



**LUANA MARIA MARTINS DE AQUINO**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO 118A>G NO GENE RECEPTOR  
μ-OPIÓIDE EM DESARRANJO INTERNO DA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR E FIBROMIALGIA**

PIRACICABA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**LUANA MARIA MARTINS DE AQUINO**

ANÁLISE DE POLIMORFISMO 118A>G NO GENE RECEPTOR  
 $\mu$ -OPIÓIDE EM DESARRANJO INTERNO DA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR E FIBROMIALGIA

Orientadora: Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTORA EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA, NA  
ÁREA DE PRÓTESE DENTAL

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

---

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA, 2012

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

Aq56a Aquino, Luana Maria Martins de, 1983-  
Análise de polimorfismo 118A>G no gene receptor  $\mu$ -opióide em desarranjo interno da articulação temporomandibular e fibromialgia / Luana Maria Martins de Aquino. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Disfunção temporomandibular. 2. Genótipo. 3. Dor. I. Rizzatti-Barbosa, Celia Marisa, 1957- II. Line, Sérgio Roberto Peres, 1963- III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Analysis of polymorphism 118A>G in the  $\mu$ -opioid receptor gene in internal disarrangement of the temporomandibular joint and fibromyalgia

**Palavras-chave em Inglês:**

Temporomandibular Disorder

Genotype

Pain

**Área de concentração:** Prótese Dental

**Titulação:** Doutora em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Célia Marisa Rizzatti Barbosa [Orientador]

Jarbas Francisco Fernandes dos Santos

Rubens Nelson Amaral de Assis Reimão

José Ranali

Rafael Leonardo Xediek Consani

**Data da defesa:** 26-10-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba




A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 26 de Outubro de 2012, considerou a candidata LUANA MARIA MARTINS DE AQUINO aprovada.



---

Profa. Dra. CELIA MARISA RIZZATTI BARBOSA



---

Prof. Dr. JARBAS FRANCISCO FERNANDES DOS SANTOS



---

Prof. Dr. RUBENS NELSON AMARAL DE ASSIS REIMÃO



---

Prof. Dr. JOSÉ RANALI



---

Prof. Dr. RAFAEL LEONARDO XEDIEK CONSANI

## **DEDICO ESTE TRABALHO**

A **Deus**, que guiou meus passos até a concretização deste título. Ele que está sempre presente na minha vida, me ajudando nos momentos difíceis e também me enchendo de bençãos.

Aos meus pais, **Marcos e Jane**, que sempre fizeram de tudo para educação e formação de seus filhos. Pelo exemplo de luta e dedicação. Amo demais. A vocês, meu eterno agradecimento!

Aos meus irmãos, **Marcos e Luciana**, por sempre torcerem pelo meu sucesso, e por estarem sempre presentes em minha vida!

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora **Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa**, por ter sido muito mais do que uma orientadora, mas principalmente pela amizade e confiança. Um exemplo de vida e de profissional que vou levar comigo para onde eu for. Sou muito feliz por ter sido orientada por você;

Ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line**, co-orientador deste trabalho, que me acolheu em seu Departamento de Morfologia, possibilitando o desenvolvimento da desta pesquisa no laboratório de Biologia Molecular.

À amiga **Carolina Beraldo Meloto**, que me ensinou muito e me fez gostar de Biologia Molecular, e sem a qual não teria conseguido terminar essa tese. Além de professora nesta área, muito obrigada por ter sido uma grande amiga. Espero que esta amizade não se acabe. Obrigada pelo carinho, conselhos e confiança.

À toda **minha família**, que sempre vibraram com minhas vitórias, estão sempre orando por mim e que sentem saudades pela distância.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas por meio do seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**;

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**;

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Márcio de Moraes**;

Aos **Profs. Drs. Altair Antoninha Del Bel Cury, Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, Wander José da Silva** da área de Prótese Parcial Removível, por todos os ensinamentos, atenção e carinho.

A todos os meus mestres, que me orientaram na formação ao longo da Pós-Graduação;

Às amigas de infância, **Larissa Elaine Dantas de Araújo e Lívia Pereira Nepomuceno**. Amizade que nem a distância ou a falta de tempo foi capaz de nos afastar. O amor que existe nessa amizade é verdadeiro e eterno. Obrigada por serem minhas amigas;

Às amigas de Piracicaba, **Ana Paula Martins, Celina Wanderley e Milene Oliveira**, pela amizade de vocês. Meu muito obrigada por ter me ajudado a suportar a distância da família, pois com vocês meu dias em Piracicaba foram muito mais divertidos. Obrigada por tudo;

A **Vinicius Martins**, por ter sido um companheiro e estar sempre ao meu lado, me fortalecendo nos momentos difíceis. E também aos seus pais, **Ernani e Emília Martins**, que me acolheram em sua família e também por torcerem pelo meu sucesso;

À **Gislaine Piton**, técnica do laboratório de Prótese Parcial Removível, que sempre nos ajudou dentro e fora do laboratório e foi capaz de tornar tão agradáveis os longos dias de trabalho e carinhosamente aconselhou nos momentos difíceis;

Aos amigos e colegas do laboratório de Prótese Parcial Removível: **Alfonso Sanchez Ayala, Ana Paula Martins, Andrea Araújo, Antônio Pedro Ricomini, Arcelino Neto, Bruno Sotto Maior, Camila Campos, Carolina Meloto, Frederico Fernandes, Germana Camargos, Gisele Ribeiro, Indira Cavalcanti, Larissa Vilanova, Leticia Gonçalves, Marcele Pimentel, Plínio Senna, Priscila Gomes, Priscilla Lazzari, Sheila Porta, Silvia Lucena, Thais Gonçalves e William Custódio**, pelo convívio e amizade;

À **Maisa Soares Gui**, que participou desta pesquisa, e juntas viajamos para São Paulo para atender as voluntárias desta pesquisa e que muitas vezes arcou com as despesas destas viagens. Obrigada por ser muito mais que uma co-autora, mas também pela amizade;

À **Brunna Moreira e Leticia Nóbrega**, pelo companheirismo e convivência durante todos esses anos em Piracicaba;

Aos professores e colegas do laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por me acolherem, pela ajuda e por esclarecerem minhas dúvidas;

Aos **Profs. Drs. Maria Beatriz Duarte Gavião, Wander José da Silva, Marcelo Rocha Marques**, por terem participado do exame de qualificação desta tese e por terem contribuído com sugestões para o aprimoramento deste trabalho;

Aos **Profs Dr. Jarbas Francisco Fernandes dos Santos, Rubens Nelson Amaral de Assis Reimão, José Ranali e Rafael Leonardo Xediek Consani**, por terem participado da defesa desta tese de Doutorado e pelas contribuições feitas à este trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

A todas as mulheres que se voluntariaram a participar desta pesquisa.



“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

---

As disfunções temporomandibulares (DTM), assim como a fibromialgia (FM), são síndromes caracterizadas por dor crônica. A variabilidade individual da dor nestas síndromes pode estar associada à alterações individuais no complexo sistema de recepção do estímulo nociceptivo, como a capacidade reduzida da fibra nervosa em recrutar controles opióides endógenos inibidores da dor. O receptor  $\mu$ -opióide (RMO) é codificado pelo gene *OPRM1* que representa o principal alvo de opióides endógenos e exógenos, sendo capaz de mediar a nocicepção basal. Mutações no gene *OPRM1*, como o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) 118A>G (rs1799971), promovem alterações em aminoácidos da proteína receptora e podem afetar sua expressão. No primeiro capítulo desta tese, foi revisada a literatura com o intuito de investigar a comorbidade entre DTM e FM. Nos capítulos seguintes o SNP 118A>G no gene receptor  $\mu$ -opióides (*OPRM1*) foi identificado em indivíduos sintomáticos e assintomáticos apresentando desarranjos internos da articulação temporomandibular (DI-ATM), em pacientes portadores de fibromialgia, e em indivíduos saudáveis; e foi investigado se a presença do alelo G está associada ou não ao fenótipo de dor crônica. No capítulo 2 foi realizado um estudo caso-controle com 529 mulheres que foram divididas em 3 grupos: controle (mulheres saudáveis) (n=190); DI-ATM sem dor (n=164); DI-ATM com dor crônica (n=175). No capítulo 3, foram selecionadas 66 mulheres saudáveis (grupo controle) e 41 mulheres portadoras de fibromialgia. Para análise do polimorfismo, o DNA genômico foi coletado de cada voluntária a partir de bochechos com solução de glicose a 3%. O fragmento de interesse foi amplificado através da reação de polimerase em cadeia (PCR) e os alelos foram identificados usando a enzima de restrição específica *DpnII* por 1 hora a 37°C. Baseado nas evidências geradas por estes trabalhos pode-se concluir que a DTM está frequentemente presente em pacientes portadores de FM; e que o polimorfismo 118A>G não está associado ao fenótipo de dor crônica em pacientes com desarranjos internos da articulação temporomandibular e em pacientes com fibromialgia.

Palavras-chave: Disfunção temporomandibular, Opióides, Genótipo, Fibromialgia, Dor.

## ABSTRACT

---

Temporomandibular disorders (TMD) and fibromyalgia (FM) are characterized by chronic pain. Individual pain variability in these syndromes can be associated with individual changes in the complex system of reception of nociceptive stimuli, such as reduced ability in recruiting controls endogenous opioid pain inhibitors. The  $\mu$ -opioid receptor (MOR) is encoded by the *OPRM1* gene and it is the main target of exogenous and endogenous opioids able to mediate basal nociception. Mutation in *OPRM1* such as single nucleotide polymorphism (SNP) 118A>G (rs1799971), promotes amino acid changes in the receptor protein, and can alter their expression. In the first paper we reviewed the literature in order to investigate the comorbidity between TMD and FM. In the following chapters, the SNP 118A>G in the  $\mu$ -opioid receptor gene (*OPRM1*) was identified in symptomatic and asymptomatic subjects presenting temporomandibular joint internal disarrangement (TMJ-DI), fibromyalgia patients and healthy subjects, and was investigated whether the presence of the G allele is associated or not with chronic pain phenotype. In chapter 2 we performed a case-control study with 529 women who were divided into 3 groups: control (healthy women) (n=190); TMJ-ID without pain (n=164); TMJ-ID with chronic pain (n=175). In chapter 3, we selected 66 healthy women (control group) and 41 women with fibromyalgia. For polymorphism analysis, genomic DNA was collected from each volunteer from mouthwash solution of 3% glucose. The fragment of interest was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and alleles were identified using specific restriction enzyme *DpnII* for 1 hour at 37 ° C. Based on the evidences by these works, we concluded that TMD is often present in patients with FM; and that the polymorphism 118A>G is not associated with the phenotype of chronic pain in patients with internal derangements of the temporomandibular joint and in patients with fibromyalgia.

**Key Words:** Temporomandibular Disorder, Opioid, Genotype, Fibromyalgia, Pain.

## SUMÁRIO

---

|  |    |
|--|----|
| INTRODUÇÃO _____   | 1  |
| CAPÍTULO 1: <i>Disfunção Temporomandibular na Fibromialgia: Uma Visão Crítica.</i> _____   | 6  |
| CAPÍTULO 2: <i>Association between SNP 118A&gt;G in the OPRM1 gene and chronic symptomatic TMJ internal disarrangements.</i> _____ | 24 |
| CAPÍTULO 3: <i>OPRM1 118A&gt;G polymorphism and chronic pain in fibromyalgia.</i> _____  | 38 |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS _____   | 48 |
| CONCLUSÕES _____   | 49 |
| REFERÊNCIAS _____  | 50 |
| ANEXOS _____   | 57 |

## INTRODUÇÃO

---

Disfunção temporomandibular (DTM) é uma síndrome que envolve as articulações temporomandibulares (ATM), músculos, terminações nervosas e ligamentos da região de cabeça, pescoço e face. Os principais sinais e sintomas são: dor nas estruturas envolvidas, ruídos articulares e restrição, desvios ou deflexão nos movimentos mandibulares (Dworkin & LeResche, 1992).

A prevalência da DTM é maior em pessoas entre as idades de 20 e 40 anos, e ocorre mais frequentemente em mulheres do que em homens. 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 elas correspondem aproximadamente a 80% dos pacientes tratados para DTM (Dworkin *et al.*, 1990).

As DTMs são responsáveis pela maioria das dores crônicas orofaciais, o que motiva os pacientes a buscar tratamento. A prevalência de DTM relacionada com dor crônica é estimada em 10 a 25%, embora esta estimativa varia bastante entre estudos epidemiológicos (Dworkin, 2011). Em estudo multicêntrico de Manfredini *et al.* (2010), 74,5% dos pacientes com DTM apresentam dor crônica, por pelo menos 6 meses.

A etiopatogenia da DTM é complexa e multifatorial. Fatores de risco propostos para DTM incluem trauma articular e muscular, fatores anatômicos, perfil psicossocial e sensibilização das vias nociceptivas, fatores ambientais e genéticos. Devido a natureza multifatorial da DTM, sugere-se que um número de diferentes *loci* genéticos possam desempenhar algum papel, cada um deles contribuindo com pequeno efeito, que interagem com exposições ambientais para determinar o curso e o resultado das desordens (Smith *et al.*, 2011). Muitos autores têm examinado a base genética da DTM através de variantes genéticas associadas com a probabilidade de acometimento de DTM crônica e o risco de desenvolvimento de DTM (Herken *et al.*, 2001; Diatchenko *et al.*, 2005; Diatchenko *et al.*, 2006; Ojima *et al.*, 2007; Nackley & Diatchenko, 2010).

Com base no conhecimento prévio dos mecanismos de dor crônica, existe a hipótese que a patogênese da DTM pode resultar de distúrbios em catecolaminas, serotoninas, opióides e vias de citocinas (Belfer *et al.*, 2004; Diatchenko *et al.*, 2007). E

estudos recentes mostraram que fatores hereditários relacionados a mecanismos de dor desempenham papel tanto na dor experimental, bem como em grande variedade de condições clínicas de dor. Os estudos relatam hereditariedade substancial em distúrbios da dor relacionados com DTM, tais como fibromialgia (Markkula *et al.*, 2009), dor de cabeça (Larsson *et al.*, 1995; Mulder *et al.*, 2003) e dor no pescoço (Fejer *et al.*, 2003).

A fibromialgia (FM) é uma síndrome reumática, caracterizada por dor musculoesquelética crônica e difusa. É determinada pela palpação dolorosa de 11 dentre 18 pontos anatomicamente específicos, chamados *tender points*, e presença de dor generalizada por todo o corpo por no mínimo 3 meses (Wolf *et al.*, 1990). Frequentemente estão associados outros sintomas, como a fadiga, distúrbios do sono, rigidez matinal e distúrbios psicológicos, como a ansiedade e depressão (Marques *et al.*, 2002).

Esta síndrome apresenta prevalência em até 10,5% da população (Forseth & Gran, 1993), numa faixa etária de 40 a 60 anos, podendo ocorrer também na infância e na terceira idade. É mais prevalente em mulheres do que em homens, numa proporção de aproximadamente 3:1 (White *et al.*, 1999).

A etiologia da FM ainda permanece desconhecida. Porém parece estar associada a um processamento sensorial central anormal, e disfunção psico-neuro-endócrino (Bennett, 1999; Staud, 2008; Vierck, 2006; Wallace *et al.*, 2001).

A disfunção temporomandibular crônica e a fibromialgia podem ter semelhanças nas características clínicas e nos mecanismos periféricos e centrais da dor. Estas condições crônicas de dor podem ser em parte explicadas por uma função diminuída em inibir a dor pelos sistemas centrais, contribuindo assim para sensibilidade aumentada e persistência do processo doloroso. Um destes é o sistema opióide endógeno, mecanismo capaz de atuar na sensibilidade à dor (Staud, 2008).

O sistema opióide endógeno está relacionado à analgesia através da liberação de opióides endógenos, os neuropeptídeos: encefalinas, endorfinas e dinorfinas, mediados pelo sistema nervoso central. Os opióides modulam a transmissão neuronal sensorial primária através da ligação dos peptídeos opióides endógenos aos seus receptores nos gânglios da raiz dorsal, nos terminais centrais de neurônios aferentes primários, ou nas fibras nervosas periféricas (Kajii *et al.*, 2005).

Os receptores opióides  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  são pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G, e agem inibindo adenilil ciclase, conseqüentemente diminuindo a concentração intra-celular de AMPc. Estes receptores também exercem efeitos sobre canais iônicos através de um acoplamento da proteína G ao canal. Através desse mecanismo, os opióides e seus receptores levam a uma potente analgesia pela diminuição do influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) através dos canais de  $\text{Ca}^{++}$  sensíveis a voltagem. Como o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  é necessário para o acoplamento estímulo-secreção de liberação de neurotransmissor, os opióides reduzem a liberação dos neurotransmissores, como a substância P e o glutamato, das terminações nociceptivas, atenuando, assim, a transmissão de informação nociceptiva na primeira sinapse central, além de induzirem uma atividade antiinflamatória adicional. Os opióides também aumentam a condutância do potássio ( $\text{K}^+$ ) e por conseguinte, produzem uma relativa hiperpolarização dos neurônios pós-sinápticos, tornando-os relativamente mais difíceis de excitar (Kyrkanides *et al.*, 2007).

Os receptores opióides estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central em regiões como tálamo, córtex cerebral, amígdala, núcleo *accumbens*, substância negra, formação reticular e substância cinzenta periaquedutal mesencefálica e medula espinhal. Além da presença no SNC, receptores opióides têm sido detectados na porção periférica das fibras nervosas aferentes primárias, em terminais distais das fibras C e em células do sistema imune, como linfócitos T e B e em monócitos/macrófagos (Yaksh, 1999).

A presença de opióides endógenos em tecidos periféricos tem sido reconhecida. Estudos examinando o envolvimento de opióides exógenos na modulação periférica da dor temporomandibular suportam a existência de receptores opióides periféricos na ATM (Arthuri *et al.*, 2005). Opióides endógenos, como a  $\beta$ -endorfina, foram encontrados no líquido sinovial e em tecidos articulares de pacientes com artrite reumatóide (Yoshino *et al.*, 1992). Concentrações maiores de neuropeptídeos também foram observadas nos tecidos articulares e líquido sinovial da ATM em indivíduos portadores de DTM em comparação a indivíduos assintomáticos. Isto confirma que alguns opióides e seus receptores estão presentes em maior concentração em pacientes com dor e disfunção da ATM (Kajii *et al.*, 2005).

Os receptores  $\mu$  opióides (RMO) são os responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opióides e por alguns dos mais importantes efeitos colaterais, como depressão respiratória, euforia, dependência física e sedação. A maioria dos analgésicos opióides possuem alta afinidade por esse receptor, como por exemplo, a morfina (Lötsch & Geisslinger, 2005).

O RMO é codificado pelo gene *OPRM1* e é o principal alvo de opióides endógenos e exógenos, sendo capaz de mediar a nocicepção basal. Estudos realizados com animais e humanos indicam que polimorfismos genéticos (mutações que ocorrem na população com prevalência maior que 1%) no gene humano *OPRM1* são os primeiros candidatos à fonte clinicamente relevante de variabilidade interindividual na nocicepção basal (Matthes *et al.*, 1996; Sora *et al.*, 1997; Mogil, 1999; Uhl *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2004; Lötsch & Geisslinger, 2005; Edwards *et al.*, 2006). Além disso, existe também uma considerável variabilidade interindividual na resposta clínica aos opióides analgésicos, indicando que variações no gene *OPRM1* podem estar ligadas às diferentes afinidades entre agonistas e receptores. Como exemplo, a concentração mínima efetiva de opióides analgésicos, tais como morfina, petidina, alfentanil e sufentanil, varia entre pacientes. Dessa forma, surge também a hipótese de que polimorfismos genéticos neste gene respondem pela diferença na sensibilidade aos opióides (Shabalina *et al.*, 2009).

Inúmeras variações no gene *OPRM1* encontradas no cromossomo 6q24-q25 já foram identificadas em suas regiões codificantes, intrônicas e promotoras (Lötsch & Geisslinger, 2005). Estas mutações causam desde alterações de aminoácidos na proteína receptora, a *splicing* alternativo no quarto éxon, que resultam em variações alternativas do receptor ou no RNAm, codificando formas alternativas do mesmo, que diferem em seus resíduos de aminoácidos carboxi-terminal (LaForge *et al.*, 2000; Hoehe *et al.*, 2000).

Dentre estas variações, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) 118A>G (rs1799971), no primeiro éxon do gene *OPRM1*, ocorre com frequência relativamente alta (10,5-18,8%), fazendo deste um marcador genético em potencial. Esta alteração na sequência predita provoca mudança do aminoácido na posição 40 da proteína RMO de asparagina para aspartato (N40D; Asn40Asp) (Lötsch & Geisslinger, 2005). Esta substituição remove um sítio de glicosilação putativo



filogeneticamente conservado do domínio N-terminal extracelular do receptor (Bond *et al.*, 1998), e, como consequências terapêuticas, diversos estudos mostraram que o alelo 118G resulta em analgesia opióide menos efetiva (Skarke *et al.*, 2003; Klepstad *et al.*, 2004; Romberg *et al.*, 2005; Chou *et al.*, 2006; Campa *et al.*, 2008; Oertel *et al.*, 2009; Liu & Wang, 2012). Este SNP também foi associado com abuso de substâncias, como álcool e heroína (Tan *et al.*, 2003; Lerman *et al.*, 2004; Koller *et al.*, 2012) e a outros transtornos psiquiátricos e neurológicos, como epilepsia e esquizofrenia (Ohmori *et al.*, 2001; Wilkie *et al.*, 2002).

No que diz respeito à terapia da dor, a significância deste SNP pode estar situada tanto no aumento da demanda de opióides para atingir analgesia, como na proteção contra a toxicidade opióide, resultando num amplo leque de alternativas terapêuticas para os opióides analgésicos; como por exemplo, a distância ideal entre as doses que produzem os efeitos clínicos desejáveis de analgesia e que produzem menos efeitos colaterais (Lötsch & Geisslinger, 2005).

O conhecimento atual sobre as bases genéticas da variação individual na resposta aos opióides sugere uma forte contribuição deste *locus* genético e o apontam como possível marcador genético, o que pode, em um futuro próximo, levar à terapia individualizada com estes fármacos. Além disso, não é de nosso conhecimento nenhum estudo na literatura científica que tenha visado associar este polimorfismo às condições artrálgicas de ATM.

Considerando estas evidências, é possível criar a hipótese que condições dolorosas crônicas possam estar associadas à menor capacidade de reação analgésica do próprio sistema nociceptivo, e desta forma pode-se sugerir que indivíduos carregadores do alelo 118G estejam sob maior risco de acometimento por estas condições.

Assim, o objetivo geral neste estudo foi investigar na literatura a comorbidade entre DTM e FM; identificar o polimorfismo SNP 118A>G no gene *OPRM1* em indivíduos sintomáticos e assintomáticos apresentando desarranjos internos da articulação temporomandibular, em pacientes portadores de fibromialgia, e em indivíduos saudáveis, e verificar se a presença do alelo G está associada ou não ao fenótipo de dor crônica.

## CAPÍTULO 1

---

### **Disfunção Temporomandibular na Fibromialgia: Uma Visão Crítica**

Luana Maria Martins de Aquino, Pós Graduanda no Curso de Doutorado em Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp.

Maisa Soares Gui, Pós Graduanda no Curso de Doutorado em Biologia Bucal, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp.

Marcele Jardim Pimentel, Pós Graduanda no Curso de Doutorado em Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp.

Rubens Reimão, Professor Livre Docente do Departamento de Neurologia, Hospital das Clínicas de São Paulo, Faculdade de Medicina, USP.

Celia Marisa Rizzatti-Barbosa, Professora Titular do Departamento de Prótese e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp.

Luana Maria Martins de Aquino

Departamento de Prótese e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba,  
Universidade Estadual de Campinas

Av. Limeira 901. CEP: 13414-903. Piracicaba, SP, Brazil

Tel./fax: +55 19 2106-5373

E-mail: luanaaquino@fop.unicamp.br

---

Artigo aceito na revista *Brazilian Dental Science* no dia 18.09.2012

## RESUMO

A disfunção temporomandibular (DTM) e a fibromialgia (FM) são síndromes musculoesqueléticas que parecem estar associadas. Vários estudos na literatura relatam sinais e sintomas da DTM em pacientes com FM. O objetivo neste trabalho foi analisar a literatura quanto a associação clínica entre fibromialgia e as disfunções temporomandibulares. Apesar destes distúrbios possuírem etiologias diferentes, o mecanismo de modulação da dor são semelhantes. Muitas pesquisas desenvolvidas nessa área buscam elucidar esta questão ainda pouco compreendida. Mas sugere-se que estas síndromes são caracterizadas por uma diminuição no limiar de dor e na capacidade de atenuação de sistemas descendente de modulação da dor. Além disso, há um certo grau de comorbidade entre estas duas patologias, que compartilham muitas características clínicas. Muitos pacientes com FM apresentam vários sinais e sintomas de DTM, entretanto, uma pequena quantidade de indivíduos com DTM recebem um diagnóstico de FM. Portanto, é importante uma avaliação precisa e adequada do sistema estomatognático em pacientes com fibromialgia englobando o diagnóstico de disfunção temporomandibular na intervenção terapêutica.

**Palavras-chave:** disfunção temporomandibular, fibromialgia, dor facial.

## INTRODUÇÃO

A Disfunção Temporomandibular (DTM) é uma síndrome que envolve principalmente as estruturas do sistema estomatognático como músculos mastigatórios, articulações temporomandibulares, músculos cervicais e outras estruturas correlatas, como vasos sanguíneos e estruturas nervosas.<sup>1</sup> Possui alta prevalência, onde cerca de 10% da população adulta apresenta algum sinal e sintoma de DTM.<sup>2</sup> Dentre os sinais e sintomas mais prevalentes encontram-se dor nas estruturas envolvidas, limitação e desvios nos movimentos mandibulares, dificuldade de mastigação e de abertura bucal, ruídos condilares, e quase sempre intensa dor crânio-cervical. Sua etiologia parece envolver mais do que a oclusão dos dentes, e hoje se acredita que o seu diagnóstico deva contemplar tanto

os seus elementos predisponentes, quanto os fatores desencadeantes e perpetuantes, dentre os quais se incluem desde predisposição genética<sup>3,4,5</sup> até as condições psico-sócio-econômicas.<sup>6,7,8,9</sup>

A dor facial é um dos mais prevalentes motivos de procura pela ajuda profissional, pois esta, seja local ou referida, pode conduzir a importantes limitações físicas, psíquicas e sociais ao paciente.<sup>10,11</sup> Entretanto, o diagnóstico da dor facial não é simples, pois envolve diversos fatores confundentes, como as situações e síndromes que se caracterizam pela presença da dor na região maxilo-mandibular e estruturas anexas. Dentre elas podem ser citadas a sinusite, cefaléias tensionais, neuralgias dos nervos cranianos, dores faciais atípicas, síndrome de Eagle, síndrome do ligamento estilohioideo, distrofias simpáticas reflexas da face, radiculopatia cervical, tensão cervical, bursite cérvico-torácica interespinosa, síndrome do supraspinatus, neuralgias intercostais, compressão torácica vertebral, estenose espinal, lesões benignas e malignas do complexo maxilo mandibular e a fibromialgia (FM).<sup>12</sup>

A fibromialgia é uma síndrome de etiologia ainda desconhecida, caracterizada pela dor crônica difusa, rigidez muscular, sono não reparador, fadiga, e condições de comorbidade.<sup>13</sup> De acordo com o Colégio Americano de Reumatologia, os pacientes com fibromialgia apresentam dor generalizada por todo o corpo por no mínimo 3 meses e palpação positiva de pelo menos 11 dos 18 específicos *tender points*.<sup>14</sup> Esta síndrome encontra-se dentre as doenças reumatológicas musculoesqueléticas mais prevalentes na população adulta, onde os estudos epidemiológicos apontam uma predominância para o gênero feminino. O quadro 1 mostra uma perspectiva cronológica a respeito dos principais trabalhos sobre a prevalência de FM na população humana.

Quadro 1. Perspectiva cronológica e topográfica dos principais trabalhos sobre a prevalência de FM na população humana.

| AUTORES                              | ANO  | LOCAL     | N             | METODO   | RESULTADOS |
|--------------------------------------|------|-----------|---------------|--|------------|
| Makela & Heliovaara <sup>15</sup>    | 1991 | Finlândia | 3434          | Entrevista e localização de tender points por palpação           | 1,57%      |
| Prescott <i>et al.</i> <sup>16</sup> | 1993 | Dinamarca | 123           | Critério do Colégio Americano de Reumatologia para fibromialgia  | 0,66%      |
| Forseth & Gran <sup>17</sup>         | 1993 | Noruega   | 2498 mulheres | Questionário sobre a presença de dor e exames realizados segundo | 10,5%      |

|                                       |      |                      |               | os critérios para doenças reumáticas   |   |
|---------------------------------------|------|----------------------|---------------|--|---|
| Wolfe <i>et al.</i> <sup>18</sup>     | 1995 | Londres – Inglaterra | 391           | Questionário perguntando sobre a presença de nenhuma dor, dor não difusa, e dor difusa   | 3,4% para mulheres; e 0,5% para homens. A prevalência aumenta com a idade |
| White <i>et al.</i> <sup>19</sup>     | 1999 | Kansas, EUA          | 311           | Critério do Colégio Americano de Reumatologia para fibromialgia  | 3,4% para mulheres e 0,5% para homens                                     |
| Lindell <i>et al.</i> <sup>20</sup>   | 2000 | Suécia               | 147           | Uso de dolorímetro para a contagem de tenderpoint, limiar de dor e prevalência de dor crônica e fibromialgia   | 1,3%  |
| Lundberg & Gerdle <sup>21</sup>       | 2002 | Nikoping, Suécia     | 643 mulheres  | Presença de tender points, qualidade de vida, índice de dor provocada, presença e intensidade de dor, quantidade de férias e afastamento por causa da dor                                  | 2,0%.   |
| Schochat & Rasp <sup>22</sup>         | 2003 | Alemanha             | 623 mulheres  | As pacientes foram examinadas clinicamente quanto a presença de pontos de gatilho  | 11,5%   |
| Salaffi <i>et al.</i> <sup>23</sup>   | 2005 | Itália               | 2155          | Questionários enviados à população de estudo e depois examinados por reumatologistas treinados   | 2,2%  |
| Topbas <i>et al.</i> <sup>24</sup>    | 2005 | Turquia              | 1930 mulheres | Entrevista com itens relacionados ao diagnóstico de fibromialgia e exame por especialista  | 3,6%  |
| Haq <i>et al.</i> <sup>25</sup>       | 2005 | Bangladesh           | 5211          | Questionário aplicado de porta em porta por entrevistadores treinados, e exame por reumatologistas treinados aos que responderam positivamente quanto à presença de dor musculoesquelética | 4,4%  |
| Mas <sup>26</sup>                     | 2008 | Espanha              | 2192          | Classificação e exame realizado por reumatologistas experientes, investigando disfunções musculoesqueléticas, através de instrumentos validados na literatura                              | 2,4%; sendo 4,2% e 0,2% em homens   |
| Assumpção <i>et al.</i> <sup>27</sup> | 2009 | Embú, Brasil         | 304           | Escala visual analógica;, Questionário de impacto de fibromialgia; Dolorímetro nos tender points.  | 4,4%  |
| Bannwarth <i>et al.</i> <sup>28</sup> | 2009 | França               | 1014          | Questionário de classificação epidemiológica para fibromialgia de Londres administrado por telefone; exames confirmatórios por reumatologistas treinados.                                  | 2,2,%   |
| Branco <i>et al.</i>                  | 2010 | França,              | 1225          | Questionário de classificação  | 2,9 a 4,7%  |

|  |      |                                      |   |   |      |
|--|------|--------------------------------------|---|---|------|
| <i>al.</i> <sup>29</sup>                     |      | Alemanha, Itália, Portugal e Espanha |   | epidemiológica para fibromialgia de Londres administrado por telefone; exame confirmatório por 8 reumatologista calibrados de acordo com o Colégio Americano de Reumatologia        |      |
| Alvarez-Nemegyei <i>et al.</i> <sup>30</sup> | 2011 | Mexico                               | 3915  | Estudo cruzado transversal usando o <i>Community Oriented Program in the Rheumatic Diseases</i>   | 0,2% |
| Chaaya <i>et al.</i> <sup>31</sup>           | 2012 | Libano                               | 3530 indivíduos acima de 15 anos; 944 examinados clinicamente | Entrevista pelo Método de Programa Orientado à Comunidade para Doenças Reumáticas; avaliação clinica dos casos positivos através dos critérios do Colégio Americano de Reumatologia | 6,2% |

Tanto a DTM quanto a FM podem ser consideradas desordens funcionais do sistema músculo-esquelético, e que não se relacionam necessariamente a causas traumáticas. Segundo a Organização Mundial da Saúde<sup>32</sup> estas desordens estão dentre as maiores causas de morbidade da população mundial, representando importantes problemas sócio-econômicos e causando enormes custos nos sistemas de saúde. Aproximadamente um quarto da população de adultos na Europa apresentam alterações músculo-esqueléticas capazes de limitar suas atividades diárias<sup>33</sup> e esta realidade deve provavelmente ser muito próxima daquela encontrada no Brasil. Embora apareça em todas as faixas etárias, as desordens músculo-esqueléticas tendem a se agravar com a progressão da idade. Considerando-se o crescimento do número de idosos na população geral, e observando-se as alterações no estilo de vida que tendem a aumentar a ocorrência das alterações músculo-esqueléticas, a propensão de que estas doenças tenderão a sobrecarregar os sistemas de saúde nos próximos anos.

### ***PATOGÊNESE DA DOR***

É sabido que a dor presente na FM está fortemente relacionada com um aumento da sensibilização central como causa da dor músculo-esquelética persistente, que aparentemente confirma-se como um fator agravante das dores crônicas do crânio<sup>34,35</sup> e provavelmente do complexo maxilo facial. Sensibilização central é um fenômeno presente

em praticamente todos os eventos de dor crônica, sejam nociceptivas ou neuropáticas, onde os estímulos nociceptivos reduzem o limiar da dor, promovendo uma hiperalgesia nas áreas sensitivas primárias, e alodínea nas áreas adjacentes à inflamação.<sup>35</sup> É possível acreditar que estas reações adotem uma correlação muito próxima com os fenômenos de somação espacial e somação temporal advindas da excitabilidade neuronal,<sup>36,37</sup> o que poderia justificar a maior prevalência destes fenômenos em mulheres que em homens.<sup>38</sup>

Aparentemente estabelece correlação com outras síndromes dolorosas regionais como a síndrome do cólon irritável, cistite intersticial, cefaléia, dor lombar crônica, dor cervical crônica e algumas manifestações crônicas das DTM, que parecem estar associadas com esta amplificação anormal dos impulsos nociceptivos advindos de estruturas viscerais ou musculoesqueléticas.<sup>39,40</sup> Apesar destas síndromes possuírem etiologias diferentes, o mecanismo de modulação de dor parece ser comum. Além disso, estes distúrbios geralmente ocorrem simultaneamente,<sup>41</sup> podem atuar como fatores de risco para o desenvolvimento de um outro,<sup>42</sup> ou levar à transição de uma desordem de dor localizada a uma desordem de dor generalizada.<sup>43</sup> Enquanto a iniciação de várias destas desordens vêm de mecanismos periféricos de dor (inflamação e / ou irritação da mucosa ou neural), a entrada nociceptiva persistente conduz a alterações no sistema nociceptivo central. Após a indução da sensibilização central, sensações dolorosas podem surgir independente da entrada nociceptiva periférica,<sup>44</sup> aumentando significativamente a complexidade do tratamento destes distúrbios. Ampliando nossa compreensão da fisiopatologia compartilhada entre esses transtornos irá promover a colaboração entre pesquisadores de diferentes disciplinas para obter melhores idéias sobre os mecanismos subjacentes e promover o tratamento desses distúrbios de processamento da dor.

Na verdade ainda se desconhece a causa da elevada sensibilidade à dor presente na FM, mas hoje se reconhecem as correlações da FM com anormalidades do processamento sensitivo do sistema nervoso central assim como com as alterações do tecido periférico.<sup>45</sup> As anormalidades centrais parecem estar relacionadas ao embotamento do eixo hipotalâmico-hipofisário quanto às respostas aos eventos estressores,<sup>46,47</sup> ao aumento nos níveis de substância P,<sup>48,49</sup> aminoácidos excitatórios<sup>50</sup> e neurotrofinas<sup>51</sup> no fluido cérebro-espinhal, e à capacidade de ativação e diferenciação das células da glia diante de um

estímulo excitatório exagerado.<sup>45</sup> Dor pré-existente, fatores psicológicos, elementos congênitos, hormônios sexuais, estresse, emoções negativas, depressão e alterações nos padrões de sono deveriam ser considerados pela importância que estabelecem na soma espacial do estímulo nervoso aferente.

Embora a nossa compreensão do desenvolvimento de estados da dor crônica e hiperalgesia, tradicionalmente focada na transmissão da dor através de vias ascendentes (da periferia para os centros espinhais e supra-espinhal), um corpo crescente de pesquisa amplia o nosso entendimento da decrescente influência sobre a geração e manutenção de sensibilização.<sup>52</sup> A substância cinzenta periaqueductal (PAG) área rostral ventromedial da medula oblonga (RVM) é fundamental para a modulação descendente da dor. A influência do sistema inibitório descendente (anti-nociceptivo) há muito tempo tem sido relatada.<sup>53</sup> A primeira evidência veio de estudos que demonstram que a estimulação do PAG produziu analgesia profunda em ratos.<sup>54</sup> O estudo demonstrou que a estimulação da PAG-RVM envolvido nas vias descendente serotonérgicas, noradrenérgica, e opióide afetam uma resposta analgésica no nível do corno dorsal.

### ***CORRELAÇÃO ENTRE DTM E FM***

A presença de sinais e sintomas de disfunção temporomandibular em portadores de fibromialgia foi observada em 1988 no trabalho de Eriksson *et al.*<sup>55</sup>, realizado na Suíça, onde os autores obtiveram resposta positiva para a presença de sinais de DTM em quatro dentre oito pacientes portadores de fibromialgia primária. Estes pacientes foram analisados segundo o índice de Helkimo para DTM, mas os próprios autores sugeriram que um exame mais criterioso do sistema estomatognático talvez fosse necessário para elucidar possíveis fatores etiológicos por trás das queixas relatadas pelos pacientes. Embora este trabalho possa ser considerado pelo seu valor histórico, o mesmo apresenta uma série de falhas experimentais, onde a amostragem foi extremamente reduzida, não houve grupo controle, os exames não foram adequadamente conduzidos, além de outras falhas na condução experimental.

Hedenberg-Magnusson *et al.* (1997)<sup>56</sup>, em outro estudo também desenvolvido na Suíça, confrontaram pacientes com FM e portadores de DTM com um grupo controle, e



verificaram que o limiar de dor à pressão e os níveis de tolerância à dor foram menores no grupo portador de FM do que no grupo com DTM. Entretanto ambos os grupos foram mais sensíveis aos estímulos de dor do que os indivíduos controle. E deste trabalho concluíram que 94% dos pacientes portadores de FM possuíam sintomas de DTM, principalmente com relação a mialgias locais.

Esta associação entre DTM e FM foi defendida por Friction<sup>57</sup> em 2004, que discutiu as implicações da comorbidade entre DTM e FM quanto aos seus diagnósticos e tratamentos. Neste trabalho o autor sugere que existe uma estreita correlação entre ambas as doenças. No entanto o autor não faz referência a critérios importantes para suas conclusões, quando não informa adequadamente as populações dos estudos em que se baseou, se houve correlações entre os grupos afetados e os grupos controle, os métodos de classificação utilizados, etc.

Manfredini *et al.* (2004)<sup>58</sup> investigaram pacientes portadores de DTM quanto à presença de fibromialgia e vice e versa, observaram que as diferenças entre os 2 grupos não foi tão relevante, com a exceção aos valores de abertura da boca, tanto voluntário e passiva, e na presença de pontos de gatilho, que foram piores e mais prevalentes nos indivíduos portadores de FM. Entretanto a maioria dos pacientes com fibromialgia (86,7%) apresentaram sinais e sintomas localizados no sistema estomatognático; por outro lado, apenas uma minoria dos pacientes com DTM (10%) apresentaram sinais e sintomas de FM à avaliação reumatológica. Plesh *et al* (1996)<sup>59</sup> também estudaram a prevalência de DTM em portadores de FM e, vice-versa, a prevalência de FM nos portadores de DTM, e ainda discutiram quais as características que melhor distinguem estas duas desordens. Os autores verificaram que uma pequena proporção de pacientes com DTM (18,4%) apresentaram sintomas de FM, mas a maioria das pessoas com FM (75,0%) responderam os critérios de DTM miofascial. Novamente constatou-se que os pacientes com FM apresentaram limiares de dor menores do que aqueles presentes nos portadores de DTM.

Leblebici *et al.* (2007)<sup>60</sup> buscaram determinar coexistência entre FM, DTM e dor miofascial mastigatória (DMM). Todos os pacientes foram examinados por um dentista e um fisiatra para identificar a coexistência de FM e DTM. No grupo FM, DTM foi encontrado em 80% dos pacientes, e apenas 19% dos pacientes tiveram origem artrogênica

com DMM. No grupo com DTM, a prevalência de FM foi de 52%, que foi significativamente maior nos pacientes com DTM de origem artrogênica com DMM. Os resultados indicam que a coexistência de DTM e FM com DMMP é alta. Dor e sensibilidade nos músculos da mastigação parecem ser um elemento importante em FM, assim, em alguns pacientes, pode ser o líder de queixa dos pacientes.

Fraga *et al.*(2012)<sup>61</sup> observaram a presença de sinais e sintomas de DTM em pacientes com fibromialgia. Sessenta pacientes com diagnóstico de FM foram avaliados através do *Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular disorder (RDC-TMD)*, que fornece critérios padronizados para o diagnóstico de DTM. Os sintomas mais comuns relatados pelos pacientes com FM foram dor de cabeça (97%) e dor facial (81,7%). A dor miofascial sem limitação de abertura bucal foi diagnosticado em 47% dos pacientes, diagnóstico do subgrupo I do RDC-TMD. O deslocamento de disco com redução foi o diagnóstico mais prevalente no subgrupo II (21,6%). E 36,7% dos sujeitos apresentaram osteoartrite, diagnóstico do subgrupo III. Apenas 6,6% dos pacientes não apresentaram qualquer sinal de DTM. Existe uma elevada prevalência de sinais e sintomas de DTM em pacientes com FM, indicando a necessidade de um diagnóstico e tratamento integrado desses pacientes, e sugere-se que a FM pode ser um fator de risco médio ou longo prazo para o desenvolvimento da DTM.

É possível perceber diante destes fatos que há menos evidências de sofrimento em pacientes com DTM, e que esta é uma desordem mais localizada. Já a FM é uma desordem generalizada, onde muitos pacientes apresentam sintomas de DTM; e estes sintomas são geralmente de ordem muscular e menos articular. Possivelmente a DTM muscular, quando induzida por trauma local<sup>62,63</sup> e associada estresse crônico,<sup>64</sup> poderá secundariamente alterar as ATMs, causando modificações sensíveis na biomecânica articular, promovendo microtraumas à cápsula e disco articulares, com conseqüente aumento na percepção de dor. Isto não estaria necessariamente presente nos casos de portadores de FM, onde a dor de origem central estaria exercendo a maior influência na sensibilidade à dor.

## **DISCUSSÃO**

Ainda há controvérsia quando se fala de fisiopatologia da dor em FM e DTM. Várias vertentes de estudos são encontradas na literatura, porém ainda não há um consenso sobre este assunto. Entendemos que a compreensão da fisiopatologia da dor neurogênica e a sua influência no limiar de percepção da dor seja dificultada pela inviabilidade dos modelos experimentais em humanos, cujo comportamento frente ao desencadeamento da dor não é o mesmo daquele observado nos animais. A carência de estudos humanos, por questões éticas, incita o aprimoramento de experimentos em animais que mais se aproximem da realidade clínica. A nosso ver estas pesquisas translacionais que estabelecem correlação entre os experimentos em modelos animais e estudos clínicos controlados e randomizados, tornam-se cada vez mais necessárias frente às respostas exigidas para a compreensão e consequente intervenção no processo de desencadeamento e manutenção da dor, de modo particular aquela envolvida na FM e DTM.

Da mesma forma, parecem existir algumas evidências de que os fatores congênitos predisõem mais um indivíduo que o outro a apresentar os sintomas da dor crônica, tanto na FM<sup>65,66</sup> quanto nas DTM.<sup>67,68,69,70</sup> Estudos desenvolvidos em nossa equipe<sup>3,4,5</sup> também confirmaram nossa hipótese de que alterações polimórficas parecem alterar a expressão de sinais e sintomas das DTMs. As mutações gênicas de uma espécie são a base da sua evolução, pois cria os novos elementos (alelos) que irão (ou não) fazer parte do *pool genético* de uma população. Quando uma variável genética alcança uma frequência populacional de 1%, ela passa a ser denominada de polimorfismo. Atualmente, diversos polimorfismos genéticos vêm sendo relacionados a um aumento de risco de ocorrência e/ou recorrência de diversas patologias multifatoriais, sendo considerados como parte do componente genético que eleva a susceptibilidade de um indivíduo a apresentar determinado comportamento frente a um fator, consistindo muitas vezes em um risco relativo aumentado a este comportamento. É o que ocorre com a expressão da dor em virtude da maior susceptibilidade de alterações neuronais centrais. Este fato, evidenciado pela literatura, a nosso ver, direcionará uma nova frente de estudos que possibilitem esclarecer o porquê das alterações na expressão da dor por determinados grupos de pessoas. Isto sem dúvida abrirá uma nova porta de compreensão ao tão intrincado tema.

Diante desta revisão da literatura, podemos concluir que a comorbidade entre FM e DTM é verdadeira, pois existe alta prevalência de DTM em pacientes com FM. Isso indica a necessidade de diagnóstico e manejo adequado desses sinais e sintomas, sugerindo que a FM pode ser um fator de risco médio ou longo prazo para o desenvolvimento da DTM.<sup>61</sup> Indivíduos portadores de fibromialgia apresentam complexidade maior quanto ao quadro clínico de DTM, portanto a importância de uma avaliação precisa e adequada do sistema estomatognático em pacientes com FM é evidente e requerem maiores cuidados no diagnóstico e na intervenção terapêutica. Caberá ao cirurgião dentista compreender a natureza complexa destas doenças e através de suas particularidades, proporcionar não apenas os cuidados que se fizerem necessários para com a dor presente, mas principalmente identificar sinais e sintomas iniciais da fibromialgia e encaminhar o paciente ao reumatologista. Sugerimos que, em função da complexidade do sistema estomatognático e suas interrelações com estruturas comumente envolvidas na FM, o cirurgião dentista deva ser consultado para gerenciar as manifestações orofaciais da doença, tanto nas disfunções temporomandibulares como na intervenção dos sintomas orais gerados pela FM.

## REFERÊNCIAS

1. Svensson P, Graven-Nielsen T. Craniofacial muscle pain: review of mechanisms and clinical manifestation. *J Orofac Pain*. 2001; 15(2):117-145.
2. LeResche L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8(3):291-305.
3. Ribeiro-Dasilva MC, Peres Line SR, Leme Godoy dos Santos MC, Arthuri MT, Hou W, Fillingim RB, et al. Estrogen receptor-alpha polymorphisms and predisposition to TMJ disorder. *J Pain*. 2009; 10(5):527-533.
4. Meloto CB, Serrano PO, Ribeiro-DaSilva MC, Rizzatti-Barbosa CM. Genomics and the new perspectives for temporomandibular disorders. *Arch Oral Biol*. 2011; 56(11):1181-1191.
5. Planello AC, Campos MI, Meloto CB, Secolin R, Rizzatti-Barbosa CM, Line SR, et al. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration. *Eur J Oral Sci*. 2011; 119(1):1-6.

6. Gil IA, Rizzatti-Barbosa CM, Pedro VM, Silverio KC, Goldfarb DP, Fusco V, *et al.* Multidisciplinary approach to chronic pain from myofascial pain dysfunction syndrome: a four-year experience at a Brazilian center. *Cranio*. 1998; 16(1):17-25.
7. Johansson A, Unell L, Carlsson G, Söderfeldt B, Halling A, Widar F. Associations between social and general health factors and symptoms related to temporomandibular disorders and bruxism in a population of 50-year-old subjects. *Acta Odontol Scand*. 2004; 62(4):231-237
8. Burris JL, Evans DR, Carlson CR. Psychological correlates of medical comorbidities in patients with temporomandibular disorders. *J Am Dent Assoc*. 2010; 141(1):22-31.
9. Moufti MA, Wassell RW, Meechan JG, Allen PF, John MT, Steele JG. The Oral Health Impact Profile: ranking of items for temporomandibular disorders. *Eur J Oral Sci*. 2011; 119(2):169-174.
10. Rizzatti-Barbosa CM, Nogueira MT, de Andrade ED, Ambrosano GM, Albergaria-Barbosa JR. Clinical evaluation of amitriptyline for the control of chronic pain caused by temporomandibular joint disorders. *Cranio*. 2003; 21(3):221-225.
11. Rizzatti-Barbosa CM, Martinelli DA, Ambrosano GM, de Albergaria-Barbosa JR. Therapeutic response of benzodiazepine, orphenadrine citrate and occlusal splint association in TMD pain. *Cranio*. 2003; 21(2):116-120.
12. Waldman SD. *Atlas of common pain syndromes*. 2 ed. Saunders Elsevier; 2008.
13. Aaron LA, Burke MM, Buchwald D. Overlapping Conditions Among Patients With Chronic Fatigue Syndrome, Fibromyalgia, and Temporomandibular Disorder. *Arch Intern Med*. 2000; 160(2):221-227.
14. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, *et al.* The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification fibromyalgia. Report of the multicenter criteria committee. *Arthritis Rheum*. 1990; 33(2):160–172.
15. Makela M, Heliövaara M. Prevalence of primary fibromyalgia in the Finnish population. *BMJ*. 1991; 303: 216-219.
16. Prescott E, Kjøller M, Jacobsen S, Bülow PM, Danneskiold-Samsøe B, Kamper-Jørgensen F. Fibromyalgia in the adult Danish population: I. A prevalence study. *Scand J Rheumatol*. 1993; 22(5): 233-235.

17. Forseth KO, Gran JT. The occurrence of fibromyalgia-like syndromes in a general female population. *Clin Rheumatol.* 1993; 12(1):23-27.
18. Wolfe TA, Ross K, Anderson J, Russell J. Aspects of fibromyalgia in the general population: Sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms. *J Rheumatol.* 1995; 22(1):151-156.
19. White KP, Speechley M, Harth M, Ostbye T. The London Fibromyalgia Epidemiology Study: The prevalence of fibromyalgia Syndrome in London, Ontario. *J Rheumatol.* 1999; 26(7): 1570-1576.
20. Lindell L, Bergman S, Petersson IF, Jacobsson LT, Herrström P. Prevalence of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Scand J Prim Health Care.* 2000; 18(3):149-153.
21. Lundberg G, Gerdle B. Tender point scores and their relations to signs of mobility, symptoms, and disability in female home care personnel and the prevalence of fibromyalgia syndrome. *J Rheumatol.* 2002; 29(3):603-613.
22. Schochat T, Rasp H. Elements of fibromyalgia in an open population. *Rheumatology.* 2003; 42(7):829-835.
23. Salaffi FR, Angelis R De, Grassi W. Prevalence of musculoskeletal conditions in an Italian population sample: results of a regional community-based study. I. The MAPPING study. *Clin Exp Rheumatol.* 2005; 23(6):819-828.
24. Topbas M, Cakirbay H, Gulec H, Akgol E, Ak I, Can G. The prevalence of fibromyalgia in women aged 20-64 in Turkey. *Scand J Rheumatol.* 2005; 34(2):140-144.
25. Haq SA, Darmawan J, Islam MN, Uddin MZ, Das BB, Rahman F, *et al.* Prevalence of rheumatic diseases and associated outcomes in rural and urban communities in Bangladesh: a COPCORD study. *J Rheumatol.* 2005; 32(2):348-353.
26. Mas AJ, Carmona L, Valverde M, Ribas B. EPISER Study Group. Prevalence and impact of fibromyalgia on function and quality of life in individuals from the general population: results from a nationwide study in Spain. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26(4):519-526.
27. Assumpção A, Cavalcante AB, Capela CE, Sauer JF, Chalot SD, Pereira CA, *et al.* Prevalence of fibromyalgia in a low socioeconomic status population. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2009; 8:10-64.

28. Bannwarth B, Blotman F, Roué-Le Lay K, CAubère Jp, André E, Taïeb C. Fibromyalgia syndrome in the general population of France: a prevalence study. *Joint Bone Spine*. 2009; 76(2):184-187.
29. Branco JC, Bannwarth B, Failde I, Abello Carbonell J, Blotman F, Spaeth M, *et al*. Prevalence of fibromyalgia: a survey in five European countries. *Semin Arthritis Rheum*. 2010; 39(6):448-443.
30. Alvarez-Nemegyei J, Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Cardiel MH, Ramirez-Angulo A, Goycochea-Robles MV. Prevalence of musculoskeletal pain and rheumatic diseases in the southeastern region of Mexico. A COPCORD-bases community survey. *J Rheumatol. Suppl*. 2011; 86:21-25
31. Chaaya M, Slim ZN, Habib RR, Arayssi T, Dana R, Hamdan O, *et al*. High burden of rheumatic diseases in Lebanon: a COPCORD study. *Int J Rheum Dis*. 2012. 15(2):136-143.
32. World Health Organization (WHO). The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium: report of a WHO Scientific Group (internet). Geneva. WHO. 2003.; (cited 2010 Sep 15). Available from: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_919.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_919.pdf).
33. Lidgren L, Smolen J, Bentley G, Delams P. European action towards better musculoskeletal health: a public health strategy to reduce the burden of musculoskeletal conditions (internet) Sweden. 2005.; (cited 2010 Mar 22) Available from: <http://www.boneandjointdecade.org/Default.aspx?contId=534>.
34. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, *et al*. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res*. 2010; 62(5):600–610.
35. Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog. Neurobiol*. 1992; 38(4):397–421.
36. Vierck Jr CJ, Staud R, Price DD, Cannon RL, Mauderli AP, Martin AD. The effect of maximal exercise on temporal summation of second pain (windup) in patients with fibromyalgia syndrome. *J Pain*. 2001; 2(6):334-344.
37. Sarlani E, Greenspan JD. Why look in the brain for answers to temporomandibular disorder pain? *Cells Tissues Organs*. 2005; 180(1):69-75.

38. Sarlani E, Grace EG, Reynolds MA, Greenspan JD. Sex differences in temporal summation of pain and aftersensations following repetitive noxious mechanical stimulation. *Pain*. 2004; 109(1-2):115-123.
39. Lai YC, Shaftel SS, Miller JN, Tallents RH, Chang Y, Pinkert CA, *et al.* Intraarticular induction of interleukin-1beta expression in the adult mouse, with resultant temporomandibular joint pathologic changes, dysfunction, and pain. *Arthritis Rheum*. 2006; Apr; 54(4):1184-97.
40. Staud R, Spaeth M. Psychophysical and neurochemical abnormalities of pain processing in fibromyalgia. *CNS Spectr*. 2008; 13:12–17.
41. Aggarwal VR, McBeth J, Zakrzewska JM, Lunt M, Macfarlane GJ. The epidemiology of chronic syndromes that are frequently unexplained: Do they have common associated factors? *Int J Epidemiol*. 2006; 35(2):468–476.
42. Diatchenko L, Nackley AG, Slade GD, Fillingim RB, Maixner W. Idiopathic pain disorders: Pathways of vulnerability. *Pain*. 2006; 123(3):226–230.
43. Holm LW, Carroll LJ, Cassidy JD, Skillgate E, Ahlbom A. Widespread pain following whiplash-associated disorders: Incidence, course, and risk factors. *J Rheumatol*. 2007; 34(1):193–200.
44. Latremoliere A, Woolf CJ. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain*. 2009; 10(9):895–926.
45. Staud R. Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8(3):1-7.
46. Crofford LJ, Young EA, Engleberg NC, Korszun A, Brucksch CB, McClure LA, *et al.* Basal circadian and pulsatile ACTH and cortisol secretion in patients with fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome. *Brain Behav Immun*. 2004; 18(4):314-325.
47. Crofford LJ. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in fibromyalgia: Where are we in 2001? *J Musculoskelet Pain*. 2002; 10:215-220.
48. Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, *et al.* Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum*. 1994; 37(11):1593-1601.



49. Bradley LA, Sotolongo A, Alberts KR, Alarcon GS, Mountz JM, Liu, HG, *et al.* Abnormal regional cerebral blood flow in the caudate nucleus among fibromyalgia patients and non-patients is associated with insidious symptom onset. *J Musculoskelet Pain.* 1999; 7:285-292.
50. Larson AA, Giovengo SL, Russell IJ, Michalek JE. Changes in the concentrations of amino acids in the cerebrospinal fluid that correlate with pain in patients with fibromyalgia: implications for nitric oxide pathways. *Pain.* 2000; 87(2):201-211.
51. Giovengo SL, Russell IJ, Larson AA. Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *J Rheumatol,* 1999; 26(7):1564-1569.
52. Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev.* 2009; 60(1):214–225.
53. Mayer DJ, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science* 1971; 174(16):1351–1354.
54. Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends in Neurosciences.* 2002; 25(6):319–325
55. Eriksson P, Lindman R, Satal P, Bengtsson A. Symptoms and signs of mandibular dysfunction in primary fibromyalgia syndrome (PSF) patients. *Swed Dent J.* 1988; 12(4):141-149.
56. Hedenberg-Magnusson B, Ernberg M, Kopp S. Symptoms and signs of temporomandibular disorders in patients with fibromyalgia and local myalgia of the temporomandibular system. A comparative study. *Acta Odontol Scand* 1997; 55(6):344-349.
57. Friction JR. The relationship of temporomandibular disorders and fibromyalgia: implications for diagnosis and treatment. *Curr Pain Headache Re.* 2004.;8(5):355-363.
58. Manfredini D, Tognini F, Montagnani G, Bazzichi L, Bombardieri S, Bosco M. Comparison of masticatory dysfunction in temporomandibular disorders and fibromyalgia. *Minerva Stomatol.* 2004; 53(11-12):641-650.
59. Plesh O, Wolfe F, Lane N. The relationship between fibromyalgia and temporomandibular disorders: prevalence and symptom severity. *J Rheumatol.* 1996; 23(11):1948-1952.

60. Leblebici B, Pektao ZO, Ortancil O, Hürcan EC, Bagis S, Akman MN. Coexistence of Fibromyalgia, temporomandibular disorder, and masticatory myofascial pain syndromes. *Rheumatol Int.* 2007; 27:541–544.
61. Fraga BP, Santos EB, Farias Neto JP, Macieira JC, Quintans LJ Jr, Onofre AS, *et al.* Signs and symptoms of temporomandibular dysfunction in fibromyalgic patients. *J Craniofac Surg.* 2012 Mar;23(2):615-8.
62. Rizzatti-Barbosa CM, Tallents RH, Dhadwal S, Malik S. May the loss of anterior teeth promotes pain in temporomandibular joint? *Braz J Oral Scis.* 2010; 9:160-161.
63. Farias-Neto A, Martins APVB, Fiqueroa SR, Almeida SM, Groppo FC, Rizzatti-Barbosa CM. Altered mandibular growth under functional posterior displacement in rats. *The Angle Orthodontist.* 2012; 82(1):3-7.
64. Uhac I, Kovac Z, Valentic-Peruzovic M, Juretic M, Moro LJ. The influence of war stress on the prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders. *J Oral Rehabil.* 2003; 30(2): 211-217.
65. Vargas-Alarcon G, Alvarez-Leon E, Fragoso JM, Vargas A, Martinez A, Vallejo M, *et al.* A SCN9A gene-encoded dorsal root ganglia sodium channel polymorphism associated with severe fibromyalgia. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012. 13(23):1-5.
66. Mergener M, Becker RM, dos Santos AF, dos Santos GA, de Andrade FM. Influence of the interaction between environmental quality and T102C SNP in the HTR2A gene on fibromyalgia susceptibility. *Rev Bras Reumatol.* 2011; 51(6):594-602.
67. Aneiros-Guerrero A, Lendinez AM, Palomares AR, Perez-Nevot B, Aguado L, Mayor-Olea A, *et al.* Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes, DRD4 and GSTM1 are related to temporomandibular disorder. *BMC Med Genet.* 2011; 12(75):1-9.
68. Diatchenko L, Robinson JE, Maixner W. Elucidation of mu-Opioid Gene Structure: How Genetics Can Help Predict Responses to Opioids. *Eur J Pain Suppl.* 2011; 5(2):433-438.
69. Costigan M, Belfer I, Griffin RS, Dai F, Barrett LB, Coppola G, *et al.* Multiple chronic pain states are associated with a common amino acid-changing allele in KCNS1. *Brain.* 2010; 133(9):2519-2527.

70. Tchivileva IE, Lim PF, Smith SB, Slade GD, Diatchenko L, McLean SA, *et al.* Effect of catechol-O-methyltransferase polymorphism on response to propranolol therapy in chronic musculoskeletal pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover pilot study. *Pharmacogenet Genomics*. 2010; 20(4):239-248.

## CAPÍTULO 2

---

### **Association between SNP 118A>G in the *OPRM1* gene and chronic symptomatic TMJ internal disarrangements**

Luana Maria Martins De Aquino<sup>a</sup>, Carolina Beraldo Meloto<sup>a</sup>, Rodrigo Secolin<sup>b</sup>, Sergio Roberto Peres Line<sup>c</sup>, Célia Marisa Rizzatti-Barbosa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Prosthesis and Periodontology, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Morphology, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brazil.

13 Pages and 2 Tables

Celia Marisa Rizzatti Barbosa

Av. Limeira 901, Piracicaba, SP, Brazil

PO Box 52

Departamento de Prótese e Periodontia, FOP-UNICAMP

CEP 13414-903

Tel./fax: +55 19 2106-5373

E-mail: rizzatti@fop.unicamp.br

---

Artigo submetido à revista *Pain* no dia 22.10.2012

## **ABSTRACT**

The internal disarrangement of the temporomandibular joint is commonly accompanied by chronic pain in the joint region. Previous studies suggest as an explanation for chronic pain an impairment of mechanism modulating pain sensitivity by endogenous opioid system. The *OPRM1* gene encoding the  $\mu$ -opioid receptor (MOR) is the main target of exogenous and endogenous opioids and the 118A>G is the most common single nucleotide polymorphism (SNP). The aims of this study were to genotype the SNP 118A>G (rs1799971; N40D) in the  $\mu$ -opioid receptor gene (*OPRM1*), and verify its association with chronic symptomatic temporomandibular joint internal disarrangements (TMJ-ID). For that, we have conducted a case-control study, in which 529 women considered eligible for the study were submitted to the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD) and divided into 3 groups: no TMD control (G1), TMJ-ID with no pain (G2), and TMJ-ID with chronic pain (G3). Genomic DNA was extracted from the saliva obtained with a 3% glucose mouthwash; the fragment of interest was polymerase chain reaction (PCR) amplified, and the alleles were identified using restriction fragment length polymorphism (RFLP). Data collected were submitted to logistic regression ( $\alpha = 0.02$ ) and the SNP was found not to be associated with symptomatic TMJ-ID ( $P > 0.02$ ). In conclusion, our results indicate that the SNP 118A>G in the *OPRM1* gene is not associated with chronic symptomatic temporomandibular joint internal disarrangement.

Key words: temporomandibular joint, opioid, genetic polymorphism, genotype.

## **1. Introduction**

Temporomandibular disorders (TMD) comprise a heterogeneous group of conditions related to pain and/or dysfunction in the region of the temporomandibular joint (TMJ) and masticatory muscles [9]. The most common forms of TMJ disorders that can be accompanied by chronic pain are disk displacements or internal derangement (ID) of the temporomandibular joint (TMJ) and osteoarthritis (OA) [21].

The etiopathogenesis of TMD is complex and multifactorial. Proposed risk factors for TMD include joint and muscle trauma, anatomical factors, psychosocial profile, sensitization of nociceptive pathways, environmental and genetic factors [43].

TMD prevalence is higher in people between the ages of 20 and 40 years, and occurs more often in women than in men. It is estimated that female subjects are 1.5 to 2 times more affected by this disorder than among males, and they account for approximately 80% of patients treated for TMD [9]. The TMD are responsible for the majority of chronic orofacial pain, which motivates patients to seek treatment. The prevalence of TMD related to chronic pain is estimated to be about 10 to 25%, although this estimate varies greatly between epidemiological studies [10]. In a multicenter study of Manfredini *et al.* (2010) [28], 74.5% of patients with TMD report chronic pain for at least 6 months.

The onset of symptoms in TMJ disorders usually comes from peripheral pain mechanisms. However, in cases of chronic nociceptive stimuli, the persistence may be able to promote changes in central nociceptive system. When this phenomenon occurs, painful sensations start to dissipate through neuronal pathways regardless of peripheral nociceptive input [25], significantly increasing the complexity of pain and its treatment.

Although the physiological basis of facial pain in TMD patients still remains considerably unclear. Based on previous knowledge of chronic pain mechanisms, exist a hypothesized that the pathogenesis of TMD may result from disturbances in catecholamine, serotonin, opioid, and cytokine pathways [43]. Some studies have shown an association between TMD and genetic polymorphisms related to pain mechanisms play a role in both experimental pain as well as a large variety of clinical conditions of pain [6, 7, 19, 30, 31, 34, 36, 38].

A working hypothesis is that those symptoms may reflect impairment of mechanisms modulating pain sensitivity, such as the endogenous opioid system [3]. The human  $\mu$ -opioid receptor (MOR) seems to be the major site of action of endogenous opioids. This has been confirmed by studies in both animals and humans showing that polymorphisms in the MOR gene (*OPRM1*) are indeed strong candidates as source of interindividual variability in perceptions of pain [11, 17, 27, 29, 44, 46].

Several polymorphisms that are associated with pharmacological and physiological effects mediated by the stimulation of MOR1 have been identified in the promoter, coding and intronic regions of *OPRM1* [27]. Among those, the genetic variant most commonly investigated involves the single nucleotide polymorphism (SNP) (rs1799971) in the first exon of the gene. It is located on the human chromosome 6q24-q25 and consists in the substitution of adenine (A) for guanine (G) at the position 118 (118A>G). This SNP leads to substitution of the aminoacid asparagine (N) to the negatively charged aspartate (D) at position 40 (N40D) of the extracellular N-terminus of the MOR [22]. As therapeutic consequences, many studies have shown that allele 118G results in less effective opioid analgesia, while allele 118A appears to protect against opioids side effects [4, 24, 27, 33, 42]. This polymorphism has also been shown to affect both subjective pain reporting [13] and objective pain related to cortical activity [33].

Considering these evidences, it is possible to hypothesize that painful conditions may be associated with lower capacity of recruiting the endogenous opioid system, and individuals carrying the 118G allele are most likely to suffer from chronic pain conditions, such as temporomandibular joint internal derangement (TMJ-ID)

Thus, the aim of this study was to investigate the possible association between SNP 118A>G (rs1799971; N40D) in the  $\mu$ -opioid receptor gene, and chronic symptomatic temporomandibular joint internal disarrangements.

## **2. Methods**

### *2.1. Patient Recruitment*

We conducted a case-control with 529 Brazilian women recruited from the Clinics for Interdisciplinary Diagnostics and Treatment of Craniomandibular Disorders from Piracicaba Dental School of State University of Campinas (FOP/UNICAMP). All subjects were diagnosed according to the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC / TMD) [9] and further divided into 3 groups: (G1) control - no TMD (n= 190); (G2) TMJ-ID without pain (n= 164); and (G3) TMJ-ID with chronic pain (n= 175).

Exclusion criteria included the use of any medication that could alter or modulate perception of pain (such as painkillers, antidepressants and anti-inflammatory drugs),

myogenous temporomandibular disorder, epilepsy, schizophrenia, and/or chemicals dependence.

This study was approved by the Ethics Committee of the Piracicaba Dental School, State University of Campinas (FOP / UNICAMP), and signed consent was obtained from every participant.

## 2.2. Genomic DNA extraction and SNP genotyping

Genomic DNA was isolated from oral mucosa epithelial cells, obtained with a 3% glucose mouthwash [45]. DNA was amplified by polymerase chain reactions (PCR) in a final volume of 25  $\mu$ l, containing 100ng of genomic DNA, 12.5  $\mu$ l of Taq DNA polymerase mix (GoTaq Green Master Mix; Promega, Madison, WI, USA), and 1  $\mu$ l of primers forward and reverse (5'GAA AAG TCT CGG TGC TCC TG3' and 5'GTT CGG ACC GCA TGG GTC GGA CAG AT-3', respectively) [15]. PCR consisted of 30 cycles of 95°C for 30 s, 63°C for 30 s, and 72°C for 30 s, with 5 min of final extension at 72°C. Amplification products were verified for appropriate size (202 bp), and subjected to restriction digestion with *DpnII* for 1 hour at 37°C. Digestion products were then examined by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel. The persistence of the 202pb fragment indicates the A allele, while breakage to a 177pb and 25pb fragments indicate the G allele. Genotyping was conducted by individuals blinded to clinical study data and hypotheses.

## 2.3. Statistical Analysis

Haploview software [1] was used to evaluate the Hardy-Weinberg equilibrium. The R software environment [37] was used to perform: Student's *t*-test, to verify homogeneity between the groups regarding the age of the volunteers, and logistic regression, to analyze the genetic association corrected for multiple tests adjusted by Bonferroni correction ( $p < 0.02$ ). The statistical power was 99% for detection association, which was verified by G Power 3.0.5 software [12], using data from an odds ratio of Kapur *et al.* (2007) [23]. The descriptive analysis of the data was obtained using the software SPSS for Windows v. 17.0.

## 3. Results



Subjects mean age was  $37.37 \pm 16.32$  years and it did not differ between cases and controls ( $p=0.06$ , Table 1). SNP 118A>G genotype distribution was not in Hardy-Weinberg disequilibrium ( $p=0.4614$ ) and logistic regression results did not show association between 118A>G genotypes and either TMJ-ID with no pain, or with chronic pain (Table 2). Our analysis presented a statistical power of 99% to detect genetic association.

**Table 1.** Age and 118A>G genotype distribution among groups within the sample.

|                           | <b>Control</b><br>(n=190) | <b>TMJ-ID with<br/>no pain</b><br>(n=164) | <b>TMJ-ID with<br/>chronic pain</b><br>(n=175) | <b>Total</b><br>(n=529) |
|---------------------------|---------------------------|---|--|-------------------------|
| <b>Age</b>                | 41.42 ± 17.57             | 38.07 ± 16.58                             | 33.40 ± 13.47                                  | 37.73 ± 16.32           |
| <b>Genotype<br/>n (%)</b> | AA                        | 143 (75)                                  | 116 (71)                                       | 126 (72)                |
|                           | AG                        | 43 (23)                                   | 46 (28)  | 47 (27)                 |
|                           | GG                        | 4 (2)                                     | 2 (1)  | 2 (1)                   |

TMJ-ID= Temporomandibular joint – internal derangement.

**Table 2.** Logistic regression results for 118A>G.

| <b>Analysis</b>  | <b>Genotype</b> | <b>β</b> | <b>χ<sup>2</sup></b> | <b>p</b> |
|--|-----------------|----------|----------------------|----------|
| Control<br>vs.<br>TMJ-ID with no pain                  | AA              | ref.     | ref.                 | ref.     |
|  | AG              | 0.2751   | 1.2619               | 0.26128  |
|  | GG              | -0.3793  | 0.2323               | 0.62979  |
| Control<br>vs.<br>TMJ-ID with chronic pain             | AA              | -0.1260  | 1.0710               | 0.30070  |
|  | AG              | 0.2140   | 0.7787               | 0.37753  |
|  | GG              | -0.4616  | 0.3462               | 0.55622  |
| TMJ-ID with no pain<br>vs.<br>TMJ-ID with chronic pain | AA              | ref.     | ref.                 | ref.     |
|  | AG              | -0.0610  | 0.0631               | 0.80156  |
|  | GG              | -0.0823  | 0.0083               | 0.92739  |

TMJ-ID= Temporomandibular joint – internal derangement; β = regression coefficient; χ<sup>2</sup> = chi-square; ref. = genotype reference for logistic regression.

#### 4. Discussion

Pain sensitivity varies substantially among humans and is dependent on cultural, psychological and physiological factors. There is increasing evidence for the role of genetic factors in individual variations in pain perception and the development of chronic pain conditions. In our study, no association was found between *OPRM1* SNP 118A>G and chronic symptomatic internal disarrangements of the temporomandibular joint. Indeed, results of other studies on this SNP are controversial.

Pettersson *et al.* (2012) [35] found no association between *OPRM1* SNP 118A>G and pain-related behavior during labor. Similar results were found in the study by Vossen *et al.* (2010) [47], where no effect of the G allele on pain status was observed in patients with chronic low back pain. Huang *et al.* (2008) [20] also observed that *OPRM1* SNP 118A>G is not associated with pressure pain sensitivity in females. However, Fillingim *et al.* (2005) [13] found different results for pressure pain threshold in relation to gender. Pain sensitivity was greater among men homozygous for the major allele A, whereas for women, greater sensitivity was found for heterozygous. Finan *et al.* (2010) [14] revealed that individuals with at least one copy of the G minor allele show elevations in daily pain than those homozygous for the major allele.

Although the findings regarding the association of SNP 118A>G with painful conditions are still controversial, the relevance of this polymorphism seems to be more evident in pharmacogenetics research involving opioids. Its association with functional pain therapy is biologically reasonable, once it affects the main target of opioid analgesics: the  $\mu$ -opioid receptor. Sequences containing the minor allele encode for an aspartic acid (D) instead of an asparagine (N) at position 40 of the receptor extracellular region, which affects a putative glycosylation site of the receptor [27]. In fact, many studies have reported a relationship between minor allele and higher doses of opioid analgesics [4, 5, 16, 18, 24, 26, 40, 48].

The frequency of G allele in our population was 27%. This distribution is similar to the study of Shi *et al.* (2002) [41], who observed a 25.8% frequency, and to the study of Fillingim *et al.* (2005) [13], who found the frequency to be at 25%. Only 1% of our sample was homozygous GG, which is in agreement with what has been found for Caucasian

populations, in which this frequency ranges from 0 to 4.2% [32]. The frequency of the minor allele differs substantially from one population to another, ranging from 5% to 25% in African American populations [2, 24], and reaching approximately 50% in Japanese populations [4, 26].

Increasing number of studies strongly suggest that genetic predisposition plays an important role in the mechanisms of pain (cited above). Other SNPs in the gene *OPRM1* have been shown to be of functional significance [8, 39, 42] and may be associated with the presence of pain in the TMJ-ID. Moreover, genetic studies have provided evidence for the role of polymorphism of genes in the serotonergic [7, 18], and catecholaminergic systems [6] in TMJ pain.

We consider it important investigations on genetic variability in relation to pain in TMD, involving a large number of genes that reflect different pain pathways should be conducted. Smith *et al* (2011) [43] have investigated a substantial number of pain-related candidate genes. In this study provide tentative evidence that chronic TMD is influenced by genetic contributions within a number of gene loci, including glucocorticoid receptor gene (NR3C1), calcium/calmodulin-dependent protein kinase 4 gene (CAMK4), muscarinic cholinergic receptor 2 gene (CHRM2), interferon-related developmental regulator 1 gene (IFRD1), G protein-coupled receptor kinase 5 gene (GRK5), serotonin 2A receptor gene (HTR2A) and variants of the gene encoding the catabolic enzyme catechol-O-methyltransferase (COMT).

In conclusion, our results indicate that the *OPRM1* SNP 118A>G does not contribute to the interindividual variability seen in chronic pain perception in Brazilian women with TMJ-ID. Further studies are required for the confirmation of our results and to find the genetic basis of chronic pain in TMJ-ID in other populations.

## REFERENCE LIST

1. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5.
2. Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, Gong J, Schluger J, Strong JA, Leal SM, Tischfield JA, Kreek MJ, Yu L. Single nucleotide

- polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters b-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 9608–9613.
3. Bragdon EE, Light KC, Costello NL, Sigurdsson A, Bunting S, Bhalang K, Maixner W. Group differences in pain modulation: pain-free women compared to pain-free men and to women with TMD. *Pain*. 2002; 96:227–237.
  4. Chou WY, Yang LC, Lu HF, Ko JY, Wang CH, Lin SH, Lee TH, Concejero A, Hsu CJ. Association of mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006;50(7):787-792.
  5. De Capraris A, Cinnella G, Marolla A, Salatto P, Da Lima S, Vetuschi P, Consoletti L, Gesualdo L, Dambrosio M. Micro opioid receptor A118G polymorphism and post-operative pain: opioids' effects on heterozygous patients. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(4):993-1004.
  6. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, Shagin D, Max MB, Makarov SS, Maixner W. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Gen* 2005;14(1):135–43.
  7. Diatchenko L, Anderson AD, Slade GD, Fillingim RB, Shabalina SA, Higgins T, Sama S, Belfer I, Goldman D, Max MB, Weir BS, Maixner W. Three major haplotypes of the b2 adrenergic receptor define psychological profile, blood pressure, and risk for development of a common musculoskeletal pain disorder. *Am J Med Gen Neuropsychiatr* 2006;141B(5):449–61.
  8. Diatchenko L, Robinson JE, Maixner W. Elucidation of mu-Opioid Gene Structure: How Genetics Can Help Predict Responses to Opioids. *Eur J Pain Suppl*. 2011 Nov 11;5(2):433-438.
  9. Dworkin SF, LeResche L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique. *J Craniomandib Disord*. 1992; 6(4): 301-355.

10. Dworkin SF. Temporomandibular disorder (TMD) pain-related disability found related to depression, nonspecific physical symptoms, and pain duration at 3 international sites. *J Evid Based Dent Pract*. 2011 Sep;11(3):143-144.
11. Edwards RR. Genetic predictors of acute and chronic pain. *Curr Rheumatol Rep*. 2006;8(6):411-417.
12. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39: 175–191.
13. Fillingim RB, Kaplan L, Staud R, Ness TJ, Glover TL, Campbell CM, Mogil JS, Wallace MR. The A118G single nucleotide polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) is associated with pressure pain sensitivity in humans. *J Pain*. 2005;6(3):159-167.
14. Finan PH, Zautra AJ, Davis MC, Lemery-Chalfant K, Covault J, Tennen H. Genetic influences on the dynamics of pain and affect in fibromyalgia. *Health Psychol*. 2010;29(2):134-42.
15. Gelernter J, Kranzler H, Cubells J. Genetics of two  $\mu$  opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol Psychiatry* .1999; 4(5):476–483.
16. Ginosar Y, Davidson EM, Meroz Y, Blotnick S, Shacham M, Caraco Y. Mu-opioid receptor (A118G) single-nucleotide polymorphism affects alfentanil requirements for extracorporeal shock wave lithotripsy: a pharmacokinetic pharmacodynamic study. *Br J Anaesth* 2009;103:420–7.
17. Han W, Ide S, Sora I, Yamamoto H, Ikeda K. A possible genetic mechanism underlying individual and interstrain differences in opioid actions: focus on the mu opioid receptor gene. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1025:370-375.
18. Hayashida M, Nagashima M, Satoh Y, Katoh R, Tagami M, Ide S, Kasai S, Nishizawa D, Ogai Y, Hasegawa J, Komatsu H, Sora I, Fukuda K, Koga H, Hanaoka K, Ikeda K. Analgesic requirements after major abdominal surgery are associated with OPRM1 gene polymorphism genotype and haplotype. *Pharmacogenomics* 2008;9:1605–16.

19. Herken H, Erdal E, Mutlu N, Barlas O, Cataloluk O, Oz F, Guray E. Possible association of temporomandibular joint pain and dysfunction with a polymorphism in the serotonin transporter gene. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120(3):308-13.
20. Huang CJ, Liu HF, Su NY, Hsu YW, Yang Ch, Chen CC, Tsai PS. Association between human opioid receptor genes polymorphism and pressure pain sensitivity in females. *Anaesthesia* 2008; 63:1822-1295.
21. Ingawalé S, Goswami T. Temporomandibular joint: Disorders, treatment and Biomechanics. *Ann Biomed Eng.* 2009;37(5):976-996.
22. Janicki PK, Schuler G, Francis D, Bohr A, Gordin V, Jarzembowski T, Ruiz-Velasco V, Mets B. A genetic association study of the functional A118G polymorphism of the human mu-opioid receptor gene in patients with acute and chronic pain. *Amesth Analg.* 2006;103(4):1011-1017.
23. Kapur S, Sharad S, Singh RA, Gupta AK. A118G polymorphism in mu opioid receptor gene (oprml): association with opiate addiction in subjects of Indian origin. *J Integr Neurosci.* 2007;6(4):511-522.
24. Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, Baar C, Vikan T, Krokan HE, Skorpen F. The 118A>G polymorphism in the human  $\mu$ -opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2004;48:1232-1239.
25. Latremoliere A, Woolf CJ. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain* 2009;10(9):895–926.
26. Liu YC, Wang WS. Human mu-opioid receptor gene A118G polymorphism predicts the efficacy of tramadol/acetaminophen combination tablets (ultracet) in oxaliplatin-induced painful neuropathy. *Cancer.* 2012 Mar 15;118(6):1718-25.
27. Lötsch J, Geisslinger G. Are  $\mu$ -opioid receptor polymorphisms important for clinical opioid therapy? *TRENDS in Molecular Medicine.* 2005;11(2):82-89.

28. Manfredini D, Winocur E, Ahlberg J, Guarda-Nardini L, Lobbezoo F. Psychosocial impairment in temporomandibular disorders patients. RDC/TMD axis II findings from a multicentre study. *J Dent.* 2010; 38(10): 765-772.
29. Mogil JS. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 6(14):7744-7751.
30. Mutlu N, Erdal ME, Herken H, Oz G, Bayazit YA. T102C polymorphism of the 5-HT2A receptor gene may be associated with temporomandibular dysfunction. *Oral Dis.* 2004;10(6):349-52.
31. Nackley AG, Diatchenko L. Assessing potential functionality of catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms associated with pain sensitivity and temporomandibular joint disorders. *Methods Mol Biol.* 2010;617:375-93.
32. NCBI reference:  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1799971](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799971)).
33. Oertel BG, Kettner M, Scholich K, Renne C, Roskam B, Geisslinger G, Schmidt PH, Lötsch J. A common human micro-opioid receptor genetic variant diminishes the receptor signaling efficacy in brain regions processing the sensory information of pain. *J Biol Chem.* 2009;6:6530-6535.
34. Ojima K, Watanabe N, Narita N, Narita M. Temporomandibular disorder is associated with a serotonin transporter gene polymorphism in the Japanese population. *Biopsychosocial Med* 2007;1(3):1-4.
35. Pettersson FD, Grönbladh A, Nyberg F, Sundström-Poromaa I, Akerud H. The A118G Single-Nucleotide Polymorphism of Human  $\mu$ -Opioid Receptor Gene and Use of Labor Analgesia. *Reprod Sci.* 2012;23:1-6.
36. Planello AC, Campos MI, Meloto CB, Secolin R, Rizatti-Barbosa CM, Line SR. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration. *Eur J Oral Sci.* 2011 Feb;119(1):1-6.
37. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2.12.2 ed. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2011.

38. Ribeiro-Dasilva MCR, Line SRP, Santos MCLG, Arthuri MT, Hou W, Fillingim RB, Rizzatti-Barbosa CM. Estrogen receptor- $\alpha$  polymorphism and predisposition to TMJ disorder. *J Pain*. 2009;10:527–33.
39. Shabalina SA, Zaykin DV, Gris P, Ogurtsov AY, Gauthier J, Shibata K, Tchivileva IE, Belfer I, Mishra B, Kiselycznyk C, Wallace MR, Staud R, Spiridonov NA, Max MB, Goldman D, Fillingim RB, Maixner W, Diatchenko L. Expansion of the human mu-opioid receptor gene architecture: novel functional variants. *Hum Mol Genet*. 2009;18(6):1037-51.
40. Sia AT, Lim Y, Lim EC, Goh RW, Law HY, Landau R, Teo YY, Tan EC. A118G single nucleotide polymorphism of human mu-opioid receptor gene influences pain perception and patient-controlled intravenous morphine consumption after intrathecal morphine for postcesarean analgesia. *Anesthesiology* 2008;109:520–6.
41. Shi J, Hui L, Xu Y, Wang F, Huang W, Hu G. Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin. *Hum Mutat*. 2002;19(4):459-60.
42. Skarke C, Kirchhof A, Geisslinger G, Lötsch J. Comprehensive Mu-Opioid-Receptor Genotyping by Pyrosequencing. *Clinical Chemistry*. 2004;50(3):640-644.
43. Smith SB, Maixner DW, Greenspan JD, Dubner R, Fillingim RB, Ohrbach R, Knott C, Slade GD, Bair E, Gibson DG, Zaykin DV, Weir BS, Maixner W, Diatchenko L. Potential Genetic Risk Factors for Chronic TMD: Genetic Associations from the OPPERA Case Control Study. *J Pain*. 2011; 12(11): 92-101.
44. Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(4):1544-1549.
45. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000;18:6-9.
46. Uhl GR, Sora I, Wang Z. The  $\mu$  opiate receptor as a candidate gene for pain: Polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7752–7755.



47. Vossen H, Kenis G, Rutten B, van Os J, Hermens H, Lousberg R. The genetic influence on the cortical processing of experimental pain and the moderating effect of pain status. *PLoS One*. 2010; 5(10):1-6.
48. Zhang W, Chang YZ, Kan QC, Zhang LR, Lu H, Chu QJ, Wang ZY, Zhang J. Association of human micro-opioid receptor gene polymorphism A118G with fentanyl analgesia consumption in Chinese gynaecological patients. *Anaesthesia* 2010;65:130–5.

### **118A>G single nucleotide polymorphism and chronic pain in fibromyalgia: an association study**

Luana Maria Martins de Aquino<sup>1</sup>; Carolina Beraldo Meloto<sup>1</sup>; Maisa Soares Gui<sup>2</sup>; Marcele Jardim Pimentel<sup>1</sup>; Sergio Roberto Peres Line<sup>2</sup>; Rubens Reimão<sup>3</sup>; Célia Marisa Rizzatti-Barbosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Prosthesis and Periodontology, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Morphology, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Neurology, São Paulo University Medical School, São Paulo, SP, Brazil.

#### **Corresponding author**

Luana Maria Martins de Aquino

Department of Prosthesis and Periodontology, Piracicaba Dental School, State of Campinas  
Av. Limeira 901.

Zip Code: 13414-903.

Piracicaba, SP, Brazil

Tel./fax: +55 19 2106-5373

E-mail: luanaaquino@fop.unicamp.br

**Running title:** 118A>G polymorphism and fibromyalgia

## ABSTRACT

**Objective:** Pain in fibromyalgia (FM) may be involved with dysfunction in the modulating mechanism of pain sensitivity by endogenous opioid system. The  $\mu$ -opioid receptor (MOR) is encoded by the *OPRM1* gene and is the main target of exogenous and endogenous opioids, being able to mediate basal nociception and the 118A>G is the most common single nucleotide polymorphism (SNP) of the *OPRM1*. Because of this we hypothesized in this study that polymorphism 118A>G in *OPRM1* gene can be associated with chronic pain of fibromyalgia. **Methods:** Forty one women with fibromyalgia (FMG) and 66 health women (CG) were enrolled for DNA analyses. Participants were genotyped for the 118A>G (rs1799971) in the *OPRM1*. Genomic DNA was extracted from the saliva obtained with a 3% glucose mouthwash, the fragment of interest was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the alleles were identified using restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *DpnII* enzyme. Data collected were submitted to linear regression with additive model ( $\alpha = 0.05$ ). **Results:** The minor allele was observed in 10 women of FMG and 13 women of CG. The SNP was found not to be associated with pain in fibromyalgia ( $p=0.788$ ). **Conclusion:** The findings suggest that genetic variation in the rs1799971 polymorphism may not affect FM pain; however, futures studies could investigate different polymorphisms associated with fibromyalgia guiding an individual treatment.

Key words: fibromyalgia, opioid, genetic polymorphism, genotype.

## Introduction

Fibromyalgia (FM) is a common musculoskeletal syndrome of unknown etiology characterized by chronic, widespread and persistent pain, sleep disturbance, fatigue, stiffness, and presence of multiple tender points; it is estimated to affect about 2-4% of the population [1,2].

The notion that persistent pain may lead to neuroplastic changes within the peripheral and central nervous systems is now firmly established. Contemporary researches

into the mechanisms of pain in FM have identified this syndrome as a disorder of nociceptive processing [3,4,5], and it has become generally accepted that central sensitization and impaired descending pain modulation are two of the mechanisms causing widespread hypersensitivity to pain in FM [6,7]. In spite of that, the biological pathways underlying these mechanisms remain unclear.

One of the hypothesis is the reduced ability to recruit endogenous opioid inhibitory control of pain. The human  $\mu$ -opioid receptor, which is coded by the *OPRM1* gene, is a primary candidate for the pharmacogenetic variability of the clinical effects of opioid analgesics because it is the major site of action for most opioids that are established in clinical practice [8]. The 118G variant in the coding region of the first exon (118A>G, rs1799971, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) of the human  $\mu$ -opioid receptor gene (*OPRM1*) [9] encodes for the substitution of the aminoacid asparagine (asn) to aspartic acid (asp) at position 40 (*asn40asp*) of the extracellular N-terminal domain, resulting in the loss of a putative N-glycosylation site (one of five) [8]. As consequences, a number of studies have shown that the 118G variant is associated with less effective opioid analgesia, whereas the 118A variant seems to protect against opioid side effects [10,11,12,13,14].

Filligim *et al.* (2005) [15] have also investigated whether the 118A>G SNP of the *OPRM1* is associated with response to experimental pain, and they have found that subjects carrying the minor allele have significantly higher pressure pain thresholds than those homozygous for the major allele. Genotyping of the *OPRM1* 118A>G SNP also revealed that 118G allele is more frequently found in women than in men (25% and 17%, respectively), and a sex-by-genotype interaction emerged, in which the minor allele was associated with lower heat pain ratings among men but higher heat pain ratings among women. Therefore, *OPRM1* 118A>G SNP may alternatively affect different pain modalities.

Finan *et al.* (2010) [16] evaluated if variation in the catechol-O-methyltransferase (*COMT*) and  $\mu$ -opioid receptor (*OPRM1*) genes was associated with pain-related positive affective regulation in fibromyalgia (FM). Analyses revealed a significant gene experience interaction for *COMT*, such that individuals with *met/met* genotype experienced a greater decline in positive affect on days when pain was elevated than did either *val/met* or *val/val*

individuals. A gene experience interaction for *OPRM1* also emerged, indicating that individuals with at least one *asn40* allele maintained greater positive affect despite elevations in daily pain than those homozygous for the *asn40* allele. This findings offer researchers ample reason to further investigate the contribution of the catecholamine and opioid systems, and their associated genomic variants, to the still poorly understood experience of FM.

With this in mind, it is important to clarify whether the alternative variants for *OPRM1* 118A>G SNP are associated with chronic pain conditions, such as fibromyalgia. The recognition of so is of capital importance to support further investigations on the biological and molecular pathways affected by this genetic variation, which in turn, will reveal novel potential targets for genomic personalized treatment of chronic pain patients.

Thus, we have conducted a preliminary study with fibromyalgia patients and healthy volunteers to investigate if the *OPRM1* 118A>G SNP is associated with the chronic pain phenotype.

## **Materials and Methods**

### **Subjects**

One hundred seven Brazilian women were enrolled in this study, of which 41 met the American College of Rheumatology criteria for fibromyalgia (Fibromyalgia group) and 50 were healthy controls (control group). Volunteer patients and controls were recruited from the Clinical Hospital of the University of São Paulo (USP) and from the Dental Clinic of the State University of Campinas (Unicamp), respectively. Participants were between the ages of 36 and 79 years. All participants enrolled in this study have read and signed an informed consent form, previously approved by the Ethics Committee of both Institutions.

### **Genomic DNA extraction and SNP genotyping**

Genomic DNA was isolated from oral mucosa epithelial cells, obtained with a 3% glucose mouthwash [17]. DNA was amplified by polymerase chain reactions (PCR) in a final volume of 25 µl, containing 100ng of genomic DNA, 12.5 µl of Taq DNA polymerase mix (GoTaq Green Master Mix; Promega, Madison, WI, USA), and 1 µl of primers forward and reverse (5'GAA AAG TCT CGG TGC TCC TG3' and 5'GTT CGG ACC

GCA TGG GTC GGA CAG AT-3', respectively) [18]. PCR consisted of 30 cycles of 95°C for 30 s, 63°C for 30 s, and 72°C for 30 s, with 5 min of final extension at 72°C. Amplification products were verified for appropriate size (202 bp), and submitted to restriction digestion with *DpnII* for 1 hour at 37°C. Digestion products were then examined by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel. The persistence of the 202pb fragment indicates the A allele, while breakage to a 177pb and 25pb fragments indicate the G allele. Genotyping was conducted by individuals blinded to clinical study data and hypotheses.

#### Statistical analyses

Association analysis was performed using PLINK (version 1.07, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>)[19] and data were analyzed using linear regression with additive model. The  $\alpha$ -level was set at 0.05.

### Results

Mean age of fibromyalgia and control group was  $52.9 \pm 9.5$  and  $49.6 \pm 8.0$  years, respectively. We did not observe mean age difference among groups ( $p=0.076$ ). Linear regression results did not show association between SNP 118A>G genotypes and fibromyalgia ( $p=0.566$ ), according with Table 1. A similar result was maintained even when the linear regression analysis was adjusted for age ( $p=0.993$ ).

Table 1. Linear regression results for 118A>G.

| Genotype | Groups  |              | MAF    | OR   | SE    | CI           | P     |
|----------|---------|--------------|--------|------|-------|--------------|-------|
|          | Control | Fibromyalgia |        |      |       |              |       |
| AA       | 53      | 31           | 0.1075 | 1.31 | 0.477 | 0.515 – 3.35 | 0.566 |
| AG       | 13      | 10           |        |      |       |              |       |

MAF= minor allele frequency; OR= Odds Ratio; SE= Standard Error; CI= Confidence Interval.

### Discussion

Chronic pain conditions are prevalent in the general population. Pain sensitivity varies substantially among humans and is dependent on cultural, psychological and physiological factors. There is increasing evidence for the role of genetic factors in

individual variations in pain perception and the development of chronic pain conditions. Fibromyalgia is a chronic widespread pain disorder which is now recognized as one of many central pain syndromes. Increasing evidence supports a role for genetic factors in the development of FM [21]. It is well known that the 118A>G SNP of the  $\mu$ -opioid receptor gene affects opioid receptor function and pain responses [15,20,21]. However, we were not able to replicate these findings in this preliminary study, and to date, no other study has attempted to investigate the association between SNP 118A>G and fibromyalgia.

We have found a minor allele frequency (MAF) of 10.75% in our population sample, and no minor allele homozygotes. A simple search for rs1799971 on NCBI reference assembly reveals that these findings are similar to those that has been reported for Caucasian individuals, among which the MAF ranges from 11.9-17% and genotype frequency for G homozygotes ranges from 0-4.2% ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1799971](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799971)). These findings are also similar to genotype frequencies previously reported by other studies [15,22,23]. Nonetheless, minor allele G frequency differs substantially from population to another. For instance, the frequency of this allele is up to 50% in Japanese [11,14], and between 5% to 25% in African-American populations [10,24].

It is still controversial in the literature whether or not an increase in pain is observed in individuals carrying the minor allele. Finan *et al.* (2010) [16] have attempted to determine if genetic variations in the catechol-O-methyltransferase (*COMT*) and mu-opioid receptor (*OPRM1*) genes were associated with pain-related positive affective regulation in fibromyalgia (FM). Analyses revealed a significant gene  $\times$  experience interaction for both genes, and indicated that individuals with at least one copy of the G minor allele maintained greater positive affect despite of the elevations in daily pain than those homozygous for the major allele. Fillingim *et al.* (2005) [15] found different results for pressure pain threshold in relation to gender. Pain sensitivity was greater among men homozygous for the major allele A, whereas for women, greater sensitivity was found for heterozygous. However, Vossen *et al.* (2010) [25] observed no significant effects were found concerning the *OPRM1* A118G polymorphism and chronic low back pain. Huang *et al.* (2008) [26] observed that 118A>G SNP of the *OPRM1* gene is not associated with pressure pain

sensitivity in females. These studies differ in phenotype of our analysis. In our study, the phenotype was studied chronic pain in patients with fibromyalgia. And the hypothesis that SNP 118A>G is associated with chronic pain in patients with fibromyalgia was denied.

Although the findings regarding the association of SNP 118A>G with painful conditions are still controversial, it has been the center of interest of pharmacogenetic research addressing opioids. Its functional association with pain therapy is biologically reasonable because it affects the main target of clinically relevant opioid analgesics, the  $\mu$ -opioid receptor. Sequences containing the minor allele encode for an aspartic acid (D) instead of an asparagine (N) at position 40 of the receptor extracellular region, which affects a putative glycosylation site of the receptor [8]. Indeed, many studies have reported a relationship between minor allele and higher doses of analgesics [10, 11, 13, 14].

One potential reason for pain symptoms in FM may be inadequate descending antinociceptive activity. Research suggests that such activity may be deficient or absent in FM [27]. In humans, the two principal descending inhibitory pain pathways involve either norepinephrine/serotonin or opioids, but psychophysical studies are incapable of distinguishing which of these pathways may be affected. Harris *et al.* (2007) [28] detected decreased MOR availability in FM patients using  $\mu$ -opioid receptor (MOR) positron emission tomography, demonstrating a dysregulation of this neurotransmitter system in this disease. These findings indicate altered endogenous opioid analgesic activity in FM. However, hypothesis that SNP 118A>G in the *OPRM1* gene (rs1799971) is associated with chronic pain in fibromyalgia, wasn't supported. Further studies are required for the confirmation of our results in other populations. It is important to investigate different polymorphisms, mainly in the descending inhibitory pain pathways, in order to find possible association with chronic pain in fibromyalgia and guide an individual treatment.

## References

1. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, *et al.* The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification fibromyalgia. Report of the multicenter criteria committee. *Arthritis Rheum* 1990;33:160–172.



2. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ, Hebert L. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. *Arthritis Rheum* 1995;38:19–28.
3. Dadabhoy D, Crofford LJ, Spaeth M, Russell IJ, Clauw DJ. Biology and therapy of fibromyalgia. Evidence-based biomarkers for fibromyalgia syndrome. *Arthritis Research & Therapy* 2008;10(4):211.
4. Giovengo SL, Russell IJ, Larson AA. Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *Journal of Rheumatology* 1999;26(7):1564–1569.
5. Staud R, Domingo M. Evidence for abnormal pain processing in fibromyalgia syndrome. *Pain Medicine* 2001;2(3):208–215.
6. Perrot S, Dickenson AH, Bennett RM. Fibromyalgia: Harmonizing science with clinical practice considerations. *Pain Practice* 2008;8(3):177–189.
7. Staud R, Rodriguez ME. Mechanisms of disease: Pain in fibromyalgia syndrome. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2006;2(2):90–98.
8. Lötsch J, Geisslinger G. Are m-opioid receptor polymorphisms important for clinical opioid therapy? *Trends Mol Med* 2005;11(2):82-89.
9. Krosiak T, LaForge KS, Gianotti RJ, Ho A, Nielsen DA, Kreek MJ. The single nucleotide polymorphism A118G alters functional properties of the human mu opioid receptor. *J Neurochem* 2007;103: 77–87.
10. Klepstad P, Rakvåg TT, Kaasa S *et al.* The 118 A > G polymorphism in the human mu-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004 Nov;48(10):1232-9.
11. Chou WY, Yang LC, Lu HF *et al.* Association of mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50(7):787-92.
12. Oertel BG, Kettner M, Scholich K *et al.* A common human micro-opioid receptor genetic variant diminishes the receptor signaling efficacy in brain regions processing the sensory information of pain. *J Biol Chem* 2009;6:6530-6535.

13. De Capraris A, Cinnella G, Marolla A *et al.* Micro opioid receptor A118G polymorphism and post-operative pain: opioids' effects on heterozygous patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24(4):993-1004.
14. Liu YC, Wang WS. Human mu-opioid receptor gene A118G polymorphism predicts the efficacy of tramadol/acetaminophen combination tablets (ultracet) in oxaliplatin-induced painful neuropathy. *Cancer* 2012;118(6):1718-25.
15. Fillingim RB, Kaplan L, Staud R *et al.* The A118G Single Nucleotide Polymorphism of the  $\mu$ -Opioid Receptor Gene (*OPRM1*) Is Associated with Pressure Pain Sensitivity in Humans. *J Pain* 2005;6(3):159-167.
16. Finan PH, Zautra AJ, Davis MC, Lemery-Chalfant K, Covault J, Tennen H. Genetic influences on the dynamics of pain and affect in fibromyalgia. *Health Psychol* 2010;29(2):134-42.
17. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;18:6-9.
18. Gelernter J, Kranzler H, Cubells J. Genetics of two  $\mu$  opioid receptor gene (*OPRM1*) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol Psychiatry* 1999; 4(5):476–483.
19. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007, 81:559–575.
20. Lötsch, J, Stuck B, Hummel T. The human mu-opioid receptor gene polymorphism 118A>G decreases cortical activation in response to specific nociceptive stimulation. *Behav Neurosci* 2006;120:1218–1224.
21. Buskila D. Genetics of chronic pain states. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21(3):535-47.
22. Bruehl S, Chung OY, Burns JW. The mu opioid receptor A118G gene polymorphism moderates effects of trait anger-out on acute pain sensitivity. *Pain* 2009;139:406–415.
23. Janicki PK, Schuler G, Francis D *et al.* A genetic association study of the functional A118G polymorphism of the human mu-opioid receptor gene in patients with a with acute and chronic pain. *Anesth Analg* 2006;103:1011–7.

24. Bond C, LaForge KS, Tian M *et al.* Single nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters betaendorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(16): 9608–9613.
25. Vossen H, Kenis G, Rutten B, van Os J, Hermens H, Lousberg R. The genetic influence on the cortical processing of experimental pain and the moderating effect of pain status. *PLoS One* 2010 Oct 26;5(10):e13641.
26. Huang CJ, Liu HF, Su NY *et al.* Association between human opioid receptor genes polymorphism and pressure pain sensitivity in females. *Anaesthesia* 2008; 63:1822-1295.
27. Julien N, Goffaux P, Arsenault P, Marchand S Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain* 2005; 114:295–302.
28. Harris RE, Clauw DJ, Scott DJ, McLean SA, Gracely RH, Zubieta JK. Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *J Neurosci.* 2007; 27(37):10000-6.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

---

A revisão da literatura possibilitou verificar a comorbidade entre disfunção temporomandibular e a fibromialgia. Frequentemente, pacientes com FM apresentam sinais e sintomas de DTM. Portanto, a importância de uma avaliação precisa e adequada do sistema estomatognático em pacientes com FM é evidente e requer maiores cuidados no diagnóstico e na intervenção terapêutica. Neste capítulo também se pôde verificar que a patogênese da dor na FM e na DTM ainda não está bem estabelecida. Várias vertentes de estudos são encontradas na literatura, porém ainda não há um consenso sobre este assunto. Estudos na área de Biologia Molecular têm revelado que os fatores congênitos predispõem mais um indivíduo que o outro a apresentar os sintomas da dor crônica, tanto na FM (Vargas-Alarcon *et al.*, 2012; Mergener *et al.*, 2011) quanto nas DTM (Diatchenko *et al.*, 2006; Tchivileva *et al.*, 2010; Aneiros-Guerrero *et al.*, 2011).

É nesta linha de pesquisa que se encontram o segundo e terceiro artigos. Ambos objetivaram associar o fenótipo dor crônica com o polimorfismo de nucleotídeo único 118A>G (rs1799971). No capítulo II foram avaliadas mulheres portadoras de desarranjo interno da ATM com dor crônica, sem dor e mulheres saudáveis; e no capítulo III foram avaliadas mulheres com fibromialgia e mulheres saudáveis. Os resultados de ambos os capítulos foram semelhantes: não houve associação entre a presença do SNP 118A>G e o fenótipo de dor crônica para ambas as síndromes.

Como não foi observada associação do polimorfismo 118A>G do gene *OPRM1* com o fenótipo dor crônica, futuras pesquisas deverão ser direcionadas para outros polimorfismos que permitam esclarecer o porquê das alterações na expressão da dor em indivíduos portadores de DTM e de FM. Estes resultados certamente vão complementar a literatura na área de Biologia Molecular, que está em constante busca de associações entre alterações genéticas e condições patológicas, pois identificando estes polimorfismos, que podem estar em combinação, serão revelados novos alvos potenciais para o tratamento individualizado de pacientes com dor crônica.

## CONCLUSÕES

---

De acordo com os resultados deste estudo, podemos concluir que:

- Existe comorbidade entre fibromialgia e disfunção temporomandibular, visto que na literatura se observa uma alta prevalência de DTM em pacientes com FM.
- Não há associação entre o polimorfismo de nucleotídeo simples 118A>G (rs1799971) no gene receptor  $\mu$ -opióide 1 (*OPRM1*) e dor crônica em mulheres portadoras de desarranjo interno da articulação temporomandibular e em mulheres portadoras de fibromialgia.

## REFERÊNCIAS\*

---

1. Aneiros-Guerrero A, Lendinez AM, Palomares AR, Perez-Nevot B, Aguado L, Mayor-Olea A, *et al.* Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes, DRD4 and GSTM1 are related to temporomandibular disorder. *BMC Med Genet.* 2011; 12(75):1-9.
2. Arthuri MT, Garneiro GH, Tambeli CH, de Arruda Veiga MC. Peripheral effect of a kappa opioid receptor antagonist on nociception evoked by formalin injected in TMJ of pregnant rats. *Life Sci.* 2005; 76(10): 1177–88.
3. Belfer I, Wu T, Kingman A, Krishnaraju RK, Goldman D, Max MB: Candidate gene studies of human pain mechanisms: Methods for optimizing choice of polymorphisms and sample size. *Anesthesiology.* 2004; 100:1562-1572.
4. Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, *et al.* Single nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters b-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(16): 9608–13.
5. Bragdon EE, Light KC, Costello NL, Sigurdsson A, Bunting S, Bhalang K, *et al.* Group differences in pain modulation: pain-free women compared to pain-free men and to women with TMD. *Pain.* 2002; 96(3): 227–37.
6. Bennett RM. Emerging concepts in the neurobiology of chronic pain: Evidence of abnormal sensory processing in fibromyalgia. *Mayo Clinic Proceedings.* 1999, 74: 385-398.
7. Campa D, Gioia A, Tomei A, Poli P, Barale R. Association of ABCB1/MDR1 and *OPRM1* gene polymorphisms with morphine pain relief. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 83(4): 559-66.

---

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

8. Chou WY, Yang LC, Lu HF, Ko JY, Wang CH, Lin SH, *et al.* Association of mu-opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006; 50(7): 787-92.
9. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, *et al.* Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Gen* 2005;14(1):135–143.
10. Diatchenko L, Anderson AD, Slade GD, Fillingim RB, Shabalina SA, Higgins T, *et al.* Three major haplotypes of the b2 adrenergic receptor define psychological profile, blood pressure, and risk for development of a common musculoskeletal pain disorder. *Am J Med Gen Neuropsychiatr* 2006;141B(5):449–461.
11. Diatchenko L, Nackley AG, Tchivileva IE, Shabalina SA, Maixner W: Genetic architecture of human pain perception. *Trends Genet.* 2007; 23:605-613.
12. 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<sup>a</sup> March; 120: 273–281.
13. Dworkin SF, LeResche L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique. *J Craniomandib Disord.* 1992; 6(4): 301-355.
14. Dworkin SF. Temporomandibular disorder (TMD) pain-related disability found related to depression, nonspecific physical symptoms, and pain duration at 3 international sites. *J Evid Based Dent Pract.* 2011 Sep;11(3):143-144.
15. Edwards RR. Genetic predictors of acute and chronic pain. *Curr Rheumatol Rep.* 2006; 8(6): 411-417.
16. Fejer R, Hartvigsen J, Kyvik KO. Heritability of neck pain: A population-based study of 33794 Danish twins. *Rheumatology.* 2006; 45:589-594.
17. Han W, Ide S, Sora I, Yamamoto H, Ikeda K. A possible genetic mechanism underlying individual and interstrain differences in opioid actions: focus on the mu opioid receptor gene. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1025: 370-375.

18. Hartwig AC, Mathias SI, Law AS, Gebhart GF. Characterization and opioid modulation of inflammatory temporomandibular joint pain in the rat. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61(11): 1302-1309.
19. Herken H, Erdal E, Mutlu N, Barlas O, Cataloluk O, Oz F, *et al.* Possible association of temporomandibular joint pain and dysfunction with a polymorphism in the serotonin transporter gene. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120(3):308-313.
20. Hoehe MR, Köpke K, Wendel B, Rohde K, Flachmeier C, Kidd KK, *et al.* Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(19): 2895-2908.
21. Kajii TS, Okamoto T, Yura S, Mabuchi A, Lida J. Elevated levels of B-endorfine in temporomandibular joint synovial lavage fluid of patients with closed lock. *J. Orofac Pain.* 2005; 19:41-46.
22. Kashima K, Rahman OI, Sakoda S, Shiba R. Increased pain sensitivity of the upper extremities of TMD patients with myalgia to experimentally-evoked noxious stimulation: possibility of worsened endogenous opioid systems. *Cranio.* 1999; 17(4): 241-246.
23. Kim H, Neubert JK, San Miguel A, Xu K, Krishnaraju RK, Iadarola MJ, *et al.* Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain.* 2004; 109(3): 488–496.
24. Klepstad P, Rakvåg TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, *et al.* The 118A>G polymorphism in the human  $\mu$ -opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2004; 48(10): 1232-1239.
25. Koller G, Zill P, Rujescu D, Ridinger M, Pogarell O, Fehr C, *et al.* Possible Association Between OPRM1 Genetic Variance at the 118 Locus and Alcohol Dependence in a Large Treatment Sample: Relationship to Alcohol Dependence Symptoms. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012; 36(7): 1230-1236.



26. Kyrkanides S, Fiorentina PM, Miller JN, Gan Y, Lai YC, Shaftel SS, *et al.* Amelioration of Pain and Histopathologic Joint Abnormalities in the Col1-IL-1\_XAT Mouse Model of Arthritis by Intraarticular Induction of  $\mu$ -Opioid Receptor Into the Temporomandibular Joint. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(6): 2038-2048.
27. LaForge KS, Shick V, Spangler R, Proudnikov D, Yuferov V, Lysov Y, *et al.* Detection of single nucleotide polymorphisms of the human mu opioid receptor gene by hybridization or single nucleotide extension on custom oligonucleotide gelpad microchips: potential in studies of addiction. *Am J Med Genet.* 2000; 96(5): 604-615.
28. Larsson B, Bille B, Pedersen NL: Genetic influence in headaches: A Swedish twin study. *Headache.* 1995; 35:513-519.
29. Leblebici B, Pektas ZO, Ortancil O, Hürçan EC, Bagis S, Akman MN. Coexistence of fibromyalgia, temporomandibular disorder, and masticatory myofascial pain syndromes. *Rheumatol Int.* 2007; 27(6):541-554.
30. Lerman C, Wileyto EP, Patterson F, Rukstalis M, Audrain-McGovern J, Restine S, *et al.* The functional m opioid receptor (OPRM1) Asn40Asp variant predicts short-term response to nicotine replacement therapy in a clinical trial. *Pharmacogenomics J.* 2004; 4: 184–192.
31. Lötsch J, Geisslinger G. Are m-opioid receptor polymorphisms important for clinical opioid therapy? *Trends Mol Med.* 2005; 11(2): 82-89.
32. Liu YC, Wang WS. Human mu-opioid receptor gene A118G polymorphism predicts the efficacy of tramadol/acetaminophen combination tablets (ultracet) in oxaliplatin-induced painful neuropathy. *Cancer.* 2012 Mar 15;118(6):1718-1725.
33. Manfredini D, Winocur E, Ahlberg J, Guarda-Nardini L, Lobbezoo F. Psychosocial impairment in temporomandibular disorders patients. RDC/TMD axis II findings from a multicentre study. *J Dent.* 2010; 38(10): 765-772.
34. Markkula R, Järvinen P, Leino-Arjas P, Koskenvuo M, Kalso E, Kaprio J. Clustering of symptoms associated with fibromyalgia in a Finnish Twin Cohort. *Eur J Pain.* 2009; 13:744-750.

35. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, *et al.* Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*. 1996; 383(6603):819-823.
36. Mergener M, Becker RM, dos Santos AF, dos Santos GA, de Andrade FM. Influence of the interaction between environmental quality and T102C SNP in the HTR2A gene on fibromyalgia susceptibility. *Rev Bras Reumatol*. 2011; 51(6):594-602.
37. Mogil JS. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(14): 7744-7751.
38. Mogil JS, McCarron KE. Identifying pain genes: bottom-up and top-down approaches. *J Pain*. 2000 Sep;1(3 Suppl):66-80.
39. Mulder EJ, Van Baal C, Gaist D, Kallela M, Kaprio J, Svensson DA, *et al.* Genetic and environmental influences on migraine: A twin study across six countries. *Twin Res*. 2003; 6:422-431.
40. Nackley AG, Diatchenko L. Assessing potential functionality of catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms associated with pain sensitivity and temporomandibular joint disorders. *Methods Mol Biol*. 2010;617:375-393.
41. Oertel BG, Kettner M, Scholich K, Renné C, Roskam B, Geisslinger G, *et al.* A common human micro-opioid receptor genetic variant diminishes the receptor signaling efficacy in brain regions processing the sensory information of pain. *J Biol Chem*. 2009; 284(10): 6530-6535.
42. Ohmori O, Shinkai T, Hori H, Kojima H, Nakamura J. Polymorphisms of mu and delta opioid receptor genes and tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001; 52(1-2): 137-138.
43. Ojima K, Watanabe N, Narita N, Narita M. Temporomandibular disorder is associated with a serotonin transporter gene polymorphism in the Japanese population. *Biopsychosocial Med* 2007;1(3):1-4.
44. Romberg RR, Olofsen E, Bijl H, Taschner PE, Teppema LJ, Sarton EY, *et al.* Polymorphism of mu-opioid receptor gene (*OPRM1*:c.118A>G) does not protect against opioid-induced respiratory depression despite reduced analgesic response. *Anesthesiology*. 2005; 102(3): 522-530.

45. Sarlani E, Greenspan JD. Why look in the brain for answers to temporomandibular disorder pain? *Cells Tissues Organs*. 2005;180(1):69-75.
46. Shabalina SA, Zaykin DV, Ogurtsov AY, Gauthier J, Shibata K, *et al*. Expansion of the human um-opioid receptor gene architecture: novel functional variants. *Hum Mol Genet*. 2009; 18(6): 1037-1051.
47. Skarke C, Darimont J, Schimidt H, Geisslinger G, Lötsch J. Analgesic effects of morphine-6-glucuronide in a transcutaneous electrical pain model in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2003; 73(1): 107-121.
48. Smith SB, Maixner DW, Greenspan JD, Dubner R, Fillingim RB, Ohrbach R, *et al*. Potential Genetic Risk Factors for Chronic TMD: Genetic Associations from the OPPERA Case Control Study. *J Pain*. 2011; 12(11): 92-101.
49. Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, *et al*. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(4): 1544-1549.
50. Staud R. Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8(3):1-7.
51. Staud R. The role of peripheral input for chronic pain syndromes like fibromyalgia syndrome. *Journal of Musculoskeletal Pain*. 2008; 16: 67-74.
52. Staud R, Robinson ME, Price DD. Isometric exercise has opposite effects on central pain mechanisms in patients compared to normal controls. *Pain*. 2005; 118: 176-184.
53. Tan EC, Tan CH, Karupathivan U, Yap EP. Mu opioid receptor gene polymorphisms and heroin dependence in Asian populations. *Neuroreport*. 2003; 14: 569–572.
54. Tchivileva IE, Lim PF, Smith SB, Slade GD, Diatchenko L, McLean SA, *et al*. Effect of catechol-O-methyltransferase polymorphism on response to propranolol therapy in chronic musculoskeletal pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover pilot study. *Pharmacogenet Genomics*. 2010; 20(4):239-248.
55. Turk DC. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for patients with chronic pain. *Clin J Pain*. 2002; 18(6): 355-365.

56. Uhl GR, Sora I, Wang, Z. The  $\mu$  opiate receptor as a candidate gene for pain: Polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(14): 7752–7755.
57. Vargas-Alarcon G, Alvarez-Leon E, Fragoso JM, Vargas A, Martinez A, Vallejo M, *et al.* A SCN9A gene-encoded dorsal root ganglia sodium channel polymorphism associated with severe fibromyalgia. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012. 13(23):1-5.
58. Vierck CJJ. Mechanisms underlying development of spatially distributed chronic pain (fibromyalgia). *Pain*. 2006; 124: 242-263.
59. Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hallegua D, Silverman S, Silver D, Weisman MH. Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology*. 2001; 40: 743–749.
60. White KP, Specheley M, Harth M, Ostbye T. The London Fibromyalgia Epidemiology Study: The prevalence of Fibromyalgia Syndrome in London, Ontario. *J Rheumatol*. 1999; 26: 1570-1576.
61. Wilkie H, Osei-Lah A, Chioza B, Nashef L, McCormick D, Asherson P, *et al.* Association of mu-opioid receptor subunit gene and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology*. 2002; 59(5): 724–728.
62. Yaksh TL. Spinal system and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci*. 1999; 20(8): 329-337.
63. Yoshino S, Koiwa M, Shiga H, Nakamura H, Higaki M, Miyasaka N. Detection of opioid peptides in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1992; 19:660-661.

|  |   |   |
|--|---|---|
|   | <b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b><br><b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA</b><br><b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> |  |
| <b>CERTIFICADO</b>   |   |   |
| <p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "<b>Análise de polimorfismo do gene receptor micro-opiídeo (OPRM1) e estudo sobre prevalência, diagnóstico e tratamento alternativo em pacientes portadores de distúrbios do sono, fibromialgia, e disfunção temporomandibular</b>", protocolo nº 137/2009, dos pesquisadores Maisa Soares Gui, Célia Marisa Rizzatti Barbosa e Luana Maria Martins de Aquino, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 27/10/2009.</p>   |   |   |
| <p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "<b>Analysis of polymorphism gene of micro-opioid receptor (OPRM1) and study on prevalence, diagnosis and alternative treatment in patients with sleep disorders, fibromyalgia, and temporomandibular dysfunction</b>", register number 137/2009, of Maisa Soares Gui, Célia Marisa Rizzatti Barbosa and Luana Maria Martins de Aquino, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 10/27/2009.</p> |   |   |
|    |   |   |
| <b>Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas</b><br>Secretário<br>CEP/FOP/UNICAMP   | <b>Prof. Dr. Jacks Jorge Junior</b><br>Coordenador<br>CEP/FOP/UNICAMP   |   |
| <p><small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.<br/>Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p>   |   |   |

## **II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nós os pesquisadores, Máisa Soares Gui, Luana Maria Martins Aquino e Profª Dra. Célia M. Rizzatti Barbosa gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa: ANÁLISE DE POLIMORFISMO DO GENE RECEPTOR  $\mu$ -OPIÓIDE (OPRM1) E ESTUDO SOBRE PREVALÊNCIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO ALTERNATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE DISTÚRBIOS DO SONO, FIBROMIALGIA, E DISFUNÇÃO TEMPORMANDIBULAR.

As disfunções temporomandibulares, ou seja, as desordens da articulação da boca, associadas à fibromialgia apresentam importante impacto na qualidade de vida dos pacientes e determinam sérias incapacitações, portanto a busca por recursos alternativos para o tratamento da dor nessas disfunções em fibromiálgicos e o estudo da predisposição genética para a dor se fazem importantes na tentativa de minimizar o impacto, ou seja, os problemas que fibromialgia gera sobre a qualidade de vida destes pacientes.

#### **Objetivo do estudo:**

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, com o objetivo de investigar os seguintes sinais e sintomas presentes na fibromialgia: Distúrbios do sono, dor e desordem na articulação temporomandibular (ou seja, a articulação da boca). Se houver a presença da dor e desordem da articulação temporomandibular, o segundo objetivo deste trabalho será avaliar os efeitos da Estimulação Elétrica de Alta Voltagem (um aparelho da fisioterapia que estimula os músculos da face) na dor, no sono e a atividade elétrica dos músculos da face. Se não houver a presença de desordem nesta articulação ou se você não possui nem fibromialgia e nem a Disfunção temporomandibular o terceiro objetivo deste trabalho será investigar a existência de uma mudança genética que leva a uma maior sintomatologia dolorosa, ou seja, maior sensibilidade e persistência da dor.

#### **Explicação dos Procedimentos:**

Durante sua participação será realizado uma avaliação clínica, que consiste em perguntas a respeito de sua idade, profissão, endereço, doenças recentes e anteriores, uso de

medicamentos, gravidez, hábitos de vida, nutricionais, padrão de sono, tabagismo, uso de próteses dentais removíveis ou aparelhos ortodônticos entre outras. Será necessária também a avaliação da sua dor e a identificação de Disfunção Temporomandibular através de questionário, que você preencherá e vamos solicitar que você movimente sua boca no seu limite máximo e vamos anotar em centímetros esse valor. Não será realizado nem um procedimento invasivo.

Se for identificada a disfunção você será submetida à análise da atividade elétrica muscular que será captada por 2 eletrodos, fixados na pele, com esparadrapo, na lado esquerdo e direito da face e posteriormente será feito a aplicação da Estimulação elétrica de Alta Voltagem nos músculos da região lateral da face, por 30 minutos 1 vez na semana, durante 4 semanas. Sendo necessário um intervalo de 15 dias e a repetição do tratamento por mais 4 semanas.

Se você tem fibromialgia e não for identificada nenhuma disfunção na articulação da boca, ou se não possuir nenhuma disfunção e nem fibromialgia será coletada sua saliva através de um bochecho com solução de glicose. Da sua saliva será removida células para análise genética.

#### **Das informações:**

- A metodologia proposta é a única disponível para se atingir os objetivos do trabalho;
- As voluntárias não serão submetidas a riscos durante toda a fase do exame eletromiográfico ou aplicação da Estimulação elétrica de Alta Voltagem, ou mesmo durante a coleta de saliva. Será necessário somente à colocação de eletrodos na pele na lateral da face. Este procedimento não causa qualquer sensação dolorosa, você poderá, ou não, sentir somente um pequeno desconforto, ou seja, uma sensação de formigamento na face durante a aplicação da Estimulação Elétrica de Alta Voltagem.
- Possíveis Benefícios: Para todos os grupos a pesquisa possibilitará ampliar os conhecimentos sobre os sinais e sintomas da fibromialgia e Disfunção Temporomandibular e sua ligação com os Distúrbios do sono, qualidade de vida e predisposição genética para a dor. Para o grupo com as duas condições de dor: fibromialgia e a disfunção na articulação da boca espera-se que a aplicação da

Estimulação Elétrica de Alta Voltagem, nestes indivíduos, promova melhora da dor e equilíbrio do sinal eletromiográfico, com conseqüente melhora na qualidade de vida. Porém ressaltamos que estes benefícios são os esperados e, portanto podem não ocorrer em todos os voluntários.

- A voluntária tem garantia que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento quanto aos procedimentos, riscos ou benefícios da pesquisa. A principal investigadora (orientadora) é a Prof<sup>a</sup> Dra Célia Marisa Rizzatti Barbosa, que pode ser encontrado no endereço: Av. Limeira, n<sup>o</sup> Piracicaba/SP, Telefone(s) (19) 21065373, e a pesquisadora responsável: Maísa Soares Gui, tel: 19 81710130 / 19 34418728; **email: maisa\_gui@yahoo.com.br**; e demais pesquisadores: Luana Maria Martins de Aquino , tel: 19 88191231, Marcele Jardim (19) 8140-9232.
- Além dos atendimentos que vocês já recebem nos centros de estudos do sono no HC/FMUSP ou na clínica de odontologia de Piracicaba, você receberá acompanhamento durante todo o período de tratamento e avaliação da pesquisa por meio dos pesquisadores: Maisa Soares Gui e Luana Maria Martins de Aquino (telefones acima);
- Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP: Av Limeira 901, FOP-Unicamp, CEP 13414-903, Piracicaba – SP. Fone/Fax 19- 21065349, e-mail cep@fop.unicamp.br e webpage [www.fop.unicamp.br/cep](http://www.fop.unicamp.br/cep)”.
- Em qualquer fase do estudo, as voluntárias poderão retirar o termo de consentimento e com isso deixar de fazer parte do estudo, sem que isto leve a penalidade;
- Os pesquisadores asseguram a privacidade da voluntária quanto a sua identidade e aos dados envolvidos com o estudo. Os resultados obtidos neste estudo serão divulgados exclusivamente para fins acadêmicos;
- A única despesa que a voluntária terá com a participação no projeto será com o transporte, sendo o valor do bilhete pago a mesma pelos pesquisadores;
- Na eventualidade de qualquer dano decorrente da pesquisa, os pesquisadores asseguram o tratamento integral da voluntária sem nenhum custo financeiro às mesmas e na presença de qualquer intercorrência decorrente da pesquisa, a voluntária será encaminhada imediatamente ao médico, sem qualquer custo ao mesmo;



- **Uma cópia do projeto de pesquisa estará à disposição das voluntárias para consulta e/ou esclarecimentos de dúvidas no Centro de Estudos do Sono do Hospital das Clínicas da FCM da USP – São Paulo e no Laboratório de Eletromiografia (Setor de Anatomia) da FOP/Unicamp e uma cópia deste termo de consentimento será entregue às voluntárias.**
- Os procedimentos desta pesquisa estão de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos atendendo à Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde – Brasília/DF;
- O local dos exames será o Centro de Estudos do Sono do Hospital das Clínicas de São Paulo e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Clínica de Pós Graduação;
- Ao final das pesquisas, se você manifestar o desejo, poderá ser entregue via correio o resultado da análise genética decorrente da coleta de saliva, a qual será feita pela pesquisadora Luana Maria Martins Aquino.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Eu discuti com o Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e se houver prejuízos imprevisíveis decorrentes da pesquisa tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço, ou a qualquer prejuízo, inclusive quanto ao tratamento clínico que porventura tenha direito independentemente da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_, CPF nº \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “ANÁLISE DE POLIMORFISMO DO GENE RECEPTOR  $\mu$ -OPIÓIDE (OPRM1) E ESTUDO SOBRE PREVALÊNCIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.

### III - Carta de aceite do capítulo 1 desta tese na revista **Brazilian Dental Science**

## Correspondência entre Editor/Autor

2012-10-09 02:25

Assunto: [BDS]Artigo Aceito - "Disfunção Temporomandibular na Fibromialgia: Uma Visão Crítica"

Prezados autores Luana Maria Martins de Aquino, Maisa Soares Gui, Marcele Pimentel, Rubens Reimão e Célia Marisa Rizzatti-Barbosa,

Comunicamos que o artigo intitulado "Disfunção Temporomandibular na Fibromialgia: Uma Visão Crítica" foi cuidadosamente avaliado pelos revisores, que aprovaram o trabalho para publicação no próximo número da revista.

O trabalho passará agora pelo processo de edição e revisão de língua portuguesa e inglesa, bem como correções de normalização técnica. Antes da publicação enviaremos a versão final para a aprovação. Agradecemos o interesse em publicar na Brazilian Dental Science.

Att.

Lucélia Lemes Gonçalves

--

Comissão Editorial

Brazilian Dental Science

Brazilian Dental Science

(Ciência Odontológica Brasileira)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista - UNESP

<http://ojs.fosjc.unesp.br/index.php/cob>

<http://ojs.fosjc.unesp.br/index.php/cob/author/viewEditorDecisionComments/777#287>