais como filhos, o haplótipo PXPX esteve associados a escores maiores de DMO em comparação aos indivíduos que não carregavam o haplótipo PX. Estes achados não foram encontrados entre mulheres, seja entre as mães ou filhas, e os autores ressaltaram a necessidade de se continuar investigando esta relação.

Estudos de ligação genética e de associação de genes candidatos identificaram diversos *loci* e genes candidatos que parecem estar envolvidos na regulação da massa óssea e patogênese de fraturas osteoporóticas, dentre os quais se inclui o gene para o RE α . Baseados nisso, Albagha *et al.* (2001), investigaram a associação entre densidade mineral óssea e os haplótipos definidos pelos polimorfismos *PvuII* e *XbaI* em 206 mulheres do nordeste da Escócia, das quais 191 estavam em menopausa há pelo menos seis meses. Em seus resultados, os autores encontraram que o haplótipo “Px” esteve significativamente associado a valores inferiores de densidade mineral óssea em coluna lombar e pescoço

femoral e sugeriram que este haplótipo ou outro polimorfismo associado a ele confirmam risco de fraturas osteoporóticas a mulheres.

No ano seguinte, Yamada *et al.* (2002) publicaram resultados de um grande estudo epidemiológico que avaliou a associação entre os dois polimorfismos intrônicos *PvuII* e *XbaI* e a DMO. Dois mil duzentos e trinta e oito sujeitos participaram do estudo, entre homens e mulheres, com idades entre 40 e 79 anos. Como resultados, os autores encontraram que o genótipo XX esteve associado à DMO de pescoço femoral significativamente menor do que em comparação aos outros genótipos em mulheres acima de 60 anos de idade. Neste mesmo grupo, na análise de genótipos combinados, indivíduos carregando o genótipo PPXX apresentaram a mesma associação, quando comparados às outras combinações possíveis de genótipos. Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada para os grupos de mulheres mais jovens ou de homens. Em conclusão, os autores sugeriram que o gene receptor alfa de estrógeno é um locus de susceptibilidade para massa óssea reduzida, especialmente entre mulheres japonesas idosas.

Em 2003, van Meurs *et al.* investigaram a influência de variações genéticas no locus do gene RE α sobre diversos parâmetros ósseos em 2042 indivíduos idosos em um estudo de coorte baseado em uma população da Holanda. Neste estudo, os autores não encontraram nenhuma associação entre os fragmentos de restrição *PvuII* e *XbaI* para o RE α e algum parâmetro ósseo em homens. Já entre mulheres, houve um efeito da dose de alelo do haplótipo px na diminuição da DMO de coluna lombar e da área óssea vertebral. Da mesma forma, o mesmo efeito alelo-dependente foi encontrado evidenciando um aumento de mais de duas vezes no risco de fratura vertebral. Concluindo, os autores puderam afirmar que os polimorfismos encontrados na região promotora 5' estão associados ao risco de fratura vertebral e diminuição da DMO lombar e área óssea vertebral em mulheres na pós-menopausa, mas não em homens, e o mecanismo molecular que explica esta associação ainda requer mais estudos.

Qin *et al.* (2004), com o objetivo de verificar se polimorfismos para o receptor alfa de estrógeno ou para o receptor de vitamina D (RVD) estão relacionados a densidade mineral óssea, conteúdo ósseo mineral e tamanho ósseo, avaliaram 493 mulheres chinesas

saudáveis na pré-menopausa com idades entre 20 a 40 anos. Neste estudo, não houve associação entre os fragmentos de restrição *PvuII* e *XbaI* para o RE α e nenhuma das variáveis estudadas, sendo que tal relação houve apenas para o polimorfismo *Apa* para o RVD. Assim, os autores puderam concluir que o último polimorfismo pode influenciar na quantidade e manutenção da qualidade óssea de mulheres chinesas na pré-menopausa, enquanto os polimorfismos para RE α parecem não influenciar estes fatores.

Em 2007, Ivanova *et al.* realizaram o mesmo tipo de estudo em uma população Búlgara. Contaram com 400 mulheres no estudo e associaram os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* para o RE α aos escores de DMO de coluna lombar, pescoço femoral e antebraço distal, sendo que estas mulheres foram divididas em dois grupos: grupo de DMO normal (n=180) e grupo alguma DMO baixa (n=220). Como resultado, foi encontrado que o risco relativo de baixa DMO esteve associado aos marcadores PP e XX para os sítios polimórficos *PvuII* e *XbaI*, respectivamente. Como conclusão, os autores relataram que os polimorfismos estudados estão associados a baixa DMO em mulheres búlgaras. Ainda, estes polimorfismos podem tornar-se importantes marcadores genéticos para o acesso de risco de osteoporose nesta população específica.

No mesmo ano, Bustamante *et al.* (2007) analisaram a associação entre DMO e alguns dos polimorfismos mais relevantes já relatados para osteoporose, dentre os quais, os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* para o RE α , no maior coorte de mulheres na pós-menopausa já estudado na Espanha. O coorte foi composto por 719 mulheres com média de idade de aproximadamente 55 anos. Dentre seus resultados, os autores encontraram uma associação entre o haplótipo PX e índices mais elevados de DMO de pescoço femoral e discutiram que seus resultados estão de acordo com o previamente descrito na literatura, em que o alelo x, ou haplótipos contendo este alelo, são mais comumente associados a valores menores de DMO. Concluindo, afirmaram que polimorfismos para o RE α estão associados a DMO em mulheres espanholas na pós-menopausa.

A osteoartrite (OA) generalizada é uma doença relativamente comum e que acomete mais mulheres do que homens e, apesar de fatores genéticos serem sabidamente os principais fatores de risco para essa condição, os genes relacionados ao desenvolvimento

desta doença permanecem incompletamente conhecidos. Em virtude disso, Ushiyama *et al.* (1998), investigaram a associação entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* para o receptor alfa de estrógeno e a OA generalizada. Para isso, fizeram a análise dos fragmentos de restrição *PvuII* e *XbaI* para o RE α de 65 pacientes japonesas e compararam com os de 318 voluntárias saudáveis. Como resultado, os encontraram que o genótipo PpXx - com letras maiúsculas indicando a presença e minúsculas a ausência do sítio de restrição – é um marcador de risco significativo para esta doença, com indivíduos carregadores deste genótipo apresentado cerca de 1,9 mais chances de serem acometidos por OA generalizada. Esta associação foi ainda mais c em pacientes com alterações radiográficas severa e mais jovens. Em conclusão, os autores afirmaram que apesar da variação no RE α ser um marcador de risco para a doença estudada, a maneira através da qual este genótipo influencia no desenvolvimento da doença permanece desconhecida.

Artrite reumatóide (AR) é uma doença auto-imune que afeta mais comumente mulheres do que homens. Em vista do possível papel dos estrógenos na patogênese da AR, Ushiyama *et al.* (1999) também conduziram, no ano seguinte, um estudo para investigar a associação entre polimorfismos genéticos para o RE α e a AR. Avaliaram os fragmentos de restrição *PvuII* e *XbaI* em 70 homens e 240 mulheres portadores de AR e 300 homens e 350 mulheres saudáveis. Como resultados, os autores encontraram que apenas mulheres carregadoras do genótipo PPxx (homozigoto Px) tenderam a desenvolver a AR mais cedo do que aquelas que não carregavam cópias do haplótipo Px. Concluíram, então, que algumas variações no gene RE α podem estar relacionadas ao período de início da AR, sugerindo um papel da interação entre o gene e o estrógeno no desencadeamento da doença.

Considerando as evidências acumuladas que suportam o papel de genes na etiologia da OA. Diversos genes candidatos foram alvos de estudo como sendo *loci* de susceptibilidade em potencial já que estão envolvidos na regulação do tecido ósseo. Em seu estudo, Loughlin *et al.* (2000), analisaram a associação entre genes previamente sugeridos como marcadores de doença, como o VDR e o RE α , e um novo gene candidato que está implicado na densidade óssea, o COL1A1, como a OA idiopática. Para isso, avaliaram 371 pacientes e compararam com 369 voluntários saudáveis, no Reino Unido. Neste trabalho, os

autores não encontraram evidência de associação entre todos os polimorfismos de nucleotídeo único estudados e a OA idiopática.

Ainda em 2000, Ongphiphahak *et al.* investigaram se o polimorfismo *PvuII* para o RE α está associado a diferenças funcionais na resposta à terapia de reposição estrogênica em mulheres tailandesas na pós-menopausa com osteoporose. Compuseram um grupo de 124 pacientes que foram aleatoriamente divididas em dois grupos: um recebendo 0,3 e o outro 0,625mg de estrógenos equinos conjugados (EEC). Para todos os indivíduos tomando a maior dose de EEC, a DMO lombar aumentou significante após um ano de administração da terapia; já para os indivíduos utilizando a menor dose, o mesmo foi verdadeiro apenas para os indivíduos carregando os alelos PP e Pp, enquanto aqueles carregadores do genótipo pp não apresentaram melhora nos seus índices de DMO. Os autores concluíram que o polimorfismo para o RE α afeta a resposta esquelética à terapia estrogênica em mulheres na pós-menopausa e seu efeito parece ser sítio-específico, já que não interferiu nos índices de DMO de colo femoral. A determinação do genótipo do RE α pode ajudar a identificar mulheres na pós-menopausa que terão benefícios esqueléticos a partir da terapia estrogênica.

Bergink *et al.* (2003) justificaram seu estudo relatando que a importância de influências genéticas na etiologia da OA já é conhecida, entretanto os genes envolvidos ainda são pobremente definidos. Em virtude disso, estudaram a associação entre os polimorfismos para o RE α *PvuII* e *XbaI* e a prevalência de OA radiográfica de joelho em 1483 idosos holandeses. Haplotipagem direta foi o método utilizado para se investigar a associação com o escore radiográfico de Kellgren/Lawrence e escores de osteófitos e diminuição do espaço articular. O alelo PX esteve associado com a maior prevalência de OA, particularmente com o nível de formação de osteófitos, sendo que o risco associado, após ajuste para fatores confundentes, foi de 1.3 para indivíduos heterozigotos e 2.2 para homozigotos PX. Este estudo mostrou que polimorfismos para o RE α estão associados a OA radiográfica de joelho, tanto em homens como em mulheres idosos.

Para investigar os polimorfismos para o RE α para suas associações com OA primária de joelho, Jin *et al.* (2004) conduziram um estudo caso-controle de associação contando

com 151 pacientes e 397 indivíduos saudáveis de uma população coreana. Três polimorfismos para o RE α foram testados: *PvuII* e *XbaI* no íntron 1 e *BtgI* no éxon 8. Não houve associação entre a distribuição dos genótipos *PvuII* e *XbaI* e OA, porém, na análise de haplótipos dos três polimorfismos em conjunto, o haplótipo TGA mostrou forte associação início tardio, condição radiograficamente severa, e OA funcionalmente pobre do joelho. Em conclusão, os autores apresentaram que o haplótipo do gene RE α pode estar associado à OA primária de joelho na população coreana.

Mais tarde no mesmo ano, Valdes *et al.* (2004), também amparados pela composição genética etiológica da OA, investigaram o papel de 26 SNP em 24 genes candidatos a susceptibilidade e progressão da OA, dentre os quais os fragmentos de restrição *PvuII* e *XbaI* no íntron 1 do gene RE α . O estudo contou com 749 mulheres do Reino Unido com idades entre 43 e 67 anos. Dentre seus achados, destacam-se aqui aqueles referentes aos receptores de estrógeno. Os autores encontraram, em similaridade ao estudo realizado na Coréia, que os polimorfismos analisados estiveram associados ao grau de formação de osteófitos. Concluíram com seus resultados que é possível que a combinação de genes pode se provar mais útil do que um polimorfismo individual para detectar grande efeitos sobre o risco de desenvolvimento de OA e ressaltaram que estudos a necessidade de se desenvolver técnicas de diagnóstico genético que predigam a susceptibilidade e/ou progressão da doença baseadas em SNP.

A contribuição genética para a etiologia da espondilose espinhal, uma desordem articular crônica degenerativa, também é sugerida. Koshizuka *et al.* (2006) conduziram um estudo para determinar a associação de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) para os genes dos receptores α de estrógeno e de vitamina D, do paratormônio e da interleucina 1 β com a severidade radiográfica da espondilose lombar ao nível dos discos de L1/2 a L5/S1 em 318 mulheres japonesas na pós-menopausa. Os autores obtiveram como resultados uma associação entre os haplótipos de RFLP do RE α e do RVD com a severidade da espondilose principalmente nos níveis superiores (L1/2 e L2/3), enquanto os outros polimorfismos não demonstraram nenhuma associação. A associação para o RE α foi mais forte no grupo de mulheres com idade abaixo da média, enquanto o contrário foi

verdadeiro para o gene RVD Concluíram que os genes RE α e RVD podem contribuir para a espondilose lombar de maneiras distintas: a sensibilidade ao estrógeno influencia na severidade nas fases iniciais da menopausa, enquanto o gene RVD desempenha importante papel em idades mais avançadas.

Em 2005, Ribeiro conduziu um trabalho com o objetivo de correlacionar a frequência de dois polimorfismos do gene receptor α de estrógeno (*PvuII* e *XbaI*, no íntron 1) com a presença de sinais e percepção de dor relacionados aos desarranjos interno da articulação temporomandibular. Não houve diferença estatística significativa na distribuição dos alelos dos dois polimorfismos. No entanto, houve diferença significativa para o sítio polimórfico *XbaI* quanto à distribuição genotípica entre as voluntárias portadoras de desarranjos internos acompanhados de dor e o grupo controle. O teste OR demonstrou que o genótipo GG aumenta a susceptibilidade de mulheres portadoras de DTM à dor em 2,55. As evidências observadas neste experimento sugerem que o polimorfismo no gene receptor de estrógeno α *XbaI* está associado com a percepção da dor na ATM em mulheres brasileiras.

Com o objetivo de investigar a possível influência dos polimorfismos para o receptor alfa de estrógeno sobre o esqueleto craniofacial de pacientes mulheres portadoras de DTM, Lee *et al.* (2006) conduziram o primeiro estudo em busca desta associação especificamente nas articulações temporomandibulares. Para isso, avaliaram 76 mulheres coreanas com idades entre 17 e 48 anos, diagnosticadas como portadoras de osteoartrite sintomática de ATM pelo RDC/TMD, para a presença ou ausência dos sítios polimórficos *PvuII* e *XbaI*. Utilizaram o procedimento de haplotipagem direta e doze mensurações cefalométricas em busca de associação. Mulheres carregadoras do haplótipo Px mostraram angulo do eixo facial e comprimento do corpo mandibular significativamente menores do que as não-carregadoras. Portanto, os autores sugeriram que o polimorfismo para RE α contribui para dimensões mandibulares alteradas em pacientes mulheres portadoras de OA sintomática de ATM e destacaram a necessidades de mais estudos sobre o papel de marcadores genéticos que sejam relevantes para o crescimento e adaptação craniofaciais para ampliar os conhecimentos sobre os determinantes da morfologia craniofacial.

No ano seguinte, o mesmo grupo de estudo publicou um segundo estudo com o objetivo de investigar a associação entre os mesmos polimorfismos para o RE α e susceptibilidade a dor em pacientes mulheres com OA sintomática de ATM. Foi composto um grupo de 100 mulheres com idades entre 17 e 48 anos, diagnosticadas pelo RDC/TMD como portadoras de OA sintomática de ATM, que foi comparado a um grupo controle de 74 mulheres com idades entre 21 e 42 anos. O grupo de pacientes foi dividido em três sub-grupos, de acordo com o grau de dor, dado pela escala visual analógica (EVA). Nenhuma diferença significativa nas frequências de genótipos ou haplótipos foi encontrada entre os grupos de pacientes e controle. Entre as pacientes com OA sintomática de ATM, indivíduos carregando o haplótipo PX demonstraram um risco significativamente maior de reportarem dor moderada ou severa quando comparados àqueles não portadores de nenhuma cópia deste haplótipo. Como conclusão, os autores sugeriram que o polimorfismo para o RE α pode estar associado à susceptibilidade a dor em mulheres com OA sintomática de ATM e complementaram destacando a necessidade de mais estudos genéticos epidemiológicos para explicar porque mulheres sofrem mais com dor na ATM do que homens (Kang *et al.*, 2007).

Considerando todo o exposto até aqui, esta dissertação se focou em buscar fatores genéticos que possam ser considerados marcadores de risco para as DTM, o que ainda é insuficientemente demonstrado na literatura científica atual.

3 OBJETIVOS

Esta dissertação tem como objetivo geral investigar se há associações entre os polimorfismos localizados no primeiro íntron do gene receptor de estrógeno alfa e reconhecidos pelas enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI* e os sinais e sintoma de dor articular em mulheres brasileiras na pós-menopausa e portadoras de desarranjos internos da articulação temporomandibular, fazendo ou não terapia de reposição hormonal.

Para isso, valeu-se dos seguintes objetivos específicos:

1. Determinar se os sítios polimórficos das enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI* no íntron 1 do gene RE α podem ser considerados marcadores de risco para as DTM;
2. Determinar, em caso positivo, o risco associado ao(s) genótipo(s).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este foi um estudo observacional transversal que avaliou, inicialmente, 420 mulheres na pós-menopausa.

As voluntárias que compuseram os grupos de estudo foram selecionadas no Ambulatório de Menopausa do Centro de Apoio Integral à Saúde da Mulher da Faculdade de Ciências Médicas (CAISM/FCM – Unicamp) e os procedimentos laboratoriais foram desenvolvidos no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/Unicamp). Este estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (CEP-FOP/Unicamp) e foi aprovado sob o protocolo de número 134/2005(Apêndice 1)

4.1 SELEÇÃO DAS VOLUNTÁRIAS

Inicialmente, todas as 420 voluntárias foram informadas sobre os objetivos gerais deste estudo, esclarecidas sobre todos os procedimentos que as envolviam e lhes foi solicitado, em caso de concordância, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2).

Em seguida, as voluntárias foram avaliadas através de um questionário anamnésico para acessar brevemente seus dados pessoais, história médica e odontológica (Apêndice 3 e os prontuários médicos de cada uma delas foram analisados a fim de se contemplar os critérios de inclusão desta pesquisa.

Para serem consideradas elegíveis para este estudo, as mulheres deveriam ter idade entre 45 e 75 anos de idade e estar na menopausa há pelo menos seis meses. Além disso, foram incluídas nesta pesquisa mulheres que fazendo ou não Terapia de Reposição Hormonal (TRH).

A fim de se limitar a inclusão de possíveis vieses de confundimento neste estudo, foram adotados os seguintes critérios de exclusão: uso de antagonistas estrogênicos (Tamoxifen, por exemplo); osteoporose; osteoartrite; artrite reumatóide; distúrbios hormonais (diabetes mellitus, hipo ou hipertireoidismo, por exemplo); Lupus Eritematoso Sistêmico; histórico de neoplasias; história de trauma na região da face; neuralgia do trigêmeo; relato de hábitos parafuncionais; distúrbios musculares; infecção e/ou inflamação de ouvido; dor de origem dental ou uso de medicamentos antidepressivos ou antiinflamatórios.

Após o acesso de todas essas informações, 284 mulheres foram consideradas elegíveis para este estudo. Todas as voluntárias foram avaliadas através do Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD) (Dworkin & LeResche, 1992) (Apêndice 4). Este critério de diagnóstico é dividido em 2 eixos: o eixo I envolve os aspectos clínicos das DTM, enquanto o eixo II avalia as condições psicossociais. Inúmeros estudos têm sido feitos ao redor do mundo e têm atestado a confiabilidade e utilidade do eixo I do RDC/TMD (Manfredini *et al.*, 2004; John *et al.*, 2005; Lobbeezoo *et al.*, 2005). Neste estudo, portanto, adotou-se como critério de diagnóstico o eixo I do RDC/TMD.

Nele, o diagnóstico de DTM é estabelecido através da associação entre sinais (tais como padrão de abertura bucal, limite de abertura bucal, extensão de movimentos excursionais e presença de ruídos articulares) e sintomas de DTM (acessados através do relato de dor da própria voluntária presente durante os movimentos mandibulares e palpação dos músculos da mastigação e articulações temporomandibulares), e os sujeitos são então classificados da seguinte maneira: Grupo I – Distúrbios Musculares; Grupo II – Deslocamento de disco; Grupo III – Outras condições da articulação; ou nenhum diagnóstico de DTM.

A partir daí, foi possível formar os grupos que compuseram este estudo:

- **Grupo Controle (Menopausa):** 114 mulheres não portadoras de DTM (sem nenhum diagnóstico de DTM, dado pelo RDC/TMD);

- **Grupo DTM sem dor (Menopausa):** 68 mulheres portadoras de desarranjos internos da ATM e sem percepção de dor na ATM (Grupo II e/ou IIIc do RDC/TMD);
- **Grupo DTM com dor (Menopausa):** 20 mulheres portadoras de desarranjos internos da ATM e com percepção de dor na ATM (Grupo II e IIIa ou IIIb do RDC/TMD);
- **Grupo Controle (TRH):** 41 mulheres não portadoras de DTM (sem nenhum diagnóstico de DTM, dado pelo RDC/TMD);
- **Grupo DTM sem dor (TRH):** 26 mulheres portadoras de desarranjos internos da ATM e sem percepção de dor nas ATM (Grupo II e/ou III do RDC/TMD);
- **Grupo DTM com dor (TRH):** 15 mulheres portadoras de desarranjos internos da ATM e com percepção de dor na ATM (Grupo II e IIIa ou IIIb do RDC/TMD);

A separação das voluntárias entre os grupos *com* ou *sem* percepção de dor na ATM foi feita de acordo com o próprio relato de dor de cada uma delas no momento do exame clínico, já que o RDC/TMD abrange, como já mencionado, a palpação das articulações temporomandibulares com pressão de 0,5 libras associada a uma escala de dor para cada ATM que vai de 0- nenhuma dor, 1 – dor leve, 2-dor moderada até 3-dor severa. Assim sendo, as voluntárias foram selecionadas para comporem os grupos com dor quando indicaram sua percepção de dor como 1, 2 ou 3. Coerentemente, as voluntárias integrantes do grupo sem dor foram aquelas que indicaram sua percepção de dor como 0, ou seja, nenhuma percepção de dor.

4.2 OBTENÇÃO DO DNA

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

1. Foi adicionado 1 ml de solução de TNE (10mM tris pH8, 150mM NaCL, 2mM EDTA) na saliva coletada e 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 adicionou-se mais 1 ml de TNE para uma segunda lavagem. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi novamente desprezado;

3. Adicionou-se 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) ao tubo de cada amostra, vortexou-se por 5 segundos para desmanchar o *pellet* e, posteriormente, os tubos permaneceram por 12 horas na estufa a 50°C;

4. No dia seguinte foram colocados 1,4 ml de cada amostra em *eppendorfs* de 2 ml que foram completados com 500 µl de solução de precipitação de DNA (acetato de amônio 8M, EDTA 1mM) e vortexados por 5 segundos. Os tubos foram então levados à centrífuga por 10 minutos a 17000g;

5. 1800µl do sobrenadante de cada amostra foi dividido em dois *eppendorfs* de 1,75 ml contendo 900 µl cada, nos quais foi adicionado 540µl de isopropanol. Os *eppendorfs* foram levados à centrífuga por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Mais 1,0 ml de etanol 70% foi adicionado para uma nova centrifugação por mais 5 minutos;

6. O sobrenadante foi desprezado e os *eppendorfs* com o *pellet* formado foram deixados na estufa a 50° C para secar por 15 minutos;

7. Em cada *eppendorf* foi acrescentado 100 µl de TE (10mM tris-Cl, 1mM EDTA pH8,0) e as amostras permaneceram 12 horas à temperatura ambiente para que o *pellet* fosse dissolvido;

8. Após as 12 horas, os conteúdos dos dois tubos para cada amostra foram centrifugados em microcentrifuga por 1 minuto para homogeneização do meio e as amostras foram então congeladas.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES (PCR) E DIGESTÃO ATRAVÉS DE ENZIMA DE RESTRIÇÃO (RFLP)

O gene que codifica o RE α se localiza no cromossomo 6q25, compreende 8 éxons e sete íntrons e envolve mais de 140 kilobases (Kb) (Ponglikitmongkol *et al.*, 1988).

No primeiro íntron do gene RE α , dois SNP já foram identificados: uma troca T – C localizada 397 pares de base (pb) acima do éxon 2 e identificada pela enzima de restrição *PvuII*, e uma troca A – G encontrada a 351pb acima do mesmo éxon e reconhecida pela enzima de restrição *XbaI* (Figura 1) (Langdahl *et al.*, 2000).

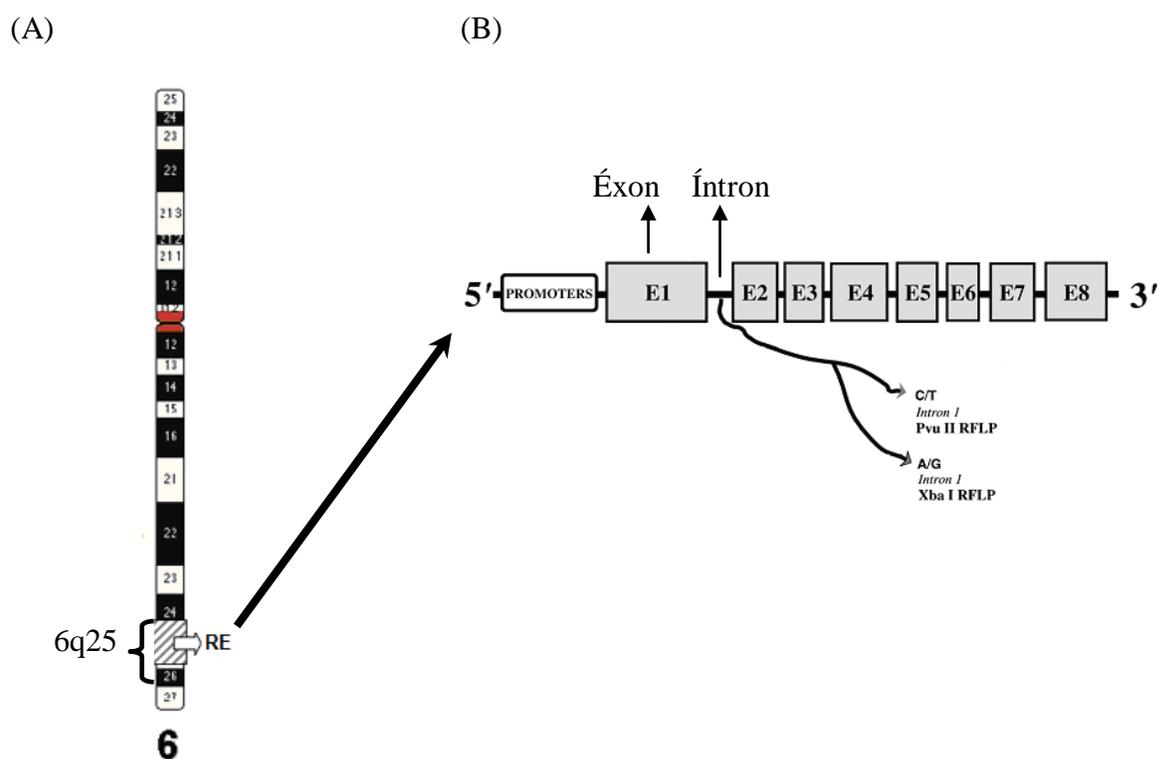


Figura 1 - Locus genético do RE α - cromossomo 6q25 (A) e partes integrantes do gene RE α , indicando a localização dos fragmentos de restrição estudados (B).

Com o auxílio de um termociclador convencional (*GeneAmp*®PCR System 9600), a reação de PCR (Polimerase Chain Reaction) foi utilizada para a amplificação do fragmento contendo parte do íntron 1 e o éxon 2 do gene RE α (Figura 2A).

Os fragmentos amplificados são compostos de 346 pares de base (pb) e foram gerados pelos *primers forward* (5'-GAT-ATC-CAG-GGT-TAT-GTG-GCA-3') e *reward* (5'-AGG-TGT-TGC-CTA-TTA-TAT-TAA-CCT-TGA-3') em uma reação tamponada de 25 μ l contendo 5 μ l de DNA genômico, bases nitrogenadas A, T, C e G e a enzima que catalisa a formação das fitas complementares de DNA – *Taq* DNA polimerase. A reação de PCR foi feita através de um protocolo cíclico de 94°C, 60°C e 72°C por 45 seg cada, num total de 30 ciclos (Figura 2B).

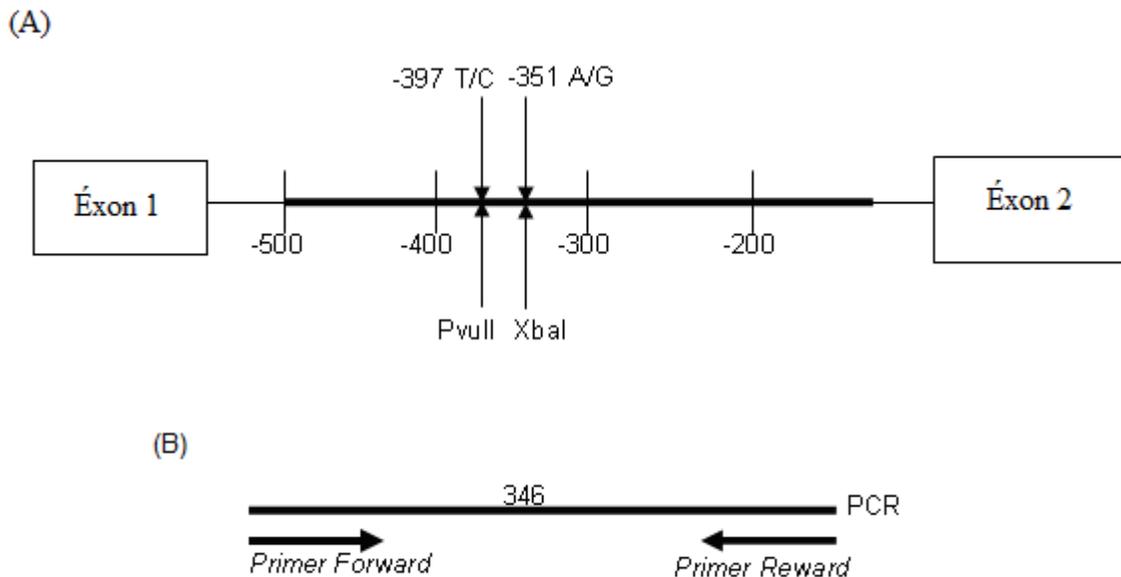


Figura 2 - Localização dos sítios de restrição das endonucleases Pvu II e XbaI no íntron 1 do gene RE α (A) e amplificação via PCR do fragmento contendo os dois sítios polimórficos (B).

Ao final dos ciclos de PCR, portanto, obteve-se a região do DNA a ser estudada em quantidade suficiente para submetê-la à técnica de restrição. Para isso, foi realizada a técnica de RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), na qual os

fragmentos amplificados foram submetidos à digestão pelas enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI* para a identificação dos alelos.

Para a digestão pela enzima *PvuII*, 10 µL dos produtos do PCR foram digeridos com 5U da enzima por 90 min (37°C) para detecção do alelo T (104 pb + 242 pb) ou do alelo C (346 pb) (Figura 3A). Para a enzima *XbaI*, também 10 µL dos produtos do PCR foram digeridos com 7U da enzima por 90 min (37°C) para detecção do alelo G (346 pb) e do alelo A (151 pb + 195 pb) (Figura 3B).

A ausência dos sítios de restrição para as endonucleases *PvuII* e *XbaI* foi convencionalmente indicada com as letras maiúsculas *P* e *X*, e sua presença, conseqüentemente, com as letras minúsculas *p* e *x*, respectivamente. Os sujeitos, portanto, foram designados como homozigotos *PP* ou *XX*, *pp* ou *xx*, ou ainda, heterozigotos *Pp* ou *Xx*.

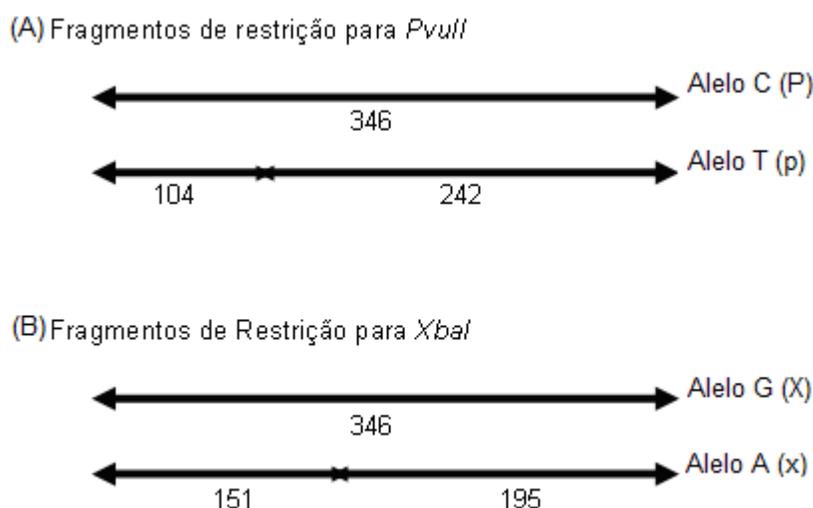


Figura 3 - Produto da PCR e fragmentos de restrição possíveis para a digestão pelas endonucleases *PvuII* (A) e *XbaI* (B).

Finalmente, o produto do RFLP foi submetido à eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% que posteriormente foram corados pela técnica da prata (Sanguinetti *et al.*, 1994) para possibilitar a separação dos fragmentos de DNA e conseqüente identificação dos alelos para interpretação dos resultados (Figura 4).

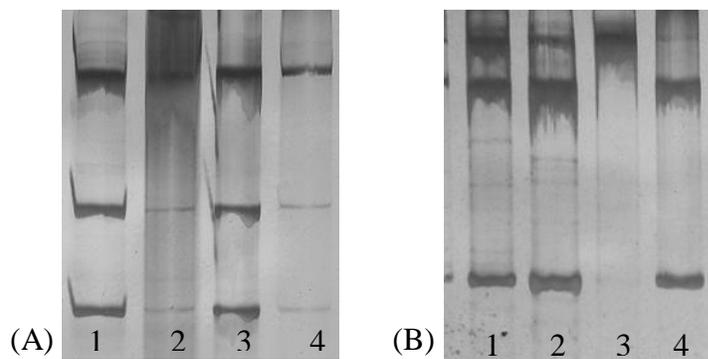


Figura 4 – Gel de eletroforese corado e fotografado. Em (A): Fragmentos de restrição da enzima *XbaI* mostrando em 1 e 3 indivíduos heterozigotos *Xx* e em 2 e 4 homozigotos *XX*; Em (B): Fragmentos de restrição da enzima *PvuII* mostrando em 1 e 2 indivíduos heterozigotos *Pp*, em 3 indivíduo homozigoto *PP* e em 4 indivíduo homozigoto *pp*.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* de cada polimorfismo estudado foi calculado, tanto para o grupos testes como para o grupo controle, com auxílio do programa BioEstat versão 5.0. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* determina se a distribuição de genótipos homocigotos e heterocigotos de um polimorfismo em uma determinada população está de acordo com o esperado.

A comparação da frequência de distribuição dos genótipos entre os grupos controles e os grupos de pacientes portadores de desarranjos internos de DTM foi realizada através do teste χ^2 , com nível de significância em 5%. O risco associado aos genótipos foi calculado, quando pertinente, através do teste *Odds Ratio* (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC).

6 RESULTADOS

6.1 *PvuII* (-397T/C)

As frequências genóticas do polimorfismo identificado pela enzima de restrição *PvuII* mostraram-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em todos os grupos estudados ($p > 0,05$).

As Tabelas 1, 2, 3 e 4 trazem a distribuição dos genótipos possíveis para este sítio polimórfico, bem como a suas respectivas frequências, nos diferentes grupos estudados.

Na Tabela 1, encontram-se os dados referentes à comparação do grupo *Controle (Menopausa)* com os grupos *DTM sem dor (Menopausa)* e *DTM com dor (Menopausa)*. Nesta análise, não houve diferença estatística significativa na distribuição dos genótipos entre os grupos ($p = 0,3073$).

Tabela 1 - Distribuição dos genótipos identificados pela enzima de restrição *PvuII* nos grupos *Controle (Menopausa)*, *DTM sem dor (Menopausa)* e *DTM com dor (Menopausa)*.

Grupos	Controle	DTM sem dor	DTM com dor	P
	(Menopausa)	(Menopausa)	(Menopausa)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Genótipo</i>				
<i>PP</i>	30 (26,32)	15 (22,06)	6 (30)	0,3073
<i>Pp</i>	64 (56,14)	40 (58,82)	7 (35)	
<i>pp</i>	20 (17,54)	13 (19,12)	7 (35)	

A distribuição dos genótipos nos grupos *Controle (Menopausa)*, *DTM sem dor (TRH)* e *DTM com dor (TRH)*, mostrou-se estatisticamente diferente ($p = 0,036$) (Tabela 2). Nesta análise, o genótipo homozigoto *PP* representou um risco 0,3125 vezes maior para o fenótipo de *DTM sem dor* quando comparado ao genótipo heterozigoto *Pp* ($p = 0,0349$; IC: 0,1156-0,8445).

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos identificados pela enzima de restrição *PvuII* nos grupos *Controle (Menopausa)*, *DTM sem dor (TRH)* e *DTM com dor (TRH)*.

Grupos	Controle Menopausa	DTM sem dor	DTM com dor	P
	n (%)	(TRH) n (%)	(TRH) n (%)	
<i>Genótipo</i>				
<i>PP</i>	30 (26,32)	12 (46,15)	2 (13,33)	0,036
<i>Pp</i>	64 (56,14)	8 (30,77)	12 (80)	
<i>pp</i>	20 (17,54)	6 (23,08)	1 (6,67)	

A Tabela 3 traz a comparação da distribuição de genótipos entre os grupos Controle (TRH), DTM sem dor (Menopausa) e DTM com dor (Menopausa). Não houve diferença estatística significativa na distribuição dos genótipos nestes grupos ($p=0,2869$).

Tabela 3 – Distribuição dos genótipos identificados pela enzima de restrição *PvuII* nos grupos *Controle (TRH)*, *DTM sem dor (Menopausa)* e *DTM com dor (Menopausa)*.

Grupos	Controle	DTM sem dor	DTM com dor	P
	(TRH) n (%)	(Menopausa) n (%)	(Menopausa) n (%)	
<i>Genótipo</i>				
<i>PP</i>	8 (19,51)	15 (22,06)	6 (30)	0,2869
<i>Pp</i>	26 (63,41)	40 (58,82)	7 (35)	
<i>pp</i>	7 (17,07)	13 (19,12)	7 (35)	

Na Tabela 4 estão expostos os dados referentes à distribuição dos genótipos nos grupos *Controle (TRH)*, *DTM sem dor (TRH)* e *DTM com dor (TRH)*. À semelhança do que foi encontrado quando estes dois grupos de pacientes portadores de DTM foram comparados ao grupo *Controle (Menopausa)*, nesta análise também houve diferença estatística significativa na distribuição dos genótipos entre os três grupos ($p=0,0185$) e o genótipo homocigoto *PP* representou um risco 0,2051 vezes maior para o fenótipo de DTM sem dor em comparação ao genótipo heterocigoto *Pp* ($p=0,0169/IC:0,0621-0,6777$).

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos identificados pela enzima de restrição *PvuII* nos grupos *Controle (TRH)*, *DTM sem dor (TRH)* e *DTM com dor (TRH)*.

Grupos	Controle	DTM sem dor	DTM com dor	P
	(TRH)	(TRH)	(TRH)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Genótipo</i>				
<i>PP</i>	8 (19,51)	12 (46,15)	2 (13,33)	0,018 5
<i>Pp</i>	26 (63,41)	8 (30,77)	12 (80)	
<i>pp</i>	7 (17,07)	6 (23,08)	1 (6,67)	

6.2 *XbaI* (-357A/G)

As frequências genóticas do polimorfismo identificado pela enzima de restrição *XbaI* também se mostraram em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em todos os grupos estudados ($p > 0,05$).

As Tabelas 5, 6, 7 e 8 trazem a distribuição dos genótipos possíveis para o sítio polimórfico da enzima de restrição *XbaI*, bem como a suas respectivas frequências, nos diferentes grupos estudados. Todas as análises feitas para este polimorfismo não identificaram nenhuma diferença estatística significativa na distribuição dos genótipos entre os grupos controles e os grupos de pacientes portadores de desarranjos internos de ATM.

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos identificados pela enzima de restrição *XbaI* nos grupos *Controle (Menopausa)*, *DTM sem dor (Menopausa)* e *DTM com dor (Menopausa)*.

Grupos	Controle	DTM sem dor	DTM com dor	P
	(Menopausa)	(Menopausa)	(Menopausa)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Genótipo</i>				
<i>XX</i>	15 (13,16)	13 (19,12)	2 (10)	0,174 1
<i>Xx</i>	70 (61,4)	47 (69,12)	15 (75)	
<i>xx</i>	29 (25,44)	8 (11,76)	3 (15)	

Tabela 6 - Distribuição dos genótipos identificados pela enzima de restrição *XbaI* nos grupos *Controle (Menopausa)*, *DTM sem dor (TRH)* e *DTM com dor (TRH)*.

Grupos	Controle	DTM sem dor	DTM com dor	P
	Menopausa	(TRH)	(TRH)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Genótipo</i>				
XX	15 (13,16)	3 (11,54)	2 (13,33)	0,989 8
Xx	70 (61,4)	16 (61,54)	10 (66,67)	
xx	29 (25,44)	7 (26,92)	3 (20)	

Tabela 7 - Distribuição dos genótipos identificados pela enzima de restrição *XbaI* nos grupos *Controle (TRH)*, *DTM sem dor (Menopausa)* e *DTM com dor (Menopausa)*.

Grupos	Controle	DTM sem dor	DTM com dor	P
	(TRH)	(Menopausa)	(Menopausa)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Genótipo</i>				
XX	4 (9,75)	13 (19,12)	2 (10)	0,679 2
Xx	32 (78,05)	47 (69,12)	15 (75)	
xx	5 (12,2)	8 (11,76)	3 (15)	

Tabela 8 - Distribuição dos genótipos identificados pela enzima de restrição *XbaI* nos grupos *Controle (TRH)*, *DTM sem dor (TRH)* e *DTM com dor (TRH)*.

Grupos	Controle	DTM sem dor	DTM com dor	P
	(TRH)	(TRH)	(TRH)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Genótipo</i>				
XX	4 (9,75)	3 (11,54)	2 (13,33)	0,607 3
Xx	32 (78,05)	16 (61,54)	10 (66,67)	
xx	5 (12,2)	7 (26,92)	3 (20)	

7 DISCUSSÃO

Com base nos resultados encontrados, é possível supor que, face à disponibilidade de estrógeno, o genótipo homozigoto *PP* no íntron 1 do RE α pode ser considerado um marcador de risco para o desenvolvimento de patologias articulares na ATM, já que ele se mostrou associado ao fenótipo de DTM sem dor.

É importante ressaltar que este parece ser um efeito desencadeado pela presença do hormônio, já que este mesmo genótipo não pôde ser associado ao fenótipo de DTM sem dor nos grupos compostos por indivíduos em estado de hipoestrogenia - *DTM sem dor (Menopausa)* e *DTM com dor (Menopausa)*. Este achado era esperado uma vez que, como já foi previamente descrito neste trabalho, o RE α precisa ser ativado pela ligação aos estrógenos ou seus agonistas para exercer seus efeitos e, portanto, não seria coerente supor que indivíduos com biodisponibilidade bastante reduzida deste hormônio estivessem submetidos aos efeitos dos polimorfismos estudados.

Além disso, já que o genótipo homozigoto *PP* parece contribuir para o desarranjo das articulações temporomandibulares seria esperado que, quando o grupo *DTM com dor (TRH)* fosse comparado aos grupos *Controles (Menopausa ou TRH)*, esta associação também fosse demonstrada, já que, obviamente, trata-se de sujeitos igualmente acometidos pela disfunção. Este estudo, porém, falhou ao encontrar tal associação em função do número amostral reduzido do referido grupo (n=15), principal limitação deste trabalho.

Estudos na literatura que corroborem com os resultados deste trabalho são escassos se considerarmos apenas aqueles que investigaram as associações dos fragmentos de restrição das enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI* para o íntron 1 do RE α com desordem temporomandibular.

Kang *et al.* (2007) mostraram em seu estudo que os genótipos contendo pelo menos uma cópia do haplótipo (combinação de genótipos) PX (*PPXX*, *PPXx* ou *PpXx*) estão associados a um maior risco de dor moderada e severa, acessada através da escala visual analógica, entre pacientes portadoras de osteoartrite sintomática de ATM. Em 2005,

Ribeiro encontrou uma associação marginalmente significativa ($p=0,0556$) entre o genótipo homocigoto *XX* e desarranjos internos de ATM não acompanhados de dor e significativa para desarranjos internos de ATM acompanhados de dor ($p=0,0368$), de tal forma que este genótipo indicou um risco 2,5 vezes maior para o fenótipo em comparação aos genótipos *Xx* e *xx*.

Neste estudo, nenhuma associação entre os genótipos possíveis identificados pela enzima de restrição *XbaI* pôde ser demonstrada. Porém, consideradas em conjunto, as informações acerca das associações entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* e o acometimento das articulações temporomandibulares permitem considerar que o alelo *P* esteja em forte desequilíbrio de ligação com o alelo *X*. Isto é, no gene receptor de estrógeno alfa, os alelos identificados pelas enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI* estão localizados em uma região intrônica separados por apenas cerca de 50 pares de base. Os alelos *P* e *X*, assim como os alelos *p* e *x*, estão fortemente associados um ao outro. (Gennari *et al.*, 2005).

O haplótipo *pX*, de fato, não foi observado em parte dos estudos (Ushiyama *et al.*, 1999; Bergink *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007), porém o haplótipo *Px* foi detectado, mesmo que com baixa frequência (Ushiyama *et al.*, 1999; Albagha *et al.*, 2001; Bergink *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007), o que indica que o desequilíbrio de ligação é forte, porém não é completo.

Portanto, é perfeitamente plausível deduzir que os alelos *P* e *X* estejam em desequilíbrio de ligação e, de alguma forma, implicados na fisiopatologia e severidade dos desarranjos internos da ATM.

Neste trabalho, todavia, não foi possível encontrar associações entre os grupos compostos por indivíduos portadores de DTM acompanhada de dor nas articulações temporomandibulares e os polimorfismos estudados e aqui cabe uma breve discussão acerca desta importante limitação do estudo.

Três fatores podem ser apontados como responsáveis pelo reduzido número amostral dos grupos *DTM com dor (Menopausa)* e *DTM com dor (TRH)*, ambos relacionados ao rigor no critério de seleção das amostras. Em primeiro lugar, a fim de que os resultados pudessem ser categoricamente associados aos desarranjos internos de ATM,

nenhuma voluntária portadora de qualquer outra desordem óssea, articular, muscular ou endócrina – altamente prevalentes na faixa etária estudada – foi incluída nos grupos de estudo. Em segundo lugar, nenhuma mulher que estivesse fazendo uso de qualquer medicamento que pudesse alterar ou modular sua percepção de dor - como analgésicos, antidepressivos e antiinflamatórios – foi admitida como voluntária. Por fim, este estudo baseou-se no critério de diagnóstico em pesquisa para desordens temporomandibulares (RDC/TMD) para selecionar os indivíduos que compuseram os grupos portadores de desordem. Este critério de diagnóstico apresenta, por sua vez, duas importantes limitações na detecção de pacientes considerados sintomáticos: para ser diagnosticado como tal, o indivíduo deve apresentar auto-relato de dor na ATM no momento da avaliação e concomitante sensibilidade dolorosa na articulação sob uma pressão de 0,5 libras.

Portanto, os mesmos fatores que respondem pelo ponto forte deste trabalho, que é o rigor e padronização na seleção das voluntárias a fim de minimizar ou limitar ao máximo a inclusão de vieses de seleção de amostra na pesquisa, também são determinantes da dificuldade e impossibilidade de se compor grupos amostrais maiores que tornariam os presentes resultados indubitáveis.

No que diz respeito às investigações de associação entre os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* para o REa e outras desordens ósseas e articulares além das disfunções temporomandibulares, a literatura é mais extensa apesar de não existir um consenso sobre um genótipo ou padrão genotípico que seja determinantemente um marcador de risco para as doenças.

Os achados deste estudo indicando que o genótipo *PP* parece estar implicado na patologia intra-articular da ATM, vão de encontro a muitos trabalhos publicados na literatura científica que investigaram a implicação destes mesmos alelos sobre a densidade mineral óssea (DMO) em mulheres de diferentes etnias ao redor do mundo.

A esse respeito, Kobayashi *et al.* (1996) puderam associar o haplótipo *PPxx* a escores menores de DMO em mulheres japonesas na pós-menopausa e mais tarde, outro estudo na mesma população, associou o haplótipo *PPXX* à DMO reduzida (Yamada *et al.*, 2002). Em um estudo numa população italiana, também o haplótipo *PPXX* pareceu

contribuir para a diminuição da massa óssea (Gennari *et al.*, 1998). O haplótipo *Px*, novamente, mostrou-se associado a valores inferiores de DMO de pescoço femoral e coluna lombar em mulheres escocesas (Albagha *et al.*, 2001). Quando analisados na forma de genótipos por Ivanova *et al.*, os genótipos *PP* e *XX*, mostraram-se individualmente associados à baixa DMO (Ivanova *et al.*, 2007).

Um resultado particularmente interessante e que pode auxiliar na explicação do potencial fisiopatológico do alelo *P* sobre estruturas ósseas é o de Ongphiphahakul *et al.* (2000). Após um ano acompanhando mulheres tailandesas na pós-menopausa e com osteoporose fazendo terapia de reposição estrogênica (TRE) com doses diferentes, os resultados mostraram que além do esperado aumento de massa óssea observado naquelas sob TRE de maior dose, apenas indivíduos carregando genótipo com uma ou duas cópias do alelo *P* responderam igualmente à terapia de menor dose de estrógenos com ganho de massa óssea.

Este achado substantia a hipótese de que o alelo *P* implica em maior responsividade ao hormônio estrogênico e se, este alelo tem potencial fisiopatológico como suportado pelos estudos supracitados e pelo presente estudo, a associação do seu papel patológico a maior resposta desencadeada pela ativação do estrógeno, podem responder pela maior susceptibilidade à doença de indivíduos carregando genótipo com este alelo.

Pesquisas avaliando a influência dos polimorfismos genéticos *PvuII* e *XbaI* para o REa sobre condições osteoartíticas e que corroboram com os resultados do presente estudo também estão disponíveis na literatura científica.

Ushiyama *et al.* (1998) demonstraram, em uma população japonesa, que o genótipo *PpXx* é um marcador de risco significativo para OA generalizada, com indivíduos carregadores deste genótipo apresentando cerca de 1,9 mais chances de apresentarem o fenótipo. Mulheres carregando o haplótipo homocigoto *Px* tenderam a desenvolver artrite reumatóide mais cedo do que aquelas que não carregavam cópia deste haplótipo (Ushiyama *et al.*, 1999). Em uma população holandesa, o alelo *PX* esteve associado à maior prevalência de osteoartrite (OA) sendo que o risco associado ao fenótipo foi de 1.3 para indivíduos heterocigotos e 2.2 para homocigotos *PX* (Bergink *et al.*, 2003).

Existem também na literatura científica trabalhos que não encontraram nenhuma associação entre desordens ósseas e articulares e os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* para o RE α (Han *et al.*, 1999; Loughlin *et al.*, 2000; Sapir-Koren *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2004) ou, ainda, alguns trabalhos implicando genótipos diferentes. Em um estudo numa população holandesa, Van Meurs *et al.* (2003) encontraram um efeito dose-dependente do haplótipo *px* sobre a redução da DMO de coluna lombar e área óssea vertebral.

Uma das possíveis explicações para este fator é a composição genômica inerente às populações estudadas. Muito embora pequenas diferenças na distribuição genotípica dos fragmentos de restrição *PvuII* e *XbaI* tenham sido descritas, importantes variações foram observadas com relação aos seus haplótipos. Populações asiáticas, por exemplo, apresentaram frequência elevada do haplótipo *Px* e reduzida do *PX* em relação às populações caucasianas de ascendência européia, enquanto o haplótipo *px* esteve presente com menor frequência em uma população africana (Van Meurs *et al.*, 2003).

Em especial atenção aos achados deste trabalho, que implicam o genótipo *PP* nos desarranjos intra-articulares de ATM, algumas considerações precisam ser feitas na tentativa de explicar como, ou através de quais mecanismos, este polimorfismo poderia contribuir para o acometimento interno das articulações.

Os fragmentos de restrição *PvuII* e *XbaI* para o RE α se encontram em uma região intrônica e, por isso, aparentemente não funcional do gene. Recentemente, Herrington *et al.* observaram que a troca T por C que culmina na perda do sítio de restrição para a enzima *PvuII* (alelo *P*), resulta num sítio de ligação em potencial para o fator de transcrição *myb* que, na presença de B-*myb* e *in vitro*, é capaz de aumentar em 10 vezes a expressão gênica (Herrington *et al.*, 2002). Portanto, é possível supor que a presença do alelo *P* possa amplificar a transcrição de RE α .

Uma explicação alternativa é que, os dois polimorfismos no íntron 1 do RE α estejam em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo funcional em outro ponto do mesmo gene, ou, menos provavelmente, em outro gene.

Sobre isso, está bem estabelecido que estes polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo de número variável de repetições em *tandem*

(TA)_n (VNTR, do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*) na região promotora do gene RE α (Becherini *et al.*, 2000). Estudos já demonstraram que polimorfismos de VNTR nas proximidades de promotores gênicos podem ter influência significativa sobre a regulação transcricional (Iwashita *et al.*, 2001). É concebível que o número de repetições (TA)_n seja importante para a transcrição do gene RE α .

Até hoje, pelo menos três promotores diferentes já foram identificados para o gene RE α e diversos sítios de iniciação de transcrição para estes promotores já foram sugeridos (Keaveney *et al.*, 1991; Piva *et al.*, 1992; Piva *et al.*, 1993; Grandien *et al.*, 1993; Grandien *et al.*, 1995; Grandien *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1997; Grandien *et al.*, 1997; Donaghue *et al.*, 1999). Em virtude da sua posição entre as regiões promotoras A e B, especula-se que variações alélicas devido a diferentes números de repetições TA possam ter relevância fisiológica por afetar a utilidade do promotor e/ou transcrição do RNA mensageiro (Becherini *et al.*, 2000).

Além disso, um novo elemento regulatório que se assemelha a um elemento responsivo a esteróides foi recentemente identificado na região flanqueadora 5' do gene RE α humano, aproximadamente 220 bases além do polimorfismo de VNTR (TA)_n, e foi demonstrado que esta seqüência age como um forte *enhancer* em diversos tipos celulares (Chon *et al.*, 1999).

Se o alelo *P*, associado aos desarranjos internos de ATM, é capaz de aumentar a responsividade ao estrógeno, como demonstrado por Ongphiphahakaul *et al.* (2000), é plausível supor que ele esteja em concomitante desequilíbrio de ligação ao alelo *X* e ao polimorfismo de VNTR (TA)_n, resultando em supra-regulação da transcrição gênica do RE α e, conseqüentemente, resultando em maior responsividade ao estrógeno.

Partindo deste princípio, é necessário ainda sugerir ou explicar de que maneira, então, este polimorfismo estaria implicado nos desarranjos internos de ATM, ou melhor, quais os efeitos biológicos deste genótipo sobre as estruturas constituintes das articulações que respondem pela maior susceptibilidade à doença dos indivíduos carregadores deste genoma. A esse respeito, algumas hipóteses que corroboram para o papel potencialmente patogênico dos estrógenos sobre as estruturas articulares podem ser apresentadas.

Já foi identificado que as principais células constituintes dos tecidos articulares temporomandibulares são alvo da ação de estrógeno (Abubaker *et al.*, 1993). Em um estágio inicial, desarranjos internos de ATM causam danos ou alterações nas estruturas cartilaginosas deste complexo. Estudos feitos em animais foram capazes de demonstrar que o conteúdo de colágeno do disco articular é diminuído em ratos fêmeas em comparação aos machos e, machos castrados tratados com estrógeno também apresentam esta diminuição em relação aos não castrados (Abubaker *et al.*, 1996). O conteúdo de proteoglicanos, qualidade de condroblastos hipertróficos e espessura da cartilagem de articular do côndilo mandibular de ratos também foram prejudicados pela presença de estrógeno (Ng *et al.*, 1999).

Ainda em estágio inicial, alterações morfológicas da ATM podem estar associadas a várias metaloproteinases de matriz (MMP) causando deslocamento do disco articular. A síntese de MMP na ATM pode ser induzida por diversas citocinas, incluindo as interleucinas 1 β , 6 e 8 (Il-1 β , -6, -8) e fator de necrose tumoral (TNF). Um recente estudo de cultura de células da cartilagem articular de ratos, mostrou que, a expressão e concentração de Il-1 β , -6 e -8 foram aumentadas à medida em que se aumentou a concentração de 17 β -estradiol no meio de cultura, enquanto as concentrações de Il-4 e -10, tidas como citocinas antiinflamatórias graças aos seus efeitos antagônicos aos das Il-1 β , -6 e -8, permaneceram inalteradas, sugerindo então que o estrógeno tem o potencial de causar DTM por induzir a expressão de moléculas que culminam na degradação da matriz (Yun *et al.*, 2008).

Se houver progressão da doença, estruturas ósseas do complexo articular temporomandibular passam a ser afetadas e alterações degenerativas resultam em quadros de osteoartrite e osteoartrose de ATM.

A importância do gene RE α na dinâmica dos tecidos ósseos é suportada por diversas observações científicas. Primeiramente, osteoblastos, osteoclastos células do estroma medular expressam receptores de estrógeno e são, portanto, por ele moduladas (Eriksen *et al.*, 1988; Pensler *et al.*, 1990). Nesta linha de pesquisa existe um trabalho clássico de relato de caso de um homem com uma mutação homozigótica inativadora do

gene RE α que desenvolveu osteoporose precocemente (Smith *et al.*, 1994). Além disso, ratos *knockout* para RE α exibem baixa DMO (Korach, 1994).

Em mulheres, a deficiência de estrógeno causada tanto pela menopausa como pela remoção cirúrgica dos ovários, resulta em marcada perda de massa óssea em função do aumento da atividade de reabsorção óssea pelos osteoclastos (Riggs *et al.*, 1998) que, por sua vez, pode ser restaurada pela terapia de reposição estrogênica (Lindsay *et al.*, 1976).

Os mecanismos de ação do estrógeno sobre o osso ainda não são completamente entendidos, mas relatos recentes sugerem que ele pode afetar os osteoclastos diretamente (Oursler *et al.*, 1991; Fiorelli *et al.*, 1995), mas ainda mais importante, ele pode exercer seus efeitos sobre a atividade osteoclástica indiretamente por suprimir a produção de citocinas que induzem a reabsorção óssea pelos próprios osteoclastos e células do estroma medular (Pacifci, 1998). Estas citocinas incluem as interleucinas 1 e 6, fator de necrose tumoral e prostaglandinas, que parecem todas agir cooperativamente na indução da reabsorção óssea mediante a deficiência de estrógeno. (Gennari *et al.*, 2002)

Ao contrário do que ocorre sistemicamente, Galal *et al.* conduziram dois estudos de cultura de células macrofágicas e fibroblásticas, que compõem ultra-estruturalmente a membrana sinovial da ATM, e puderam demonstrar que o estrógeno age supra-regulando a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas progenitoras em macrófagos, auxiliando na explicação da maior susceptibilidade feminina à desordens temporomandibulares (Galal *et al.*, 2007; Galal *et al.*, 2008).

Assim, os resultados do presente estudo somados aos dados científicos sobre os mecanismos de ação moleculares do RE α e às informações acerca do papel potencialmente patogênico dos estrógenos sobre as estruturas articulares da ATM, se considerados em conjunto, levam a hipótese de que o polimorfismo *PP* para o RE α está implicado na fisiopatologia das desordens articulares temporomandibulares por, provavelmente, exacerbar os efeitos locais do hormônio sexual feminino estrogênico.

No que diz respeito à farmacologia, é válido ressaltar que os receptores de estrógeno representam um promissor sistema biológico para a descoberta de drogas

específicas, seletivas e potentes para controlar a evolução de diversas desordens, inclusive a DTM.

Consideradas suas limitações, este estudo auxilia a esclarecer porque mulheres são mais acometidas por este tipo de desordem do que homens e explica porque sua prevalência cai nos anos pós-menopausa e, principalmente, porque dentre indivíduos submetidos aos mesmos fatores etiológicos para DTM, alguns desenvolvem a desordem e outros não.

Parece irrefutável supor que, na interação entre fatores ambientais e psicológicos que respondem pela multifatorialidade etiológica das disfunções de ATM, a composição genética é um grande fator determinante da capacidade adaptativa inter-individual.

8 CONCLUSÕES

Consideradas as limitações deste estudo, foi possível concluir:

1. O genótipo homocigoto *PP*, localizado no sítio polimórfico da enzima de restrição *PvuII* no íntron 1 do gene *REα*, é um marcador de risco para o desenvolvimento de patologias articulares assintomáticas na ATM, enquanto nenhum dos possíveis genótipos localizados no sítio polimórfico da enzima *XbaI* pode ser considerado como tal;

2. O genótipo homocigoto *PP* representa um risco 0,3125 vezes maior para os desarranjos internos assintomáticos de ATM em relação ao genótipo heterocigoto *Pp*, quando comparados entre mulheres em estado de hipoestrogenia e mulheres sob terapia de reposição hormonal;

3. O genótipo homocigoto *PP* representa um risco 0,2051 vezes maior para os desarranjos internos assintomáticos de ATM em relação ao genótipo heterocigoto *Pp*, quando comparados apenas entre mulheres sob terapia de reposição hormonal.

REFERÊNCIAS*

Abubaker AO, Raslan WF, Sotereanos GC. Estrogen and progesteron receptors in temporomandibular joint discs of symptomatic and asymptomatic persons: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 51: 1096-1100.

Abubaker AO, Hebda PC, Gunsolley JN. Effects of sex hormones on protein and collagen content of the temporomandibular joint disc of the rat. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54: 721-727.

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

Albagha OME, McGuigan FEA, Reid DM, Rlston SH. Estrogen receptor α gene polymorphism and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *J Bone Miner Res.* 2001; 16(1): 128-134.

Aufdemorte TB, Van Sickels JE, Dowlick PJ, Sheridan GR, Aragon SB. Estrogen receptors in the temporomandibular joint of the baboon [*Papio cynocephalus*]: an autoradiographic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986; 61: 307-314.

Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansarini R, Massart F, Morelli A, *et al.* Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet.* 2000; 12: 2043–2050.

Bereiter DA, Cioffi JL, Bereiter DF. Oestrogen receptor-immunoreactive neurons in the trigeminal sensory system of male and cycling female rats. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 971-979.

Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, *et al.* Estrogen receptor α gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthr Rheum.* 2003; 48(7): 1913-1922.

Bustamante M, Nogués X, Enjuanes A, Elosua R, Garcia-Girált N, Pérez-Edo-L, *et al.* COL1A1, ESR1, VDR and TGF β 1 polymorphisms and haplotypes in relation to BMD in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2007; (18): 235-243.

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

Coelingh-Bennink HJT. Are all estrogens the same? *Maturitas*. 2004; (47): 269-275.

Cohn CS, Sullivan JA, Kiefer T, Hill SM. Identification of an enhancer element in the estrogen receptor upstream region: implications for regulation of *ER* transcription in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 1999; 158: 25–36.

Dao TTT, Knight K, Ton-That V. Modulation of myofascial pain by the reproductive hormones: a preliminary report. *J Prosthet Dent*. 1998; 79: 663-670.

Donaghue C, Westley BR, May FE. Selective promoter usage of the human estrogen receptor- α gene and its regulation by estrogen. *Mol Endocrinol*. 1999; 13: 1934–1950.

Dworkin SF, Huggins KH, LeResche L, Von Korff M, Howard J, Truelove E, *et al*. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. *J Am Dent Assoc*. 1990^a March; 120: 273–281.

Dworkin SF, LeResche L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique. *J Craniomandib Disord*. 1992; 6(4): 301-355.

Dukro PN, Tait RC, Margolis RB, Deshields TL. Prevalence of temporomandibular symptoms in a large United States Metropolitan area. *Cranio*. 1990 April; 8(2): 131-138.

Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TG, *et al*: Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*. 1988, 241: 84-86.

Farah SB. *DNA, segredos e mistérios*. São Paulo: Sarvier; 1997.

Fiorelli G, Gori F, Petilli M, Tanini A, Benvenuti S, Serio M, *et al*. Functional estrogen receptors in a human pre-osteoclastic cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1995; 92: 2672–2676.

Fischer L, Torres-Cháves KE, Clemente-Napimoga JT, Jorge D, Arsati F, de Arruda Veiga MC, *et al*. The influence of sex and ovarian hormones on temporomandibular joint nociception in rats. *J Pain*. 2008; 9(7):630-638.

Flake NM, Bonebreak DB, Gold MS. Estrogen and inflammation increase the excitability of rat temporomandibular joint afferent neurons. *J Neurophysiol.* 2005; 93: 1585-1597.

Galal N, El-Beialy WR, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Totsuka Y. Novel effect of estrogen on RANK and *c-fms* expression in RAW 264.7 cells. *Int J Mol Med.* 2007; 20: 97-101.

Galal N, El-Beialy WR, Deyama Y, Yoshimura Y, Yoshikawa T, Suzuki K, Totsuka Y. Effect of estrogen on bone resorption and inflammation in the temporomandibular joint cellular elements. *Int J Mol Med.* 2008; 21(6): 785-790.

Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli S, Cepollaro C, *et al.* Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: Evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 939-944.

Gennari L, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Massart F, Brandi ML. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 81: 1-24.

Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabrò A, Becherini L, Martini G, *et al.* Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a huge review. 2005; 161: 307-320.

Glass E, McGlynn F, Glaros A, Melton K, Romans K. Prevalence of temporomandibular disorders in a major metropolitan area. *J Craniomand Pract.* 1993; 11: 217-220.

Goulet JP, Lavigne GJ, Lund JP. Jaw pain prevalence among french-speaking canadians in québec and related symptoms of temporomandibular disorders. *J Dent Res.* 1995; 74 (11): 1738-1744.

Grandien KF, Berkenstam A, Nilsson S, Gustafsson JA. Localization of DNase I hypersensitive sites in the human oestrogen receptor gene correlates with the transcriptional activity of two differentially used promoters. *J Mol Endocrinol.* 1993; 10: 269-277.

Grandien K, Backdahl M, Ljunggren O, Gustafsson JA, Berkenstam A. Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology*. 1995; 136: 2223–2229.

Grandien K. Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue-specific, estrogen receptor mRNA isoform. *Mol Cell Endocrinol*. 1996; 116: 207–212.

Grandien K, Berkenstam A, Gustafsson JA. The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997; 29: 1343–1369.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, *et al*. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986; 320(6058):134-139.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986; 231 (4742): 1150-1154.

Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999; 140: 5566–5578.

Han K, Choi J, Moon I, Yoon H, Han I, Min H, Kim Y, Choi Y. Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and bone turnover in Korean pre-, peri- and postmenopausal women. *Osteop Int*. 1999; 9(4): 290-295.

Hatch JP, Rugh JD, Sakai S, Saunders MJ. Is use of exogenous estrogen associated with temporomandibular signs and symptoms? *J Am Dent Assoc*. 2001; 132: 319-326.

Henry CH, Tull GT, Whittum-Hudson JA, Wolford LM. Analyses of estrogen binding sites of the posterior ligament of the human TMJ. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(6): 698-701.

Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, *et al*. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone

replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation*. 2002; 105: 1879–1882.

Hoyland JA, Mee AP, Baird P, Braidman IP, Mawer EB, Freemont AJ. Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using in situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Bone*. 1997 Feb; 20(2): 87-92.

Ivanova JT, Doukova PB, Boyanov MA, Popivanov PR. *PvuII* and *XbaI* polymorphisms of the estrogen receptor gene and bone mineral density in a Bulgarian population sample. *Hormones (Athens)*. 2007; 6(1): 36-43.

Iwashita S, Koyama K, Nakamura Y. VNTR sequence on human chromosome 11p15 that affects transcriptional activity. *J Hum Genet*. 2001; 46: 717–721.

Jin SY, Hong SJ, Yang HI, Park S, Yoo MC, Lee HJ, *et al*. Estrogen receptor α gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population. *Arthr Res & Ther*. 2004; 6(5): R415-R421.

John MT, Dworkin SF, Mancl LA. Reliability of clinical temporomandibular disorder diagnosis. *Pain*. 2005; 118(1-2): 61-69.

Kamisaka M, Yatani H, Kuboki T, Matsuka Y, Minakuchi H. Four-year longitudinal course of TMD symptoms in an adult population and the estimation of risk factors in relation to symptoms. *J Orofac Pain*. 2000 Summer; 14(3): 224-232.

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: 391-394.

Keaveney M, Klug J, Dawson MT, Nestor PV, Neilan JG, Forde RC, *et al*. Evidence for a previously unidentified upstream exon in the human oestrogen receptor gene. *J Mol Endocrinol*. 1991; 6: 111–115.

Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphisms of the estrogen receptor gene in post-menopausal women. *J Bone Miner Res*. 1996; 11: 306–311.

Koidis PT, Zarifi A, Grigoriadou E, Garefis P. Effect of age and sex on craniomandibular disorders. *J Prosth Dent*. 1993; 69(1): 93-101.

Korach KS: Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*. 1994, 266: 1524-1527.

Koshizuka Y, Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Seichi A, Takeshita K, *et al*. Distinct association of gene polymorphisms of estrogen receptor and vitamin D receptor with lumbar spondylosis in post-menopausal women. *Eur J Spine*. 2006; 15: 1521-1528.

Kuttila M, Niemi M, Kuttila S, Alanen P, Le Bell Y. TMD treatment in relation to age, gender, stress and diagnostic subgroup. *J Orofac Pain*. 1998; 12(1): 67-74.

Kusec V, Viridi AS, Prince R, Triffitt JT. Localization of estrogen receptor-alpha in human and rabbit skeletal tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Jul; 83(7): 2421-2428.

Landi N, Lombardi I, Manfredini D, Casarosa E, Biondi K, Gabannini M, *et al*. Sexual hormone serum levels and temporomandibular disorders. A preliminary study. *Gynecol Endocrinol*. 2005; 20(2): 99-103.

Langdahl BL, Lokke D, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J Bone Miner Res*. 2000 Nov; 15(11): 2222-2230.

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*. 2006; 35: 165-169.

LeResche L, Saunders K, Von Korff MR, Barrlow W, Dworkin SF. Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. *Pain*. 1997; 69: 153-160.

LeResche L, Mancl L, Sherman JJ, Gandara B, Dworkin SF. Changes in temporomandibular pain across the menstrual cycle. *Pain*. 2003; 106: 253-261.

LeResche L, Mancl LA, Drangsholt MT, Saunders K, Von Korff M. Relationship of pain and symptoms to pubertal development in adolescents. *Pain*. 2005; 118: 201-209.

Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao G, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, *et al*. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription,

supporting a “ying yang” relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol*. 2003; 17: 203–208.

Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, McDonald EB, Anderson JB, Clarke AC. Long-term prevention of post-menopausal osteoporosis by oestrogen: evidence for an increased bone mass after delayed onset of oestrogen treatment. *Lancet*. 1976; 1: 1038–1040.

Locker D & Slade G. Prevalence of symptoms associated with temporomandibular disorders in a Canadian population. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1988; 16(5): 310-313.

Lobbezoo F, Van Selms MK, John MT, Huggind K, Ohrbach R, Visscher CM, *et al*. Use of the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders for multinational research: translation efforts and reliability assessments in The Netherlands. *J Orofac Pain*. 2005; 19(4):301-308.

Loughlin J, Sinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, *et al*. Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2000; Mar; 27(3): 779-784.

Manfredini D, Segu M, Bertacci A, Binotti G, Bosco M. Diagnosis of temporomandibular disorders according to RDC/TMD axis I findings, a multicenter Italian study. *Minerva Stomatol*. 2004; 53(7-8): 429-438.

Milam SB, Aufdemorte TB, Sheridan PJ, Triplett RG, Van Sickels JE, Holt GR. Sexual dimorphism in the distribution of estrogen receptors in the temporomandibular joint complex of the baboon. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987; 64: 527-532.

Min HJ, Lee MJ, Kim JY, Cho SW, Park HD, Lee SI, Kim HJ, Jung HS. Alteration of BMP-4 and *Runx2* expression patterns in mouse temporomandibular joint after ovariectomy. *Oral Diseases*. 2007; 13: 220-227.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 1996; 392: 49-53.

Nekora-Azak A, Evlioglu G, Ceyhan A, Keskin H, Berkman S, Issever H. Estrogen replacement therapy among postmenopausal women and its effects on signs and symptoms of temporomandibular disorders. *Cranio*. 2008; 26(3): 211-215.

Ng MC, Harper RP, Le CT, Wong BS. Effects of estrogen on condylar cartilage of the rat mandible in organ culture. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999; 57: 818-823.

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, *et al*. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 243: 122–126.

Okuda T, Yasuoka T, Nakashima M, Oka N. The effect of ovariectomy on the temporomandibular joints of growing rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996; 54: 1201-1210.

Ongphiphahakaul B, Chanprasertyothin S, Payatikul P, Tung SS, Piaseu N, Chailurkit L, *et al*. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism affects response in bone mineral density to oestrogen in post-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 52(5): 581-585.

Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88: 6613–6617.

Pacifici R. Cytokines, estrogen and post-menopausal osteoporosis:the second decade. *Endocrinology*. 1998; 139: 2659–2661.

Pedroni CR, De Oliveira AS, Guaratini MI. Prevalence study of signs and symptoms of temporomandibular disorders in university students. *J Oral Rehabil*. 2003 Mar; 30(3): 283-289.

Pensler JM, Radosevich JA, Higbee R, Langman CB: Osteoclasts isolated from membranous bone in children exhibit nuclear estrogen and progesterone receptors. *J Bone Miner Res*. 1990; 5: 797-802.

Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*. 2000; 19: 4970–4978.

Piva R, Gambari R, Zorzato F, Kumar L, del Senno L. Analysis of upstream sequences of the human estrogen receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 183: 996–1002.

Piva R, Bianchi N, Aguiari GL, Gambari R, del Senno L. Sequencing of an RNA transcript of the human estrogen receptor gene: evidence for a new transcriptional event. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993; 46: 531–538.

Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *The EMBO J.* 1988; 7(11): 3385-3388.

Puri V, Chandrala S, Puri S, Daniel CG, Klein RM, Berman NEJ. Ghrelin is expressed in trigeminal neurons of female mice in phase with the estrous cycle. *Neuropeptides.* 2006; 40: 35-46.

Qin YJ, Zhang ZL, Huang QR, He JW, Hu YQ, Zhou Q, *et al.* Association of vitamin D receptor polymorphism with peak bone mass and bone size in Chinese women. *Acta Pharmacol Sin.* 2004. 25(4): 462-468.

Ribeiro, MC. Influência do polimorfismo genético no receptor α de estrógeno em mulheres com sinais e sintomas de desordem temporomandibular [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Riggs BL, Khosla S, Melton III LJ, A unitary model for involutinal osteoporosis: estrogen deficiency causes both types I and II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J. Bone Miner. Res.* 1998; 13: 763–773.

Sanguinetti CJ, Dias EN, Simpson, AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17:915-919.

Sapir-Koren R, Livshits G, Landsman T, Kobylansky E. Bone mineral density is associated with estrogen receptor gene polymorphism in men. *Anthropol Anz.* 2001; 59(4): 343-353.

Smith EP, Boyod J, Frank GR, Talahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS: Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1056-1061.

Stegenga B. Osteoarthritis of the temporomandibular joint organ and its relationship to disc displacement. *J Orofac Pain*. 2001; 15(3): 193-205.

Suenaga S, Abeyama K, Indo H, Shigeta K, Noikura T. Temporomandibular disorders: MR assessment of inflammatory changes in the posterior disk attachment during the menstrual cycle. *J Comput Assist Tomogr*. 2001; 25(3): 476-481.

Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. *J Prosthet Dent*. 1998 Jun; 79(6): 685-690.

Thompson DA, McPherson LA, Carmeci C, deConink EC, Weigel RJ. Identification of two estrogen receptor transcripts with novel 5' exons isolated from MCF7 cDNA library. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997; 62: 143-153.

Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Nishioka J, Onkubo I, Hukuda S. Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1998; 25: 134-137.

Ushiyama T, Mori K, Inoue K, Huang J, Nishioka J, Hukuda S. Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with age at onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1999; 58: 7-10.

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 Nov; 7(6): 560-566.

Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulesco G, Swarbrick P, Doyle DV, et al. Associations study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthr Rheum*. 2004; 50(8): 2497-2507.

Van Meurs JBJ, Schuit SCE, Weel AEAM, van der Klift M, Bergink AP, Arp PP, *et al*. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Gen*. 2003; 12(14): 1745-1754.

Von Korff M, Dworkin SF, LeResche L, Kruger A. An epidemiologic comparison of pain complaints. *Pain*. 1988; 32: 173-183.

Yamada Y, Ando F, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms of the estrogen receptor α gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. *J Mol Med*. 2002; 80: 452-460.

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 Oct; 274(2): 934-941.

Yun KI, Chae CH, Lee CW. Effect of estrogen on the expression of cytokines of the temporomandibular joint cartilage cells of the mouse. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 May; 66(5): 882-887.

Warren MP, Fried JL. Temporomandibular disorders and hormones in women. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169(3): 187-192.

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



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

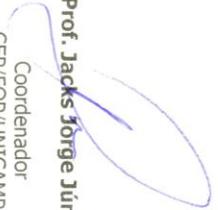


CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Correlação entre fatores clínicos, sistêmicos, genéticos e desordem temporomandibular", protocolo nº 134/2005, dos pesquisadores CAROLINA BERALDO MELOTO, AARÃO MENDES PINTO NETO, CÉLIA MARISA RIZZATTI BARBOSA, PRISCILA DE OLIVEIRA SERRANO e SERGIO ROBERTO PERES LINE, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 08/02/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Correlation among clinical, systemic and genetic factors and temporomandibular disorder", register number 134/2005, of CAROLINA BERALDO MELOTO, AARÃO MENDES PINTO NETO, CÉLIA MARISA RIZZATTI BARBOSA, PRISCILA DE OLIVEIRA SERRANO and SERGIO ROBERTO PERES LINE, 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 08/02/2006.


Prof. Cecilia Gatti Guirado
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. 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.

APÊNDICE 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Prontuário n° ____/____

"Correlação de fatores clínicos, sistêmicos, genéticos e desordem temporomandibular"

Eu, _____, _____ anos,
RG _____, endereço _____, n° _____,
bairro _____, cidade _____,
CEP _____ e telefone _____, fui convidada a
participar de uma pesquisa que visa analisar o papel do estrógeno e da genética relacionada
a ele nas dores provocadas por disfunção temporomandibular (DTM - uma alteração no
funcionamento da articulação da boca). Mulheres apresentam mais dores nas articulações do
que homens, o que parece estar relacionado aos seus hormônios sexuais (estrógeno, por
exemplo). Assim, caso se comprove esta relação, será possível identificar através do material
genético (DNA), mulheres com maior risco de desenvolverem essas dores nas articulações e
interferir de modo preventivo nessas mulheres para se evitar maiores complicações
dolorosas mais tarde. Para isso, serei avaliada através de um critério de diagnóstico para
pesquisa sobre DTM reconhecido mundialmente chamado Research Diagnostic Criteria for
Temporomandibular Disorders, que contém um questionário e exame de palpação dos
músculos do rosto e articulação da boca. Além disso, também doarei saliva através de
bochecho com água e açúcar para que seja possível a extração do material que avalia o fator
genético associado a DTM e, posteriormente, se faça o relacionamento da genética com a
DTM; declaro também, () *autorizar* / () *não autorizar* o armazenamento do meu DNA para
realização de pesquisas futuras. A sessão de avaliação será realizada em uma sala do próprio
ambulatório do CAISM, individualmente, e durará aproximadamente 15 minutos enquanto
guardo meu atendimento ginecológico. Caso não aceite participar desta pesquisa,
continuarei tendo acesso aos tratamentos oferecidos por este ambulatório, sem nenhum
prejuízo. Qualquer dúvida, poderei falar diretamente com a cirurgiã-dentista responsável
Carolina Beraldo Meloto no telefone (19) 21065295 ou com o Comitê de Ética desta
Faculdade pelo telefone (19) 3521-8936.

Declaro estar ciente e ter entendido o documento acima.

Data: ____/____/____,

Assinatura da paciente:

Assinatura da pesquisadora:

APÊNDICE 3

Data: ____/____/____

Prontuário n°: ____/200__

Nome: _____ Idade: _____

Menopausa: () sim () Natural () Cirúrgica Idade da menopausa _____ Está em TRH? () Não () Sim – _____ Há quanto tempo? _____ Tem osteoporose? () Não () Sim DMO _____	() não Está grávida? () Não () Sim Toma anticoncepcional? () Sim () Não – Parou há quanto tempo? _____ Possui ciclos menstruais regulares? () Não () Sim – Quantos dias? _____
--	--

Está tomando algum medicamento? () Não () Sim _____

Toma antidepressivo? () Não () Sim _____

Toma antiinflamatório? () Não () Sim _____

Tem histórico de neoplasia? () Não () Sim _____

Está com infecção/inflamação de ouvido? () Não () Sim

Está com dor de dente? () Não () Sim

Possui alguma das seguintes DESORDENS?

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Artrite reumatoide | <input type="checkbox"/> AO de ATM ou joelho |
| <input type="checkbox"/> Fibromialgia | <input type="checkbox"/> Diabetes |
| <input type="checkbox"/> Neuralgia do trigêmeo | <input type="checkbox"/> Síndrome de Eagle |

Sofre de algum distúrbio hormonal? () Não () Sim

Possui alguma outra doença/desordem sistêmica? () Não () Sim _____

Sofreu trauma na região da face recentemente? () Não () Sim

Suporte dental posterior? () Não () Sim

Oclusão Classe I de Angle? () Não () Sim

EXCLUÍDA () INCLUÍDA () – Grupo: _____

APÊNDICE 4

Crêterios de Diagnóstico para Pesquisa das Desordens Temporomandibulares RDC / DTM

**Editado por
Francisco J. Pereira Jr. – DDS, MS, PhD**

**Colaboradores
Kimberly H. Huggins – RDH, BS
Samuel F. Dworkin – DDS, PhD**

Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders
Edited by: Samuel F. Dworkin, DDS, PhD and Linda LeResche, ScD
(see language translation at website: RDC-TMDinternational.org)

**Back-translation
Eduardo Favilla, DDS Revised November 12, 2008**

História – Questionário

Favor ler cada pergunta e responder de acordo. Para cada pergunta abaixo, circule somente uma resposta.

Você diria que a sua saúde em geral é excelente, muito boa, boa, razoável, ou precária?

- Excelente 1
- Muito boa 2
- Boa 3
- Razoável 4
- Precária 5

Você diria que a sua saúde oral em geral é excelente, muito boa, boa, razoável, ou precária?

- Excelente 1
- Muito boa 2
- Boa 3
- Razoável 4
- Precária 5

Você já teve dor na face, nos maxilares, têmpora, na frente do ouvido, ou no ouvido no mês passado?

- Não 0
- Sim 1

[Em caso de Não ter tido dor no mês passado, PULE para a pergunta 14]

Se a sua resposta foi Sim,

4.a. Há quantos anos atrás a sua dor facial começou pela primeira vez?

__ __ anos

[Se há um ano atrás ou mais, PULE para a pergunta 5]

[Se há menos de um anos atrás, marque 00]

4.b. Há quantos meses atrás a sua dor facial começou pela primeira vez?

__ __ meses

5. A sua dor facial é persistente, recorrente, ou foi um problema que ocorreu somente uma vez?

- Persistente 1
- Recorrente 2
- Uma vez 3

6. Você alguma vez já foi a um médico, dentista, quiroprático ou outro profissional de saúde devido a dor facial ?

Não 1

Sim, nos últimos seis meses 2

Sim, há mais de seis meses atrás 3

7. Como você classificaria a sua dor facial em uma escala de 0 a 10 no presente momento, isto é exatamente agora, onde 0 é “sem dor” e 10 é a “pior dor possível” ?

Sem dor 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 A pior dor possível

8. Nos últimos seis meses, qual foi a intensidade da sua pior dor, classificada pela escala de 0 a 10, onde 0 é “sem dor” e 10 é a “pior dor possível” ?

Sem dor 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 A pior dor possível

9. Nos últimos seis meses, em média, qual foi a intensidade da sua dor, classificada pela escala de 0 a 10, onde 0 é “sem dor” e 10 é a “pior dor possível” ? [Isto é, sua dor usual nas horas que você estava sentindo dor].

Sem dor 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 A pior dor possível

10. Aproximadamente quantos dias nos últimos 6 meses você esteve afastado de suas atividades usuais (trabalho, escola, serviço doméstico) devido a dor facial ?

_____ dias

11. Nos últimos 6 meses, o quanto esta dor facial interferiu com suas atividades diárias de acordo com uma escala de 0 a 10, onde 0 é “nenhuma interferência” e 10 é “incapaz de realizar qualquer atividade” ?

Nenhuma interferência 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Incapaz de realizar qualquer atividade

12. Nos últimos 6 meses, o quanto esta dor facial alterou a sua capacidade de participar de atividades recreativas, sociais e familiares onde 0 é “nenhuma alteração” e 10 é “alteração extrema” ?

Nenhuma alteração 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Alteração extrema

13. Nos últimos 6 meses, o quanto esta dor facial alterou a sua capacidade de trabalhar (incluindo serviço domésticos) onde 0 é “nenhuma alteração” e 10 é “alteração extrema” ?

Nenhuma alteração 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Alteração extrema

14.a. Você alguma vez teve travamento articular de forma que não foi possível abrir a boca por todo o trajeto?

Não 0

Sim 1

[se nunca apresentou este tipo de problema, PULE para a pergunta 15]

Se a sua resposta foi Sim.

14.b. Esta limitação de abertura mandibular foi severa a ponto de interferir com a sua capacidade de mastigar?

Não 0

Sim 1

15.a. Os seus maxilares estalam quando você abre ou fecha a boca ou quando você mastiga?

Não 0

Sim 1

15.b. Os seus maxilares crepitam quando você abre e fecha ou quando você mastiga?

Não 0

Sim 1

15.c. Alguém lhe disse, ou você nota, se você range os seus dentes ou aperta os seus maxilares quando dorme a noite?

Não 0

Sim 1

15.d. Durante o dia, você range os seus dentes ou aperta os seus maxilares?

Não 0

Sim 1

15.e. Você sente dor ou rigidez nos seus maxilares quando acorda de manhã?

Não 0

Sim 1

15.f. Você apresenta ruídos ou zumbidos nos seus ouvidos?

Não 0

Sim 1

15.g. Você sente a sua mordida desconfortável ou incomum?

Não 0

Sim 1

16.a. Você tem artrite reumatóide, lúpus, ou qualquer outra doença artrítica sistêmica?

Não 0

Sim 1

16.b. Você conhece alguém na sua família que tenha qualquer uma destas doenças?

Não 0

Sim 1

16.c. Você já apresentou ou apresenta inchaço ou dor em qualquer das articulações que não sejam as articulações perto dos seus ouvidos (ATM)?

Não 0

Sim 1

[em caso de Não ter tido inchaço ou dor nas articulações, PULE para a pergunta 17.a.]

Se a sua resposta foi Sim,

16.d. É uma dor persistente que você vem tendo por pelo menos um ano?

Não 0

Sim 1

17.a. Você teve alguma injúria recente contra sua face ou seus maxilares?

Não 0

Sim 1

[em caso de Não ter tido injúria, pule para a pergunta 18]

Se sua resposta foi Sim,

17.b. Você teve dor nos maxilares antes da injúria?

Não 0

Sim 1

18. Durante os últimos 6 meses você teve dor de cabeça ou enxaquecas?

Não 0

Sim 1

19. Que atividades o seu problema atual dos maxilares impedem ou limitam?

a. Mastigar

Não 0

Sim 1

b. Beber

Não 0

Sim 1

c. Exercitar-se

Não 0

Sim 1

d. Comer alimentos duros

Não 0

Sim 1

e. Comer alimentos moles

Não 0

Sim 1

f. Sorrir/gargalhar

Não 0

Sim 1

g. Atividade sexual

Não 0

Sim 1

h. Limpar os dentes ou a face

Não 0

Sim 1

i. Bocejar

Não 0

Sim 1

j. Engolir

Não 0

Sim 1

k. Conversar

Não 0

Sim 1

l. Manter a sua aparência facial usual

Não 0

Sim 1

20. No último mês, o quanto você tem estado angustiado por:

a. Dores de cabeça

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

b. Perda de interesse ou prazer sexual

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

c. Fraqueza ou tontura

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

d. Dores no coração ou peito

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

e. Sensação de falta de energia ou lerteza

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

f. Pensamentos sobre morte ou relacionados ao ato de morrer

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

g. Falta de apetite

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

h. Chorar facilmente

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

i. Culpar a si mesmo pelas coisas

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

j. Dores na parte inferior das costas

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

k. Sentir-se só

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

l. Sentir-se triste

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

m. Preocupar-se muito com as coisas

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

n. Sentir nenhum interesse pelas coisas

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

o. Náusea ou distúrbio gástrico

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

p. Músculos doloridos

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

q. Dificuldade em adormecer

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

r. Dificuldade em respirar

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

s. Acessos calor / frio

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

t. Dormência ou formigamento em partes do corpo

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

u. Inchaço/protuberância na sua garganta

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

v. Sentir-se desanimado sobre o futuro

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

w. Sentir-se fraco em partes do corpo

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

x. Sensação de peso nos braços ou pernas

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

y. Pensamentos sobre acabar com a sua vida

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

z. Comer demais

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

aa. Acordar de madrugada

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

bb. Sono agitado ou perturbado

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

cc. Sensação de que tudo é um esforço/sacrifício

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

dd. Sentimentos de inutilidade

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

ee. Sensação de ser enganado ou iludido

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

ff. Sentimentos de culpa

Nem um pouco	Um pouco	Moderadamente	Muito	Extremamente
0	1	2	3	4

21. Como você classificaria os cuidados que tem tomado para com a sua saúde de uma forma geral?

Excelente 1
Muito bom 2
Bom 3
Satisfatório 4
Insatisfatório 5

22. Como você classificaria os cuidados que tem tomado para com a sua saúde oral?

Excelente 1
Muito bom 2
Bom 3
Satisfatório 4
Insatisfatório 5

23. Quando você nasceu?

Dia ___ Mês ___ Ano ___

24. Sexo masculino ou feminino?

Masculino ----- 1
Feminino ----- 2

25. Qual dos grupos abaixo melhor representa a sua raça?

Aleútas, Esquimó ou Índio Americano 1
Asiático ou Insulano Pacífico 2
Negro 3
Branco 4
Outro 5 _____
(favor especificar)

26. Alguns destes grupos representa a sua origem nacional ou ancestralidade?

Porto Riquenho 1
Cubano 2
Mexicano 3
Mexicano Americano 4
Chicano 5
Outro Latino Americano 6
Outro Espanhol 7
Nenhum acima 8

27. Qual o seu grau de escolaridade mais alto ou último ano de escola que você completou?

Nunca frequentou a escola / jardim de infância 00

Escola Primária 1 2 3 4

Escola Ginásial 5 6 7 8

Científico 9 10 11 12

Faculdade 13 14 15 16 17 18+

28a. Durante as últimas 2 semanas, você trabalhou no emprego ou negócio não incluindo trabalho em casa (inclui trabalho não remunerado em negócios/fazenda da família)?

Não 0

Sim 1

[Se a sua resposta foi Sim, pule para a pergunta 29]

Se a sua resposta foi Não,

28b. Embora você não tenha trabalhado nas duas últimas semanas, você tinha um emprego ou negócio?

Não 0

Sim 1

[Se a sua resposta foi Sim, PULE para a pergunta 29]

Se a sua resposta foi Não,

28c. Você estava procurando emprego ou de dispensa, durante aquelas duas semanas?

Sim, procurando emprego 1

Sim, de dispensa 2

Sim, ambos de dispensa e procurando emprego 3

Não 4

29. Qual o seu estado civil?

Casado (a) – esposa (o) em casa 1

Casado (a) – esposa (o) fora de casa 2

Viúvo (a) 3

Divorciado (a) 4

Separado (a) 5

Nunca casei 6

30. Qual a sua foi a sua renda doméstica durante os últimos 12 meses?

R\$ _____.____,___ (Reais, moeda brasileira)

Não preencher. Deverá ser preenchido pelo profissional

- US\$ 0 – US\$ 14,999
- US\$ 15,000 – US\$ 24,999
- US\$ 25,000 – US\$ 34,999
- US\$ 35,000 – US\$ 49,999
- US\$ 50,000 ou mais

31. Qual o seu CEP ? _____ - ____

5. Ruídos articulares (palpação)

a. abertura

	Direito	Esquerdo
Nenhum	0	0
Estalido	1	1
Crepitação grosseira	2	2
Crepitação fina	3	3

Medida do estalido na abertura ___ ___ mm ___ ___ mm

b. Fechamento

	Direito	Esquerdo
Nenhum	0	0
Estalido	1	1
Crepitação grosseira	2	2
Crepitação fina	3	3

Medida do estalido de fechamento ___ ___ mm ___ ___ mm

c. Estalido recíproco eliminado durante abertura protrusiva

	Direito	Esquerdo
Sim	0	0
Não	1	1
NA	8	8

6. Excursões

- a. Excursão lateral direita ___ ___ mm
- b. Excursão lateral esquerda ___ ___ mm
- c. Protrusão ___ ___ mm

Tabela abaixo: Para os itens “a”, “b” e “c”

DOR MUSCULAR				DOR ARTICULAR			
nenhuma	direito	esquerdo	ambos	nenhuma	direito	esquerdo	ambos
0	1	2	3	0	1	2	3
0	1	2	3	0	1	2	3
0	1	2	3	0	1	2	3

d. Desvio de linha média ___ ___ mm

direito	esquerdo	NA
1	2	8

7. Ruídos articulares nas excursões

Ruídos direito

	nenhum	estalido	Crepitação grosseira	Crepitação leve
Excursão Direita	0	1	2	3
Excursão Esquerda	0	1	2	3
Protrusão	0	1	2	3

Ruídos esquerdo

	nenhum	estalido	Crepitação grosseira	Crepitação leve
Excursão Direita	0	1	2	3
Excursão Esquerda	0	1	2	3
Protrusão	0	1	2	3

INSTRUÇÕES, ÍTENS 8-10

O examinador irá palpar (tocando) diferentes áreas da sua face, cabeça e pescoço. Nós gostaríamos que você indicasse se você não sente dor ou apenas sente pressão (0), ou dor (1-3). Por favor, classifique o quanto de dor você sente para cada uma das palpações de acordo com a escala abaixo. Circule o número que corresponde a quantidade de dor que você sente. Nós gostaríamos que você fizesse uma classificação separada para as palpações direita e esquerda.

0 = Sem dor / somente pressão

1 = dor leve

2 = dor moderada

3 = dor severa

8. Dor muscular extra-oral com palpação

	DIREITO	ESQUERDO
a. Temporal (posterior) “parte de trás da têmpora”	0 1 2 3	0 1 2 3
b. Temporal (médio) “meio da têmpora”	0 1 2 3	0 1 2 3

c. Temporal (anterior) “parte anterior da têmpora”	0 1 2 3	0 1 2 3
d. Masseter (superior) “bochecha/abaixo do zigoma”	0 1 2 3	0 1 2 3
e. Masseter (médio) “bochecha/lado da face”	0 1 2 3	0 1 2 3
f. Masseter (inferior) “bochecha/linha da mandíbula”	0 1 2 3	0 1 2 3
g. Região mandibular posterior (estilo-hióide/região posterior do digástrico) “mandíbula/região da garganta”	0 1 2 3	0 1 2 3
h. Região submandibular (pterigoide medial/supra-hióide/região anterior do digástrico) “abaixo do queixo”	0 1 2 3	0 1 2 3
9. Dor articular com palpação		
	DIREITO	ESQUERDO
a. Polo lateral “por fora”	0 1 2 3	0 1 2 3
b. Ligamento posterior “dentro do ouvido”	0 1 2 3	0 1 2 3
10. Dor muscular intra-oral com palpação		
	DIREITO	ESQUERDO
a. Área do pterigoide lateral “atrás dos molares superiores”	0 1 2 3	0 1 2 3
b. Tendão do temporal “tendão”	0 1 2 3	0 1 2 3