

UNIVERSIDAD DE MALAGA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e
Inmunología

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE ENZIMAS DEL
METABOLISMO DE LOS FOLATOS, DRD4 Y GSTM1
Y SU RELACIÓN CON LA DISFUNCIÓN
TEMPOROMANDIBULAR**

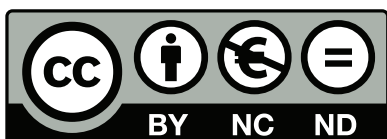
TESIS DOCTORAL

ÁNGEL ANEIROS GUERRERO

MÁLAGA 2014

AUTOR: Ángel Aneiros Guerrero

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

D. Armando Reyes Engel, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Inmunología y Catedrático del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA que Ángel Aneiros Guerrero, licenciado en Medicina por la Universidad de Granada, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado: ***POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS ENZIMAS DEL CICLO DE LOS FOLATOS, DRD4 Y GSTM1 Y SU RELACIÓN CON LA DISFUNCIÓN TEMPOROMANDIBULAR***, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor

Lo que certifico, a petición del interesado y como es preceptivo, para que conste donde convenga y a los efectos oportunos, en Málaga a 31 de Marzo de 2014

Dr. Armando Reyes Engel

Director

A mis padres Carlos y María Teresa

a mi hermana Isabel

y a mis hijos Carlos, Ángel y María Teresa

AGRADECIMIENTOS

Quizás sea lo más difícil expresar "estar agradecido". En esta andadura de cinco años han sido muchas las personas que me han animado a llevar a cabo este proyecto; siempre he intentado rodearme de todos aquellos de los que pueda aprender, enriquecerme con su ejemplo, sus conocimientos, el rigor científico, docentes, de los que me he enriquecido en conocimientos. He llevado en mi ejercicio como médico y odontólogo la experiencia basada en la evidencia clínica. Pero siempre en los avances de la medicina hay una base de conocimientos bioquímicos, genéticos, moleculares y principios biológicos, llevados a cabo por mentes privilegiadas dedicadas a la investigación que nos resulta entender por qué la disfunción normal biológica humana conlleva a la enfermedad.

Tuve la gran suerte hace muchos años en The Royal London Hospital, Whitechapel, Londres, mientras hacia mi especialidad, conocí un grupo de investigadores de la Universidad de Málaga, que siempre estaban hablando en temas de ciencias médicas básicas, publicando multitud de artículos; yo poco sabía del ADN, inmunología... Conviviendo con ellos en la adversidad, creció por mi parte curiosidad y admiración por "la existencia de médicos que solo les importaba

el por qué intrínseco de la disfunción molecular humana”. Allí aprendí de ellos que la docencia se basa en la investigación. La coincidencia de estar en el mismo hospital y en el mismo tiempo me dio el privilegio de conocer a muy especiales personas que de algún modo del soporte mutuo me cambiaron a mejor en lo humano en la adversidad que nos rodeaba.

Por lo anteriormente dicho estoy especialmente en débito e infinitamente agradecido:

Al Profesor Don, Armando Reyes Engel, por su enorme dedicación, entusiasmo y extremada paciencia en la dirección de esta arduo trabajo. Gracias por tu confianza y la oportunidad que me has dado de desarrollar el presente trabajo de investigación.

Al Profesor Don Maximiliano Ruiz, como tutor en la elaboración de esta tesis. Maxi, ¿que no podría decirde su efectividad?. Además en el tratamiento del texto han sido de extrema ayuda. Me dió ese empujón en el cansancio final.

Al Profesor Don José Pavía, gracias a sus ánimos, estímulo, soporte y consejos; han sido siempre de inestimable ayuda. Has sido de enorme consideración en lo referente a la persuasión y optimismo del que me ha contagiado.

También quiero mostrar mi especial agradecimiento a los participantes en este proyecto de investigación. Ana Lendínez, Beatriz Pérez-Nevot, Arturo Reyes Palomares, Álvaro Mayor Olea y Lidia Aguado, sin cuya colaboración no hubiera sido posible la publicación en revistas científicas de este trabajo.

Gracias, enormes gracias, en este largo recorrido, habéis sido las columnas que han dado fruto a un genuino trabajo. Siento un enorme orgullo.

ÍNDICE

INDICE	Página
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR	9
1.1.1. Anatomía de la articulación temporomandibular.....	9
1.1.2. Histología de la articulación temporomandibular.....	12
1.1.3. Embriología de la articulación temporomandibular.....	18
1.2. LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES COMO ENTIDAD CLÍNICA	23
1.2.1. Breve historia de los trastornos temporomandibulares.....	23
1.2.2. Definición y terminología de los trastornos temporomandibulares.....	26
1.2.3. Etiología de los trastornos temporomandibulares.....	28
A. Factores oclusales.....	29
B. Bruxismo.....	30
C. Laxitud articular.....	31
D. Trauma externo.....	31
E. Afecciones craneomandibulares.....	32
F. Factores de salud general.....	32
G. Factores nutricionales.....	34

H. Factor hormonal.....	36
I. Factores Psicológicos.....	36
1.2.4. Manifestaciones clínicas y diagnóstico de los trastornos temporomandibulares.....	41
1.2.4.1. Signos y síntomas de los trastornos temporomandibulares.....	42
1.2.4.2. Medida del dolor facial.....	43
1.2.4.3. Clasificación de los trastornos temporomandibulares..	44
1.3. EL METABOLISMO DE LOS FOLATOS Y SU RELACIÓN CON LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES.....	49
1.3.1. Formas de los folatos.....	50
1.3.2. El ciclo de los metilos activados.....	54
1.3.2.1. Recuperación de metionina (Remetilación).....	55
1.3.2.2. Vía de la transulfuración: síntesis de cisteína.....	58
1.3.3. Los folatos y la síntesis de bases púricas.....	59
1.3.4. Formación de desoxitimidilato.....	60
1.3.5. Metabolismo de los aminoácidos.....	61
1.3.6. Esquema general del metabolismo de los folatos.....	62
1.4. OTROS ASPECTOS MOLECULARES RELACIONADOS CON LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES.....	64

1.4.1. Las hormonas sexuales y los trastornos temporomandibulares.....	64
1.4.2. Generación de radicales libres y trastornos temporomandibulares.....	65
1.4.3. Aspectos moleculares de la sensación dolorosa y su relación con los trastornos temporomandibulares.....	66
OBJETIVOS.....	69
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	71
2.2 HIPOTESIS.....	72
2.2.1 General.....	72
2.2.2.Pormenorizadas.....	73
2.3 OBJETIVOS.....	74
2.3.1 General.....	74
2.3.2 Objetivos específicos.....	75
MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	79
3.2 SELECCIÓN DE PACIENTES.....	79
3.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN.....	82
3.4 TÉCNICAS DE GENOTIPADO.....	83

3.4.1	Análisis de SNPs: amplificación de DNA en multiplex y minisequenciación.....	84
3.4.2	Análisis de fragmentos: PCR multiplex y detección del tamaño amplificado.....	89
3.5	PROTOCOLO PARA EL GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS.....	90
3.5.1	Protocolo para el genotipado de SNPs.....	93
3.5.2	Protocolo para el genotipado de fragmentos.....	97
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	99
	RESULTADOS	103
4.1	EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	105
4.2	ANÁLISIS DE RIESGO DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS.....	109
4.2.1	Gen de la serinahidroxi metiltransferasa tipo 1 (SHMT1).....	111
4.2.2	Gen de la metil tetra hidrofolato deshidrogenasa tipo 1 (MTHFD1).....	111
4.2.3	Gen de la metionina sintetasa reductasa (MTRR).....	112
4.2.4	Gen de la glutación s transferasa (GSTM1).....	113
4.2.5	Gen del receptor D4 de la dopamina (DRD4).....	114

4.3 ANÁLISIS DE FRECUENCIA POR SEXO EN CONTROLES SANOS Y TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES.....	115
DISCUSIÓN	123
5.1 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL EJE FOLATOS METIONINA Y TRASTORNO TEMPOROMANDIBULAR.....	131
5.2 POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS TRASTORNOS TEMPORO- MANDIBULARES.....	138
5.3DIMORFISMO SEXUAL Y TRASTORNOS TEMPOROMAN- DIBULARES.....	140
5.4 GENES RELACIONADOS CON EL COMPORTAMIENTO PSI- COSOCIAL Y TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES	142
CONCLUSIONES	145
BIBLIOGRAFÍA	149
PUBLICACIONES	179

ABREVIATURAS

AAOP: American Academy of Orofacial Pain.

ABCB1: ATP-Binding Cassette tipoB1.

ADA: American Dental Association.

ATM: articulación temporomandibular.

ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotioformiltransferasa/IMP ciclohidrolasa.

BHMT: betaínahomocisteínametiltransferasa.

CBS: cistationina- β -sintetasa.

CMD: disfunción cráneo-mandibular.

Cys: cisteína.

DHF: dihidrofolato.

DHFR: dihidrofolatoreductasa.

DNMT: DNA metiltransferasa.

DRD4: receptor D4 de la dopamina.

DTM: disfunción/desorden temporomandibular.

dTMP: desoxitimidilato.

DTN: defectos del tubo neural.

dUMP: desoxiuridilato.

ESR1: receptor de estrógeno tipo 1.

FRG: análisis de fragmentos.

FTS: formiltetrahidrofolatosintetasa.

GART: glinamicaribonucleotidotransformilasa.

GSTM1: glutatión s transferasa tipo mu 1.

Hcy: homocisteína.

IBS: síndrome de intestino irritable.

MD: disfunción mandibular.

Met: metionina.

MPDS: síndrome de dolor miofacial.

MTHFD: metilentetrahidrofolato deshidrogenasa.

MTHFD1: metilentetrahidrofolato deshidrogenasa tipo 1.

MTHFR: metilentetrahidrofolatoreductasa.

MTR: metionina sintetasa.

MTRR: metionina sintetasa reductasa.

N⁵-metilTHF: N⁵-metiltetrahidrofolato.

N⁵, N¹⁰-metilenTHF: N⁵, N¹⁰-metilentetrahidrofolato.

N⁵, N¹⁰-metenilTHF: N⁵, N¹⁰-meteniltetrahidrofolato.

N¹⁰-formilTHF: N¹⁰-formiltetrahidrofolato.

NIDCR: Instituto Nacional de Investigación Dental Craneofacial.

NIH: Instituto Nacional de la Salud.

OMD: disfunción oromandibular.

Pb: pares de bases.

PCR : reacción en cadena de la polimerasa.

RFC1: transportador de folatos reducidos tipo 1.

SAH: S-adenosinhomocisteína.

SAM: S-adenosilmetionina.

SEDCYCO: Sociedad española de disfunción craneomandibular y dolor orofacial.

Ser: Serina.

SFC: síndrome de fatiga crónica.

SHMT: serinahidroximetiltransferasa.

SLC6A4: familia 6 de transportador de solutos tipo A4 (transportador de serotonina).

SNP: polimorfismos de una sola base.

SSF: síndromes somáticos funcionales.

TCN: transcobalamina II.

TDPM: trastorno disfórico premenstrual.

THF: tetrahidrofolato.

Tm: temperatura de fusión.

TMD: temporomandibular disfunction.

TTM: trastorno temporomandibular.

TYMS: timidilatosintetasa.

VNTR: número variable de repeticiones en tándem.

INTRODUCCION

1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR

1.1.1. ANATOMÍA DE LA ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR

La articulación temporomandibular (ATM) es una articulación gínglimoartrodial: es decir, que es capaz de tener movimientos de rotación y traslación. La ATM está formada por el cóndilo mandibular adaptado en conexión con la fosa mandibular del hueso temporal (Figura 1).

El disco articular separa estos dos huesos de un contacto directo. La parte articular del disco se compone de denso tejido conectivo fibroso carente de nervios y vasos; sin embargo, la conexión posterior del disco está ricamente vascularizada e inervada.

El disco se adjunta al cóndilo tanto lateralmente como medialmente por ligamentos colaterales. Los movimientos de rotación se producen entre el cóndilo y la superficie inferior del disco durante la apertura inicial (el espacio común inferior), y la traslación tiene lugar en el espacio entre la superficie superior del disco y la fosa (el espacio común superior) al final de la apertura bucal.

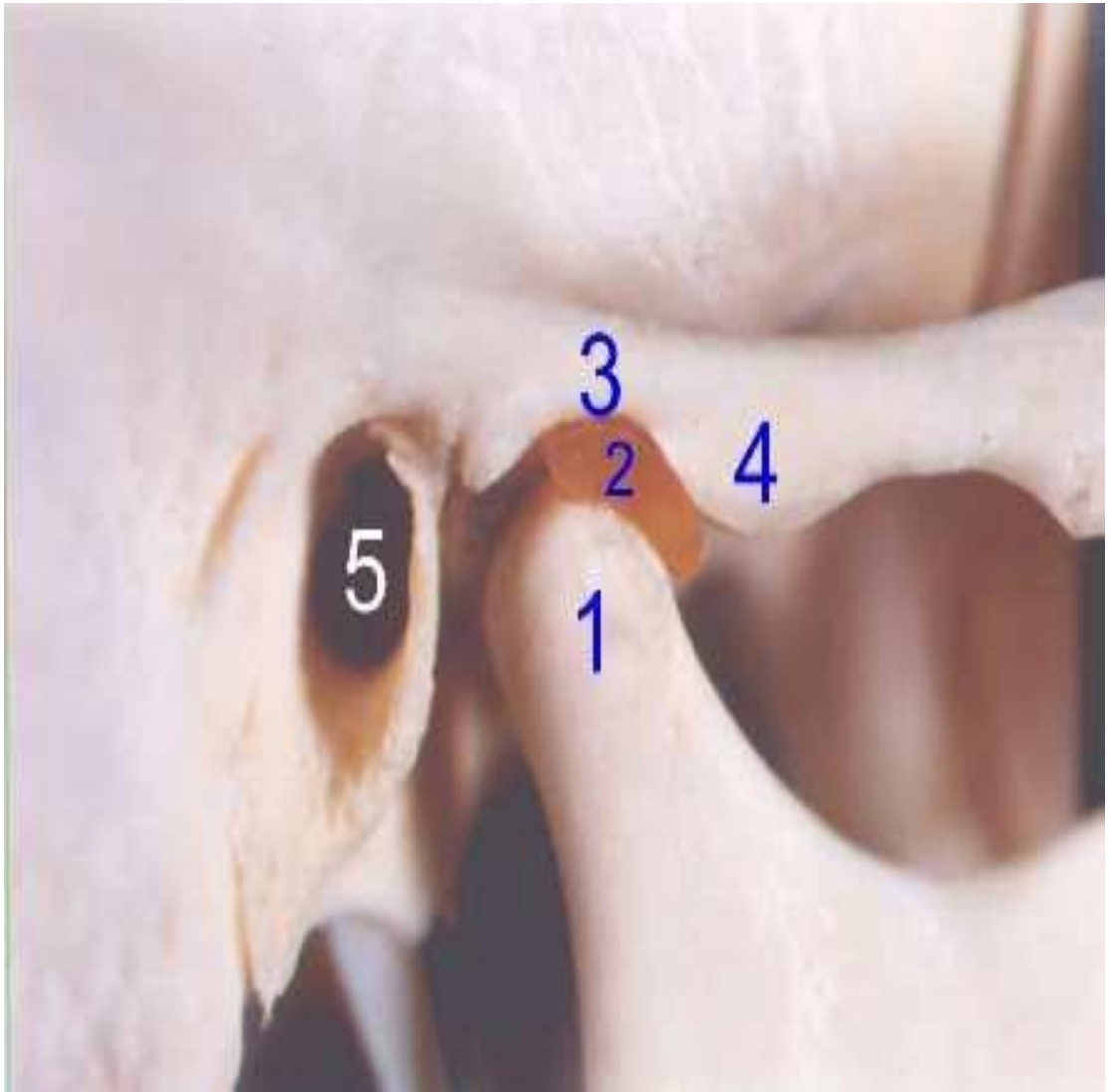


Figura 1: Estructura de la articulación temporomandibular.

1. *Cóndilo mandibular.*
2. *Menisco o disco articular.*
3. *Cavidad glenoidea o fosa mandibular del temporal.*
4. *Eminencia o tubérculo del temporal.*
5. *Conducto auditivo externo.*

El líquido sinovial en la articulación facilita el movimiento dentro de la articulación; también sirve como un medio para el transporte de nutrientes y productos residuales de las superficies articulares.

El disco de la ATM está compuesto de denso tejido conectivo fibroso, que es principalmente deficiente en vasos sanguíneos y fibras nerviosas. El disco se encuentra entre el cóndilo de la mandíbula y la fosa mandibular del hueso temporal. El disco divide la cavidad común en dos componentes distintos: el compartimento superior y el compartimento inferior. La cavidad superior está delimitada por la fosa mandibular y la superficie superior del disco. La cavidad inferior colinda con el cóndilo mandibular y la superficie inferior del disco. Cada compartimento está lleno de un líquido sinovial que es segregado por las células del revestimiento sinovial. Dado que el disco articular y las superficies articulares de la articulación están desprovistos de vascularización, el líquido sinovial actúa como un vehículo para proporcionar requisitos metabólicos para estos tejidos. También, el líquido sinovial ayuda a minimizar la fricción por servir como lubricante entre todas estas superficies articulares (Okeson, 1998).

La morfología del disco coincide con la forma de la cabeza del cóndilo y la fosa mandibular. En la vista frontal el disco es cóncavo, diseñado para encajar en la cabeza del cóndilo, y convexo superiormente para

adaptarse a la superficie cóncava de la fosa mandibular del hueso. La cara antero-superior del disco es cóncava por delante (para adaptarse a la eminencia temporal), mientras que es convexa por detrás (para adaptarse a la cavidad glenoidea). La cara postero interior cubre al cóndilo en todas partes por completo, estando el borde posterior y la extremidad externa unidos al cuello del condilo, de forma que el disco articular acompaña al cóndilo en todos sus movimientos, de rotación y translación (Laskin y Hylander, 2006).

En el plano sagital, puede dividirse en tres regiones de acuerdo al espesor. La zona central es la más delgada; las regiones anteriores y posteriores son mucho más gruesas en comparación. Desde la vista anterior, el disco es más grueso medialmente que lateralmente. El disco articular se adjunta posteriormente a una región de tejido conectivo suelto, conocido como el tejido retrodiscal, que está altamente vascularizado e innervado (Okeson, 1998).

1.1.2. HISTOLOGÍA DE LA ARTICULACIÓN TEMPORO-MANDIBULAR

El cartílago del cóndilo mandibular está compuesto por cuatro capas o zonas (Figura 2):

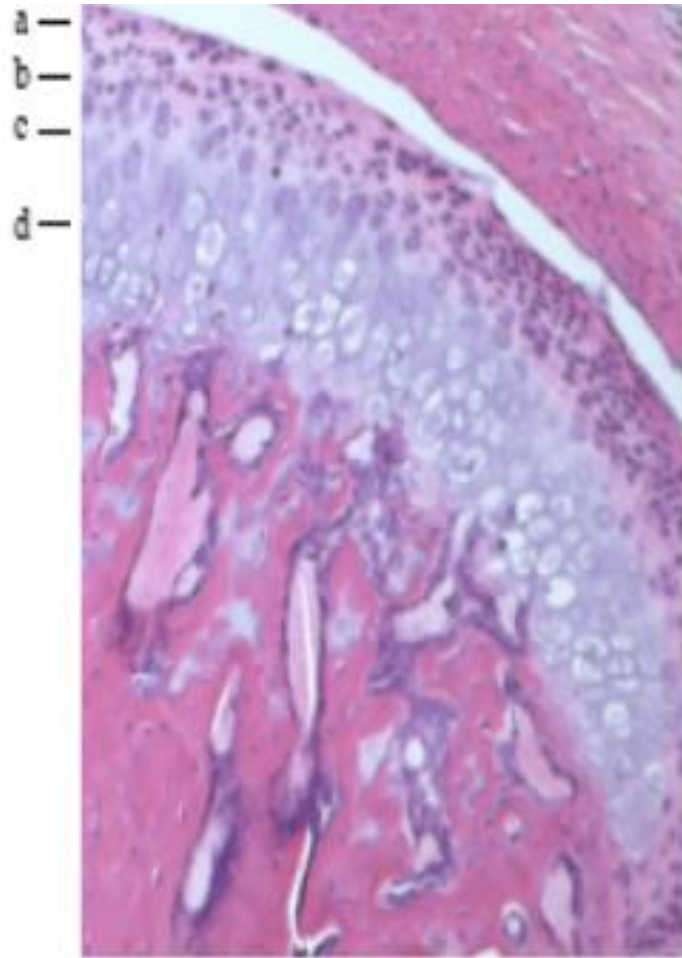


Figura 2 *Histología del cartílago mandibular.*

- a. *Zona articular*
- b. *Zona polimórfica o proliferativa*
- c. *Zona aplanada o condroblástica*
- d. *Zona hipertrófica*

La capa más superficial se denomina la **zona articular** o la zona superficial. Se encuentra adyacente a la cavidad común y forma la

superficie funcional ultraperiférica. Esta zona es responsable de disipar las cargas de fricción generadas por las funciones de la mandíbula. Una manera de lograr esto es por la expresión de una proteína llamada proteína de zona superficial (Ohno et al, 2006). Esta proteína es un proteoglicano grande sintetizado y secretado por líquido sinovial. Se sabe que funciona como un lubricante en las superficies de contacto en uniones articulares reduciendo el coeficiente de fricción de la superficie del cartílago cóndilo-mandibular y la energía de tensión del líquido sinovial (Jay et al, 2007).

La segunda zona es la **zona polimórfica o proliferativa**. Esta zona es principalmente celular con tejidos mesenquimales indiferenciados. Las células del cartílago en esta capa son grandes y cerradas en lagunas. No hay ninguna organización de formación o disposición de las células del cartílago en esta capa. Este tejido es responsable de la proliferación del cartílago articular en respuesta a las exigencias funcionales colocado sobre las superficies articulares durante la carga y descarga. Esta zona se caracteriza por la expresión de Sox-9 y la ausencia de la expresión de colágeno tipo II (Shibukawa et al, 2007).

La tercera zona es la **zona aplanada o condroblástica**. Las células del cartílago en esta región son muy maduras. Aun las células del cartílago no han perdido su capacidad de proliferación. El cartílago aparece en

una orientación aleatoria, proporcionando una red tridimensional que ofrece resistencia contra las fuerzas de compresión y laterales. Las células en esta capa se caracterizan por la expresión de Sox 9, colágeno tipo I y II (Shibukawa et al, 2007).

La **zona** más profunda y cuarta es la **hipertrófica**. En esta zona los condrocitos se vuelven hipertróficos, mueren y tienen sus citoplasmas evacuados, formando hueso dentro de la cavidad medular. Se produce la ruptura del cartílago y las espículas cartilagosas sufren una calcificación con cristales de hidroxapatita. La superficie de los andamios de la matriz extracelular proporciona un sitio activo para la remodelación de la actividad como producto del crecimiento de hueso endosteal. Más profundo en la zona, están presentes espacios de hueso y médula ósea. Las trabéculas óseas están dispuestas al azar y no perpendiculares a la superficie articular. Las células en esta zona se caracterizan por la expresión de proteína Hedgehog, osteonectina y colágeno tipo X (Shibukawa et al, 2007).

La ATM es diferente en la composición y el desarrollo a otras uniones en el cuerpo. Por lo tanto, no resulta sorprendente que haya ciertas enfermedades que afectan sólo a algunas articulaciones en el cuerpo excepto la ATM. Por el contrario, es probable que la distribución de edad y género única de los trastornos temporomandibulares (TTM)

pueda derivarse de estas diferencias entre la ATM y las otras articulaciones sistémicas.

En las otras articulaciones sinoviales del cuerpo, las superficies articulares están cubiertas por cartílago hialino. La ATM es diferente porque se compone de fibrocartílago, que contiene ambos tipos, I y II de colágenos, en comparación con el cartílago hialino articular, que sólo contiene colágeno tipo II (Benjamin y Ralphs, 2004). El fibrocartílago es más resistente contra fuerzas puras que el cartílago hialino, lo que le convierte en un material superior para soportar la gran cantidad de carga oclusal que se proyecta en el ATM.

Otra diferencia entre la ATM y las otras articulaciones es que el cartílago del cóndilo de la mandíbula es un cartílago secundario en comparación con el cartílago articular que se encuentra en otras articulaciones, el cual es un cartílago primario (Symons, 1965). Concretamente, el cartílago secundario es el que se desarrolla en asociación con huesos específicos formados por osificación intramembranosa después que ya están formados los huesos. Esto es diferente del cartílago primario, donde el cartílago precede a la formación de hueso. El crecimiento del cartílago primario comienza en las células del cartílago, dentro de la capa central de una placa epifisaria. En esta etapa de desarrollo, las células sufren mitosis. En la

próxima fase de crecimiento epifisario, las dos células hijas agrandan el tamaño del original. Cada célula produce y segrega la matriz extracelular, que hace que las células deriven lejos una de la otra. Las células, o bien pueden convertirse en una nueva célula progenitora, o ser reemplazadas por hueso. Uno de los elementos claves del crecimiento de cartílago principal es que dicho crecimiento se produce en la parte central de una placa epifisaria de un hueso largo (Shen y Darendeliler, 2005).

El crecimiento del cartílago secundario del cóndilo comienza con células indiferenciadas compuestas de tejido mesenquimal, cubriendo el cóndilo prenatal o postnatal. En las etapas de desarrollo, las células mesenquimales se dividen dentro de sí mismas para convertirse en células más pequeñas, para que eventualmente alcancen el tamaño completo. Estas células mesenquimales luego migran hacia el interior del cóndilo y desde allí al cartílago, donde ocurre la diferenciación y las células se convierten en células de cartílago inmaduro, por lo que el crecimiento del cartílago se produce a través de la diferenciación del tejido mesenquimal, en lugar de por mitosis de las células progenitoras de cartílago (Shen y Darendeliler, 2005).

1.1.3. EMBRIOLOGÍA DE LA ARTICULACIÓN TEMPORO-MANDIBULAR

Las estructuras primarias que conforman la articulación se establecen en la 14ª semana de gestación, cuándo se producen cambios morfológicos, los cuales ocurren gradualmente con el crecimiento y conducen al aumento de tamaño de las estructuras que la conforman.

Durante la séptima semana de vida intrauterina, cuando la mandíbula no realiza contacto con la base del cráneo, se desarrolla una articulación transitoria entre huesos que se forman en el extremo posterior del cartílago de Meckel, con la base del cráneo. Por lo tanto, el proceso embriológico precedente a la compleja formación de la articulación temporomandibular y cualquier alteración de su desarrollo determinan una disfunción que traerá consigo malestar consistente en dolor nervioso y muscular, dificultades masticatorias, complicaciones musculares y anquilosis, entre otros.

De la sexta a la octava semana de gestación aparece el primer esbozo de la formación de la mandíbula. Esta ocurre por diferenciación del primer arco faríngeo. Este arco se convierte en dos zonas cartilaginosas que se sitúan en el margen superior y en el margen inferior (cartílago de Meckel), dando origen a la mandíbula primitiva.

Las extremidades posteriores de ambos cartílagos se unen para formar una articulación que a menudo se conecta con el cráneo y que suspende la mandíbula. A esta articulación se le llama articulación cuadrado articular primitiva o meckeliana y puede accionarse externa o internamente, proporcionando un margen de seguridad funcional muy alto con respecto a muchas de las disfunciones que puede presentar por defecto.

La ATM se origina de dos blastemas: condilar y glenoidea. Interpuesta entre las blastemas aparece una capa de tejido mesodérmico que va a constituir el futuro disco articular. El proceso que se inicia en la séptima semana de gestación culmina a las 21 semanas, cuando se encuentra completamente formada la articulación. A las 40 semanas de gestación la cavidad glenoidea es plana. La erupción dentaria va configurando su concavidad, la misma que continua su proceso de formación hasta aproximadamente el primer tercio de la vida del hombre, adquiriendo su completo desarrollo entre los 11 y 14 años, hasta completar su tamaño final hacia los 25 años de vida (Perry et al, 1985).

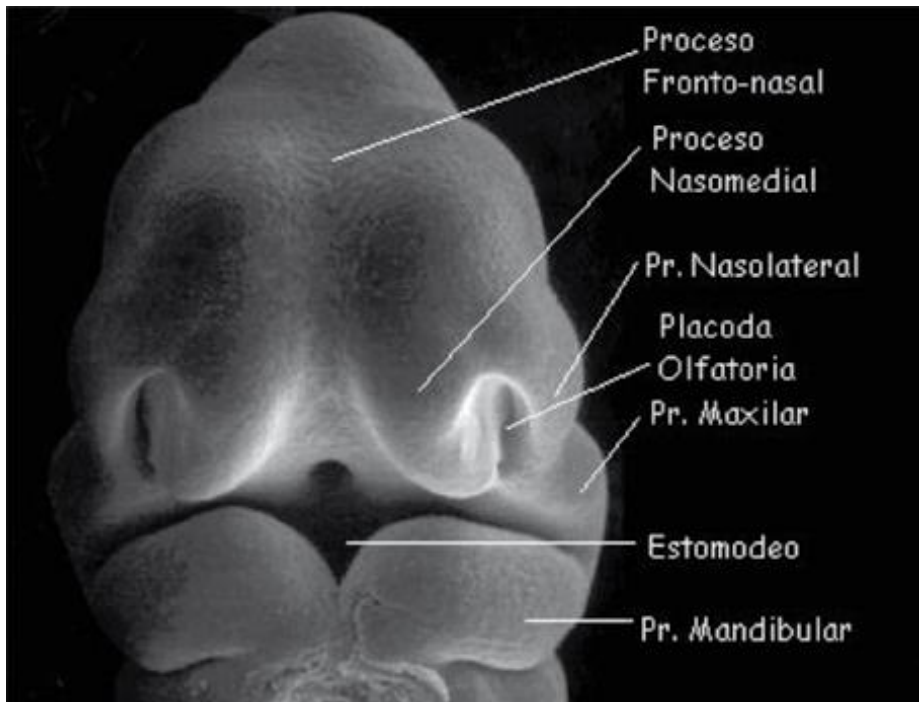


Figura 3: Esquema de los cartílagos de los arcos faríngeos. Vista frontal de un embrión de 24 días

La ATM es propia de los mamíferos, ya que en vertebrados inferiores la mandíbula está formada por varios huesos que incluyen al hueso dental, que aloja a los dientes, y al hueso articular, derivado del cartílago de Meckel. En estos animales, la articulación se establece con el hueso cuadrado del cráneo. En los mamíferos, la mandíbula se redujo a un solo hueso que porta las piezas dentarias y articula con una superficie articular desarrollada en el hueso temporal. Por lo tanto,

filogenéticamente, la ATM es una articulación secundaria. La primitiva articulación está aún presente en la anatomía humana, identificándose como la articulación incudo-maleolar, constituida por el martillo y el yunque, ubicados ahora en el oído medio. La estrecha relación que tiene en su evolución filogenética el oído con las piezas óseas de la ATM ayuda a entender la relación que existe entre la disfunción articular y la patología del oído (Sharry, 1977).

En los mamíferos, la ATM adquiere distintas características anatómicas según el tipo de alimentación y en dependencia de los requerimientos masticatorios de la especie en cuestión. Esto ayuda a comprender la importancia que tienen para los tejidos articulares los cambios funcionales a que está sometida la ATM. Esta articulación se desarrolla después del nacimiento, pues las crías inmaduras nacen con la articulación primitiva, que es la que funciona mientras completan su desarrollo.

En embriones humanos precoces, cuando la mandíbula no contacta aún con la base del cráneo, se desarrolla una articulación transitoria entre los huesos que se forman en el extremo posterior del cartílago de Meckel con la base del cráneo. Esta articulación primitiva es homóloga a la que se encuentra en reptiles y aves, y persiste por cerca de cuatro meses, hasta que la ATM se diferencia. Durante el período en que esto

sucedo, el extremo posterior del cartílago de Meckel se osifica, convirtiéndose en el martillo y el yunque, de modo tal que esta primitiva articulación pierde su relación con la mandíbula y se incorpora al oído medio (Mérida Velasco, Rodríguez Vázquez y Collado, 1990).

El primer esbozo de la formación de la mandíbula se debe a la diferenciación del primer arco branquial o visceral de los animales inferiores. Este arco se convierte en dos barras cartilaginosas que se sitúan en el margen superior (cartílago palatocadrado) y en el margen inferior (cartílago de Meckel), dando lugar a la mandíbula primitiva. Las extremidades posteriores de ambos cartílagos se unen para formar una articulación que a menudo se conecta con el cráneo y que suspende la mandíbula (articulación cuadrado articular primitiva o meckeliana).

1.2. LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES COMO ENTIDAD CLÍNICA

1.2.1. BREVE HISTORIA DE LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

Según los historiadores de la medicina, el dolor y los trastornos en la región mandibular se describieron y se trataron en seres humanos desde el año 300 a.C. por los egipcios (Ruffer, 1921; McNeill, 1997). En 1934, Costen publicó su legendario tratado conocido como Síndrome de Costen, dónde describió cómo pacientes con dolor en o alrededor de la mandíbula y ciertos síntomas óticos tales como dolor en o cerca del oído, zumbido de oídos, mareos, sensación de presión en el oído; parecían mejorar al alterar la dimensión vertical de la oclusión (Costen, 1934).

La etiología oclusal ganó popularidad. Los odontólogos comenzaron a hacer ajustes oclusales para dar un tratamiento dental óptimo e incluso prevenir los TTM. Las primeras teorías de causa-efecto se centraron principalmente en las relaciones estructurales y funcionales entre los dientes superiores e inferiores y la oclusión dental (Costen, 1934). En 1966, Krogh-Poulsen propuso una lista de síntomas de los trastornos cráneo-mandibulares. La lista comprendía la apertura limitada de la

boca, desviación de la mandíbula, dolor de la musculatura masticatoria, disarmoníaoclusal, desgaste oclusal, cambios locales y no específicos en los tejidos periodontales, y movilidad dental.

Debido a que la mala oclusión se percibe como la causa subyacente, el tratamiento de los TTM cambió desde la medicina a la odontología. Desde la década de 1930, la terminología de los signos y síntomas de trastornos funcionales del sistema masticatorio ha cambiado mucho. Esta variada terminología refleja los diferentes conceptos de etiología y patogénesis (Marklund y Wänman, 2009). Es por ello que el Síndrome de disfunción o TTM ha tenido diferentes acepciones a lo largo de la historia:

- Síndrome de Costen (Costen, 1934).
- Síndrome de Disfunción Dolorosa de la ATM (Schwarz, 1956).
- Síndrome de Dolor Miofacial (MPDS) (Laskin, 1969).
- Trastorno Ocluso-mandibular (Gerber, 1971).
- Trastorno Funcional de la ATM (Ramfjord y Ash, 1971).
- Disfunción Mandibular (MD) (Helkimo, 1974; Wänman y Agerberg, 1986).
- Síndrome de Estrés Mandibular (Ogus y Toiler, 1981).
- Disfunción Cráneo-mandibular (CMD) (Owen, 1987).

- Síndrome de Dolor-disfunción Temporomandibular. Fue recomendada por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (Michael et al, 1986).
- Disfunción Oromandibular (OMD). Fue introducido por la Internacional Headache Society (Sociedad Comité de Clasificación de la Cefalea Internacional sociedad, 1988).

Dado que los síntomas no siempre están limitados a la ATM, algunos autores piensan que estos términos son demasiados restrictivos y que debería utilizarse una denominación más amplia, como la de Trastornos Craneo-mandibulares (McNeillet al, 1980). Modelos de la etiología de los TTM se propusieron en la década de 1950, por primera vez por Schwarz (1959), quién vio el estrés o la ansiedad como un factor etiológico importante, y luego por Laskin (1969), que amplió el modelo psicológico de Schwarz. Estas teorías se basaban principalmente en observaciones en el ámbito clínico, y no en estudios epidemiológicos. Después de 1970, los avances en las técnicas de imagen dieron lugar a la mejor visualización de las estructuras intracapsulares (Okeson, 1996). Estas técnicas de imagen dieron una mayor y creciente experiencia en el manejo clínico y proporcionaron información para diagnósticos más precisos. Desde 1990, los TTM no

son considerados como una entidad única, sino como un grupo de varias enfermedades de diversa etiología y patología. Sin embargo, la controversia acerca de las diferentes teorías etiológicas de los TTM todavía existe debido al limitado conocimiento sobre la etiología y la historia natural de la evolución de los TTM (Dworkin y LeResche, 1992; McNeill et al, 1990).

1.2.2. DEFINICIÓN Y TERMINOLOGÍA DE LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

En 1986 Bell sugirió el término de TTM. Este término no sólo incluía a los trastornos de la ATM sino también a todos los trastornos asociados al sistema masticatorio. Este último es el término más aceptado hoy en día (Okeson, 1996). Con el objetivo de facilitar la comunicación científica, la American Dental Association (ADA) adoptó el término de TTM como el aconsejable para definir el cuadro clínico.

Sin embargo, en la literatura científica actual, el término anglosajón TMD (Temporomandibular dysfunction) es traducido al español en diversas maneras, tales como:

- TTM: Trastorno Temporomandibular (Okeson, 1996).
- DTM: Disfunción Temporomandibular, utilizada por diversos autores.
- DTM: Desordenes Temporomandibulares, utilizada por la Sociedad española de Disfunción Craneomandibular y Dolor Orofacial (SEDCYCO).

Creemos que los tres términos son intercambiables. En el presente estudio emplearemos de igual manera los tres, prefiriendo el de Trastornos Temporomandibulares (TTM).

En 1993, la American Academy of Orofacial Pain (AAOP) definió los TTM como *"un término colectivo que abarca una serie de problemas clínicos que involucran la musculatura masticatoria, la ATM y estructuras asociadas, o ambas"*. Los TTM son considerados como una subclasificación de los Desórdenes Esqueleto-musculares (Dworkin y LeResche, 1992; Okeson, 1996). McNeill (1997) da una definición parecida: *"los TTM son un heterogéneo grupo de patologías que afectan a las ATM, los músculos masticatorios, o ambos"*. Otra definición parecida es la dada por la TMJ Association: *"el TTM se caracteriza por un conjunto de síntomas relacionados con los músculos y las articulaciones que residen entre el cóndilo mandibular"*

y el hueso temporal. Los síntomas más comunes son ruidos articulares junto a dolor y limitación del movimiento articular”.

1.2.3. ETIOLOGÍA DE LOS TRASTORNOS TEMPORO-MANDIBULARES

La etiología de los TTM es considerada multifactorial, lo que significa que un gran número de factores genéticos, epigenéticos y ambientales pueden contribuir a la enfermedad (Okeson y de Kamer, 1996).

Como hipótesis básica del desarrollo de los TTM, se puede decir que cuando existe una sobrecarga sobre las estructuras estomatognáticas sin capacidad de adaptarse a contrarrestar las fuerzas de la carga se inicia un TTM (Wänman y Agerberg, 1991).

Debido a su variedad etiológica y sintomática, se supone que una combinación variable de factores genéticos, ambientales y nutricionales podrían ser el factor causal del desarrollo de los TTM. Numerosos estudios han demostrado que en pacientes dietéticamente deficientes, el dolor orofacial y los TTM eran significativamente más frecuentes (Mehra y Wolford, 2008).

En relación con factores neurológicos, diversos estudios han mostrado también una alta prevalencia de depresión en pacientes con dolor facial y TTM (McCreary et al 1991; Korszun et al, 1996; Madland et al

2000), así como ciertos cuadros psicológicos y de comportamiento (Slade et al, 2007). Recientemente ha sido enfatizada la importancia de mecanismos neurobiológicos (Svensson y Graven-Nielsen, 2001) en la etiología de los TTM. En cuanto a los factores genéticos, estudios de gemelos y segregación familiar sugieren que los TTM no son hereditarios (Raphael et al, 1999). Sin embargo, las personas no son igualmente susceptibles a los TTM, y diferentes variantes genéticas pueden aumentar la predisposición a un desarrollo particular del trastorno (Kim et al, 2010; Nackley y Diatchenko, 2010; Ribeiro-Dasilva et al, 2009; Mutlu et al, 2004; Herken et al, 2001).

A. FACTORES OCLUSALES:La importancia de las variaciones en la oclusión dental como un factor que contribuye a los TTM es controvertida, y la cuestión sigue estando en debate. En algunos estudios de base poblacional se ha hallado que la oclusión dental se asocia con signos y síntomas de los TTM (Egermark-Eriksson et al, 1990; Henrikson et al, 1997;Wänman y Agerberg, 1991). Sin embargo, otros estudios no han confirmado estas relaciones, y la importancia de la oclusión en el desarrollo de los TTM ha sido cuestionada (Clark et al, 1999;Koh y Robinson, 2004; Seligman y Pullinger, 1991; Suvinen et al, 2005). En los estudios prospectivos se halló que la eliminación de las interferencias oclusales provocó

una reducción de la incidencia de los TTM en pacientes que se sometieron en varias ocasiones a ajustes oclusales, en comparación con ajustes oclusales falsos en sujetos con una historia previa de TTM (Kirveskari et al, 1989). Puesto que la literatura no es concluyente, todavía hay una necesidad de estudios longitudinales (Mohlin et al, 2007). Parece ser una cuestión abierta si las variaciones en la oclusión dental pueden actuar como predisponentes, iniciar o perpetuar el desarrollo de un TTM.

Al-Jundi et al (2008) afirman que la oclusión como etiología sigue siendo incierta, haciendo necesarios más estudios longitudinales. Varios análisis y estudios no han encontrado ningún firme apoyo a la oclusión como una etiología de importancia, o al menos no como un factor único o dominante (Egermark-Eriksson et al, 1990; McNamara et al, 1995; De Boever et al, 2000).

B. BRUXISMO:El bruxismo se refiere a movimientos mandibulares subconscientes, no funcionales como el de rechinar o el apretamiento de dientes (Okeson, 1987). Su etiología ha sido considerada como multifactorial y sobre todo un síntoma regulado centralmente, no periféricamente (Lobbezoo y Naeije, 2000). El rechinar de los dientes se observa durante el sueño y se debe a

factores neurológicos diferentes del bruxismo diurno, lo que se considera principalmente un hábito relacionado con el estrés, la tensión o la ansiedad (Lavigne et al, 2007). Las consecuencias del bruxismo del sueño pueden incluir la destrucción del diente, dolores en la mandíbula, dolores de cabeza o limitaciones de los movimientos mandibulares, así como sonidos al rechinar los dientes. El bruxismo también puede implicar el sentimiento de ansiedad, lo cual conlleva tensión en los músculos masticatorios (Svensson et al, 2008). El papel del bruxismo como factor de riesgo inicial en los TTM ha sido cuestionado (Lobbezoo y Lavigne, 1997).

C. LAXITUD ARTICULAR: La laxitud articular sistémica es otro importante factor de riesgo de TTM, lo cual incluye la laxitud de la ATM (Westling, 1992), aumentando también las respuestas inflamatorias de la articulación y actuando sobre la producción de prostaglandinas y receptores serotoninérgicos (Haskin et al, 1995).

D. TRAUMA EXTERNO: La asociación entre el trauma y los TTM también se ha demostrado epidemiológicamente (Kamisaka et al, 2000). Por el contrario, un estudio basado en la población de

Locker y Slade (1988) no encontró ninguna asociación entre trauma y los signos-síntomas de TTM. Además, una revisión crítica de Ferrari y Leonard (1998) no sustentó una teoría sustancial de lesión mecánica de la ATM para su relación con los TTM.

E. AFECCIONES CRANEOMANDIBULARES: Recientemente, el dolor de espalda ha sido asociado con los trastornos musculoesqueléticos en la mandíbula y la cara, existiendo una relación entre la intensidad del dolor espinal y los TTM (Wiesinger et al, 2009). Los resultados indican que, por lo tanto, estas condiciones podrían compartir factores de riesgo comunes o que pueden influir en cada uno de ellos. Sin embargo, este fenómeno no ha sido abordado en estudios controlados prospectivos y de cohortes, y son necesarias más investigaciones sobre la relación temporal de dolor en la espalda y los TTM.

F. FACTORES DE SALUD GENERAL: Una serie de signos y síntomas de TTM se han correlacionado con la mala salud en general. Estudios multidisciplinarios han concluido que los pacientes con TTM pueden sufrir de una gran variedad de

condiciones relacionadas con desordenes sistémicos, articulares, neurológicos, neuromusculares, y neurovasculares, así como de trastornos del comportamiento (McNeill, 1997). Cabe destacar:

- **Fibromialgia:** se han observado altas tasas de comorbilidad entre el dolor facial miógeno y la fibromialgia, un dolor crónico generalizado de origen desconocido (Hedenberg-Magnusson et al, 1999). Varios estudios han demostrado que aproximadamente el 75% de los pacientes con fibromialgia cumplen con los criterios de diagnóstico de TTM, y el 12-25% de los pacientes con TTM cumplen los criterios de diagnóstico para la fibromialgia (Plesh et al, 1996; Cimino et al., 1998).
- **Migraña y cefalea:** tanto la migraña como la cefalea de tipo tensional han sido asociadas con los síntomas de TTM, como es el caso de los estudios transversales de casos y controles de Wänman y Agerberg (1987). Problemas como dolor de cabeza, oído o cuello a menudo se han relacionado con TTM (Hedenberg-Magnuson et al, 1999; Keersmaekers et al, 1996).

Enfermedades inflamatorias generalizadas se correlacionan con una mayor prevalencia de síntomas de TTM que en la población general. Trastornos como artritis reumatoide, artritis psoriásica y

espondilitis anquilosantes han sido asociados a TTM (Helenius et al, 2005; Wenneberg y Kopp, 1982; Könönen, 1987).

G. FACTORES NUTRICIONALES: Debido a su variedad etiológica y sintomática, se supone que una combinación variable de factores nutricionales y estrés podrían ser una causa de TTM (Mehra y Wolford, 2008; Mäder et al, 1988; Slade et al, 2005; Mallek et al, 1984). Mehra y Wolford (2008) propusieron que el estado vitamínico y la falta de nutrientes estaban relacionados con el desarrollo de los TTM. Todo esto podría ser explicado por la influencia de nutrientes como los folatos y la participación del sistema hormonal en el buen desarrollo y funcionamiento de la ATM. Estos autores evaluaron nutrientes en el suero en 23 pacientes que previamente habían tenido implantes de Proplast/Teflón en la ATM. El análisis en suero de dichos pacientes de nutrientes como beta-caroteno (vitamina A), folatos, hierro en sueros, ferritina, zinc, magnesio y vitaminas B1, B6, B12 y C detectó que cada paciente era deficiente al menos en uno de estos factores, por tanto, evaluaciones nutricionales, consejos dietéticos y un apropiado tratamiento médico podrían mejorar el estado de los pacientes de TTM. Una reducción en el dolor se

observó con mayor frecuencia en los pacientes donde eran elevados los valores de beta carotenos, ácido fólico y cianocobalamina, mejorando durante el estudio el curso de la enfermedad.

El metabolismo del ácido fólico puede influir en la morfogenia de cualquier tejido en desarrollo, y esto se debe no sólo a su participación en la síntesis de los ácidos nucleicos, sino también a su función conocida en la regulación de metilación de ADN. La deficiencia de ácido fólico puede causar irritabilidad del sistema nervioso central, depresión, pérdida de peso y anemia. Las deficiencias nutricionales y, más específicamente, anormalmente bajos niveles de vitaminas B1, B6, B12 y ácido fólico son considerados factores que perpetúan la disfunción de dolor y miofacial, y estas deficiencias son frecuentes en los casos de estrés mecánico TTM (Mäder et al, 1988; Mehra yWolford, 2008).

Por otra parte, la ATM es una articulación de carga y sus componentes tienen que ser regenerados constantemente debido al estrés mecánico. Las fuerzas compresivas generadas por los músculos al apretar los dientes son del orden de 250 a 359 N, la cual se transmite al cóndilo una fuerza de compresión de 334 N (McNeill et al, 1990).

Una disfunción genética que produce un déficit de folatos o una menor capacidad de amortiguación de la oxidación, unido a la mayor oxidación de estos tejidos, produce procesos inflamatorios que darían lugar a TTM.

H. FACTOR HORMONAL: Como se ha explicado anteriormente, ciertas hormonas pueden aumentar la vulnerabilidad genética inherente a los TTM, lo que explica la mayor predisposición de las mujeres en edad reproductiva (Wang et al, 2008; Landi et al, 2004). La relación entre estrógenos y TTM se ha estudiado anteriormente (Halpernet al, 2007; Warren y Fried, 2001); específicamente, los polimorfismos del gen receptor ER- α , Pvu II (rs2234693) y Xba (rs9340799), que parecen estar relacionados con varias formas de osteoartritis, incluyendo TTM (Kang et al, 2007). Otros estudios han demostrado que el número de receptores estrogénicos no era significativamente mayor en pacientes sintomáticos (Henry et al, 2008).

I. FACTORES PSICOLÓGICOS: Se han estudiados factores psicológicos en los TTM (Rollman y Gillespie, 2000). Se concluye que pueden tener un papel en la causa o el mantenimiento de los

TTM, pudiendo predisponer a la enfermedad y a la cronicidad de la enfermedad (Gatchel et al, 1996). Los pacientes con TTM a menudo pueden tener una combinación de factores psicológicos y manifestaciones somáticas (Mohl y Ohrbach, 1992). También suelen tener dificultades y características personales para hacer frente a un aumento de estrés en la vida ante los eventos difíciles (De Leeuw et al, 1994). Por otra parte, se ha verificado un aumento TTM en pacientes con trastornos psicológicos como consecuencia directa de los acontecimientos dolorosos-emocionales durante la vida (Murray et al, 1996). En este sentido el metabolismo de la neurotransmisión puede ser una de las claves. La dopamina es un neurotransmisor que tiene un papel principal, entre otros, en la cognición, el aprendizaje, el humor y el sueño. Según Austin (1997), el insomnio, que se define como la incapacidad para iniciar o mantener el sueño, puede ser un factor de perpetuación de los TTM. En el estudio de Goulet et al (1995) el 35% de aquellos con dolor en la mandíbula y cansancio después de dormir se quejaron de dolor intenso, en comparación con sólo el 15% en el grupo con dolor en la mandíbula, sin problemas de sueño.

Los sujetos, los cuales se clasificaron a sí mismos de llevar una vida tensa, tuvieron un factor de riesgo entre 3,4 y 8,5 veces mayor de padecer los TTM que los que se clasificaron de no estar bajos factores de tensión emocional (Wänman y Agerberg, 1990). Los conflictos en el hogar o en el trabajo, problemas financieros o reajustes culturales pueden aumentar el estrés y, por tanto, aumentar hábitos parafuncionales como el bruxismo y el apretar los dientes, sobrecargando el sistema muscular masticatorio (Okeson, 1987).

En la subcategorización de los pacientes en subgrupos de diagnóstico de los TTM, los pacientes con dolor muscular masticatorio sufren de problemas psicológicos más intensos que los pacientes con dolor de origen articular en sistema estomatognático (Levitt y McKinney, 1994; SpruijtyWabeke, 1995).

Los pacientes con TTM tienen muchos perfiles psicológicos, y parece haber un acuerdo generalizado de que el estrés, la depresión, y las enfermedades disfuncionales de la conducta son aspectos de los perfiles comunes de los pacientes con TTM (Dworkin y LeResche, 1992).

Numerosos estudios han mostrado también una alta prevalencia de depresión en pacientes con dolor facial y TTM (McCreary et al, 1991; Gallagher et al, 1991; Korszun et al, 1996; Madland et al, 2000). Por el contrario, McGregoret al (1996) no encontraron diferencias en la prevalencia de la depresión en pacientes con dolor orofacial y pacientes controles normales. Puede haber una sobreposición sintomatológica entre el TTM y otros trastornos médicos. Los TTM suelen ser comórbidos con otros síntomas psicósomáticos como trastorno del sueño, dolores de cabeza, fatiga y depresión, que se caracterizan como síndromes somáticos funcionales (SSF). El concepto de SSF es una clasificación multidimensional basada en características clínicas, e incorpora una variedad de síndromes, como el síndrome de fatiga crónica (SFC), síndrome de intestino irritable (IBS), disfórico premenstrual (TDPM), TTM y dolor torácico no cardíaco. Aunque la función fisiológica del neurotransmisor serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) está representada en la mayoría de estos síntomas comunes del SSF, el propio concepto ha sido controvertido hasta la fecha debido a la falta de una etiología biológica para explicar el mecanismo de SSF. El sistema neuronal de la 5-HT regula diversas funciones fisiológicas, incluyendo el

sueño, respiración, apetito, dolor, función motora, cognición, la actividad sexual, así como las emociones como el estado de ánimo y ansiedad. Estudios de polimorfismos en los genes relacionados con la 5-HT han observado asociaciones con este grupo de enfermedades, incluyendo SFC (Narita y Narita, 2007), IBS (Wang et al, 2012) y TDPM (Gingnell et al, 2010), lo que sugiere una relevancia de disfunción neuronal de 5-HT en las enfermedades catalogadas genéricamente como SSF.

A este respecto, Ojima et al (2007) analizaron tres polimorfismos genéticos relacionados con la serotonina por medio de un cribado genómico del ADN de 36 pacientes diagnosticados de TTM, hallando que el alelo L (largo) del polimorfismos 5-HTLPRR (polimorfismo de la proteína recaptadora de la serotonina) estaba estadísticamente incrementado en los pacientes con TTM.

Otros mecanismos que han sido relacionados con TTM son factores psicopatológicos y de percepción dolorosa, que también se han relacionado con la variabilidad genética del dolor. El polimorfismo inserción/delección de 44bp del gen del transportador de serotonina (SLC6A4) ha sido estudiado y frecuentemente asociado con el gen del receptor D4 de la dopamina (DRD4). Variantes del DRD4 se han asociado con varios casos clínicos

relacionados con el comportamiento, psicopatologías y dolor (Benjamín et al, 2000).

1.2.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO DE LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

Según la Academia Americana de Dolor Orofacial (Okeson1996), los TTM se definen como *"un término colectivo que abarca una serie de problemas clínicos que involucran a los músculos de la masticación, la articulación temporomandibular o las estructuras asociadas, o ambos"*. Se consideran como una subclasificación de los trastornos musculo-esqueléticos, y por lo general tienen un curso recurrente y crónico, con una fluctuación sustancial en el tiempo de los signos y síntomas de TTM (Könönen et al,1996; Wänman,1996; Kuttilla et al,1997; Magnusson et al, 2000). Los signos y síntomas más comunes de los TTM son chasquidos (clicks) en la ATM, capacidad de apertura mandibular limitada, desviaciones de los patrones de movimiento de la mandíbula y los músculos de masticación y/o dolor de la ATM en la cara (Dworkin y LeResche,1992).

1.2.4.1. Signos y síntomas de los Trastornos Temporomandibulares

De Boever (1979) definió la triada clásica de los TTM como:

- Dolor per se y dolor a la palpación en/o alrededor de la ATM y los músculos masticatorios.
- Reducción del movimiento mandibular.
- Sonidos articulares (chasquidos o clicks).

El síntoma más común y principal es el dolor crónico en el área temporomandibular y orofacial (Dworkin et al, 1990). El 80% de enfermos afectados exhiben como signo y síntoma más frecuente la artralgia y desplazamiento del disco. Dentro de los signos, el dolor miálgico a la palpación es el signo más común encontrado en la exploración y el músculo más común a la palpación manual es el pterigoideo lateral (55%). Las mujeres exhibieron mayor dolor que los hombres en todos los músculos examinados (Jensen et al, 1993).

Un criterio muy aplicado para el diagnóstico de TTM se basa en la estancia temporal del dolor, de tal forma que si el paciente siente dolor muscular, localizado y a la palpación en la ATM por más de un mes, es diagnosticado como TTM (Ojima et al, 2007).

1.2.4.2. Medida del Dolor Facial:

Como veremos en el apartado siguiente, es necesario cuantificar el grado de dolor del paciente para una buena clasificación diagnóstica de los TTM. La percepción del dolor implica la intensidad, la calidad, la duración y la ubicación del dolor. Debido a la fenomenología subjetiva del dolor, los datos informados juegan un papel crítico en la evaluación del dolor (Jensen et al, 1998). La dimensión más común de dolor evaluado ha sido la intensidad del dolor o la intensidad percibida del dolor que se siente. Históricamente, una escala analógica visual ha demostrado ser un índice válido de dolor experimental, clínica y crónica (Price et al, 1983). En esta escala, los encuestados indican la intensidad del dolor, haciendo una marca en una línea de 10 cm de largo que incluye descriptores de los extremos de la intensidad del dolor (por ejemplo, "sin dolor" a "el dolor es tan malo como podría ser"). Debido a que la línea se compone de un número infinito de puntos, teóricamente podrían observarse cambios muy pequeños en la intensidad del dolor.

Por el contrario, las escalas de calificación verbal y las escalas de calificación numérica tienen un número limitado de niveles de dolor entre los que elegir. Con la primera, al sujeto se le pide que seleccione la palabra que mejor describe la intensidad del dolor en una lista de

descriptores (por ejemplo, "sin dolor", "un poco de dolor", "dolor intenso", "dolor extremo"), mientras que la segunda consiste en una lista finita de números (por ejemplo, 0-10) (Downie, 1978; Jensen et al, 1998).

El primer intento sistemático para incorporar descriptores verbales en la evaluación del dolor fue el cuestionario de dolor McGill (Melzack, 1975) y es en la actualidad el instrumento más utilizado en la investigación y en la práctica del dolor. Este test consta de 20 conjuntos de descriptores verbales cualitativos y cuantitativos diseñados para medir las dimensiones sensoriales, afectivas, evaluativas y otras del dolor.

1.2.4.3. Clasificación de los trastornos temporomandibulares:

Con los años, se han ofrecido muchos esquemas de clasificación para los TTM (Okeson, 1997). El índice de Helkimo fue el primero en ser desarrollado principalmente para fines epidemiológicos en el diagnóstico de TTM (Helkimo, 1974), y todavía se utiliza con frecuencia. El índice anamnésico de Helkimo (Ai) comprende tres grados, que son: asintomáticas (Ai0), síntomas leves (AiI), y síntomas severos (AiII) de TTM. El índice de disfunción clínica de Helkimo (Di) se basa en la evaluación de cinco signos clínicos: alteración de rango de

movimiento, alteración de la función de la ATM, dolor muscular, dolor de la ATM y dolor con el movimiento de la mandíbula. El índice de Di comprende cuatro grados, que son sin signo (Di0), disfunción leve (DiI), disfunción moderada (DiII), y disfunción severa (DiIII).

La subclasificación de TTM se compone de dos categorías diagnósticas principales: artrogénica y miogénica. Estas clasificaciones no siempre son claras, y puede haber una considerable superposición entre ellas (Kuttila et al, 1998). En 1990, la Academia Americana de Dolor Orofacial estableció la primera clasificación de diagnóstico bien definida para TTM, que fue revisada en 1993 (McNeill, 1993). Además, dicha asociación publicó una clasificación diagnóstica actualizada en 1996 (Okeson, 1996). La clasificación miogénica a menudo se subdivide en hiperexcitación muscular debido al estrés y anomalía muscular, asociada con hábitos parafuncionales orales (por ejemplo, bruxismo), y la categoría artrogénica se subdivide en función de las anomalías estructurales específicas (por ejemplo, trastorno interno de la articulación temporomandibular o enfermedades degenerativas).

Los *criterios diagnósticos de investigación* (RDC, de su acrónimo inglés), desarrollados por Dworkin y Leresche (1992), establecieron un doble diagnóstico que reconoce no sólo las condiciones físicas (eje I),

incluyendo trastornos musculares, desplazamientos de disco y otros tipos de condiciones comunes que pueden contribuir al dolor desorden, sino también los aspectos psicosociales (eje II) que contribuyen al sufrimiento, la percepción del dolor y la discapacidad asociada a la experiencia del dolor del paciente. Este método de clasificación de doble eje se ha incorporado recientemente en un esquema de diagnóstico, no sólo para TTM, sino para todos los trastornos de dolor orofacial (Okeson, 1996). Los RDC han demostrado ser fiables para el diagnóstico de TTM en muchas poblaciones y es el método más usado para la clasificación y diagnóstico de la enfermedad.

A continuación se hace un breve resumen de dos ejes establecidos en los RDC/TTM:

Grupo Diagnóstico del Eje I:

GRUPO I. Trastornos Musculares:

- A. Dolor Miofacial (I. a).
- B. B. Dolor Miofacial con Limitación de Apertura Mandibular (I.b).
- C. C. Sin Diagnóstico del grupo I.

GRUPO II. Desplazamientos del Disco:

- A. Desplazamiento del disco con reducción (II. a).
- B. Desplazamiento del disco sin reducción con limitación de la apertura (II. b).
- C. Desplazamiento del disco sin reducción sin limitación de la apertura (II. c).
- D. Sin diagnóstico en el grupo II.

GRUPO III. Otras Condiciones Articulares:

- A. Artralgia (III.a).
- B. Osteoartritis (III. b).
- C. Osteoartrosis (III. c).
- D. Sin diagnóstico en el grupo III.

Grupo Diagnóstico del Eje II:

La valoración del eje psicosocial se realiza mediante cuestionarios que son capaces de definir los siguientes niveles:

El grado de dolor crónico está categorizado en una escala ordinal de cinco niveles:

0 = Sin discapacidad.

1 = Baja discapacidad y baja intensidad dolorosa.

2 = Baja discapacidad y alta intensidad de dolor.

3 = Alta discapacidad moderadamente limitante.

4= Alta discapacidad altamente limitante.

El nivel de depresión está categorizado en una escala ordinal de 3 niveles:

0 = Normal.

1 = Depresión moderada.

2 = Depresión severa.

La somatización está categorizada en una escala ordinal de 3 niveles:

0 = Normal.

1 = Somatización moderada.

2 = Somatización severa.

1.3. EL METABOLISMO DE LOS FOLATOS Y SU RELACIÓN CON LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

Los folatos son una serie de moléculas con una estructura común, el ácido fólico, que actúan como coenzimas en una serie de reacciones dónde incorporan unidades monocarbonadas en diversos estados de óxido/reducción. Así, estas enzimas son necesarias para una serie de reacciones biosintéticas, tales como colina (componente de lípidos de membrana), aminoácidos (metionina [Met], cisteína [Cys], glicina y serina [Ser]) y la síntesis de DNA (síntesis de purinas y desoxitimidina). Además, intervienen en la regulación de la expresión genética, ya que son necesarias para la metilación de DNA (Blakely y Whitehead, 1986).

No es de extrañar, por tanto, que su deficiencia conlleve una alteración tanto de la síntesis de DNA como de su expresión genética. Esto lleva a la detención de la célula en la fase S y a un cambio macrocítico en el tamaño y forma de los núcleos, sobre todo en las células de rápido crecimiento (Herbert, 1990). Así, la deficiencia nutricional de esta vitamina se expresa como anemia macrocítica. No está de más recordar que el cóndilo de la ATM es también un lugar de rápido recambio

celular debido a las fuerzas de tracción/presión a la que se encuentra sometido. De hecho, se ha observado que deficiencias de folatos se relacionan con TTM (Mehra y Wolford, 2008; Mäder et al, 1988). Ya que gran parte de este trabajo consiste en estudios de genes del metabolismo de los folatos, es necesario describir brevemente esta vía compleja y las interrelaciones que presentan.

1.3.1. FORMAS DE FOLATOS

La forma principal de folato, de donde proceden todas las demás, es el tetrahydrofolato (THF). Consta de tres grupos: una pteridina sustituida, un *p*-aminobenzoato y un glutamato. Los mamíferos pueden sintetizar el anillo de pteridina, pero son incapaces de conjugarlo con las otras dos unidades, de ahí que los folatos sólo puedan ser obtenidos a partir de la dieta o bien de los microorganismos existentes en el tubo digestivo. Realmente en la naturaleza existe como una forma de ácido fólico, que no es más que un THF poliglutamado.

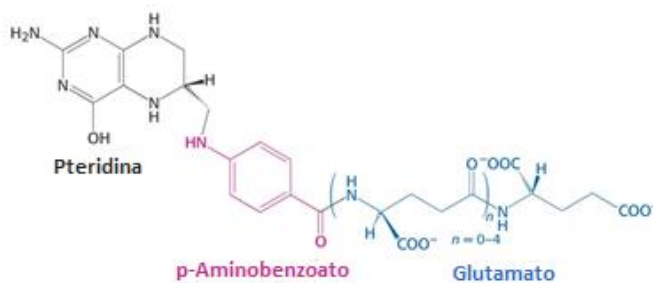


Figura 4: Estructura del ácido fólico.

El fragmento monocarbonado transportado por el THF está unido al átomo de nitrógeno N-5 o al N-10 (que se indican como N⁵ y N¹⁰) o a ambos a la vez. Este fragmento puede existir en tres grados de óxido-reducción (Tabla 1).

Tabla 1: Detalle de los grupos monocarbonados activados que son transportados por el THF.

ESTADO DE OXIDACIÓN	GRUPO	
Muy reducido (=metanol)	- CH ₃	Metilo
Intermedio (=formaldehído)	- CH ₂ -	Metileno
	- CHO	Formilo
Muy oxidado	- CHNH	Formimino
	- CH =	Metenilo

La forma más reducida transporta un grupo metilo ($-CH_3$), mientras que la forma intermedia transporta un grupo metileno ($-CH_2-$). Las formas más oxidadas transportan un grupo metenilo ($-CH=$), formilo ($-CHO$) o formimino ($-CHNH$). La unidad más oxidada de un átomo de carbono, el CO_2 , es transportada por otra coenzima, la biotina, en vez de serlo por el THF.

Estas unidades monocarbonadas activas transportadas por el THF, son interconvertibles (Figura 5). De todas estas interconversiones se debe destacar que el N^5 -metilTHF, dador del grupo metilo en el paso de homocisteína (Hcy) a Met, únicamente puede generarse a partir del N^5,N^{10} -metilTHF mediante reducción conducida por la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) utilizando como dador de hidrogeniones al NADPH que pasa a $NADP^+$. Como se observa, esta reacción es irreversible, es decir, el N^5 -metilTHF no puede convertirse en otras formas de folato, es un destino definitivo (Shane, 1995).

A continuación se pasará a exponer cada una de las reacciones en las que los diversos folatos transportan esas unidades monocarbonadas, así como las interrelaciones que hay entre ellas, formando una compleja vía metabólica que se podría denominar “ciclo de los folatos”.

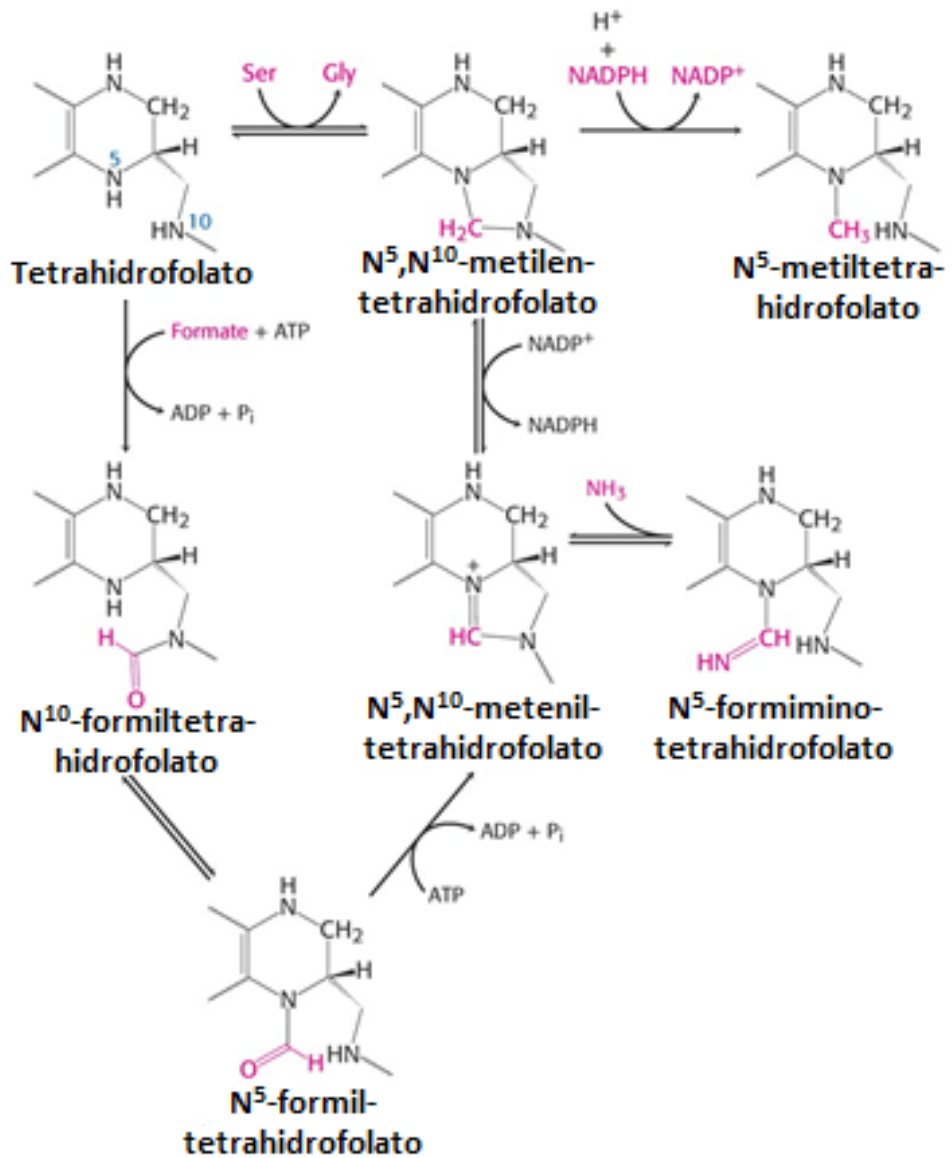


Figura 5: Conversiones de los fragmentos monocarbonados unidos al tetrahidrofolato.

1.3.2. EL CICLO DE LOS METILOS ACTIVADOS

Este ciclo enzimático es de importancia capital para el crecimiento celular. En primer lugar, sintetiza Met, aminoácido esencial para la síntesis de proteínas, ya que es el origen de la traducción de cualquier mRNA. Por otro lado, aporta metilos a una serie de reacciones, entre las cuales se debe destacar la metilación del DNA, uno de los mecanismos epigenéticos, mediante el cual se regula la expresión genética. Por último, interviene en la síntesis tanto de bases púricas como pirimidínicas. Además del crecimiento celular, en este ciclo interviene una molécula, la Hcy, cuyas elevaciones plasmáticas están muy relacionadas con los accidentes cardiovasculares, cáncer, alteraciones del desarrollo, etc. (Boushey et al, 1995).

El exceso de Met procedente de la dieta o del recambio de las proteínas endógenas que no se incorpora a las proteínas es metabolizado como se describe en la Figura 6 (Córdoba et al, 1998).

Existen dos reacciones sucesivas en el paso de Met a Hcy. En la primera, se obtiene un metabolito intermedio, la S-adenosilmetionina (SAM), reacción en la que intervienen la enzima L-Metionina adenosiltransferasa y el ATP. Este metabolito es el principal dador de metilos del organismo, que participa en la metilación de DNA como

dijimos anteriormente. Tras la demetilación, la SAM se transforma en S-adenosilhomocisteína (SAH) que es posteriormente hidrolizada mediante la S-adenosilhomocisteína hidrolasa, siendo esta la única fuente de Hcy en vertebrados (Blakely y Whitehead, 1986).

Una vez que se ha formado la Hcy, su metabolismo se divide en dos rutas metabólicas, la transulfuración, de donde se obtiene la Cys, y la remetilación, mediante la cual se forma Met, pero no “de novo”, y de esta forma se retroalimenta el ciclo de los metilos.

1.3.2.1. Recuperación de Metionina (Remetilación):

En la remetilación, para la obtención de Met a partir de Hcy, intervienen dos rutas metabólicas independientes, una mediada por la enzima metionina sintetasa, (enzima que se encuentra en la mayoría de las estirpes celulares) y otra catalizada por la betaínahomocisteínametiltransferasa (BHMT).

En la recuperación de Met a través de Hcy, mediante la utilización de folatos, hay dos pasos claves. Uno, la reacción en sí misma, catalizada por la metionina sintetasa (MTR), que incorpora el grupo metilo a la Hcy para rendir Met, actuando como dador de metilo el N⁵-metilTHF y como coenzima la vitamina B12. EL otro paso clave es la formación de

N^5 -metilTHF, catalizado por la MTHFR a partir de N^5,N^{10} -metilenTHF, ya que es la única vía de obtención de N^5 -metilTHF. Se debe también

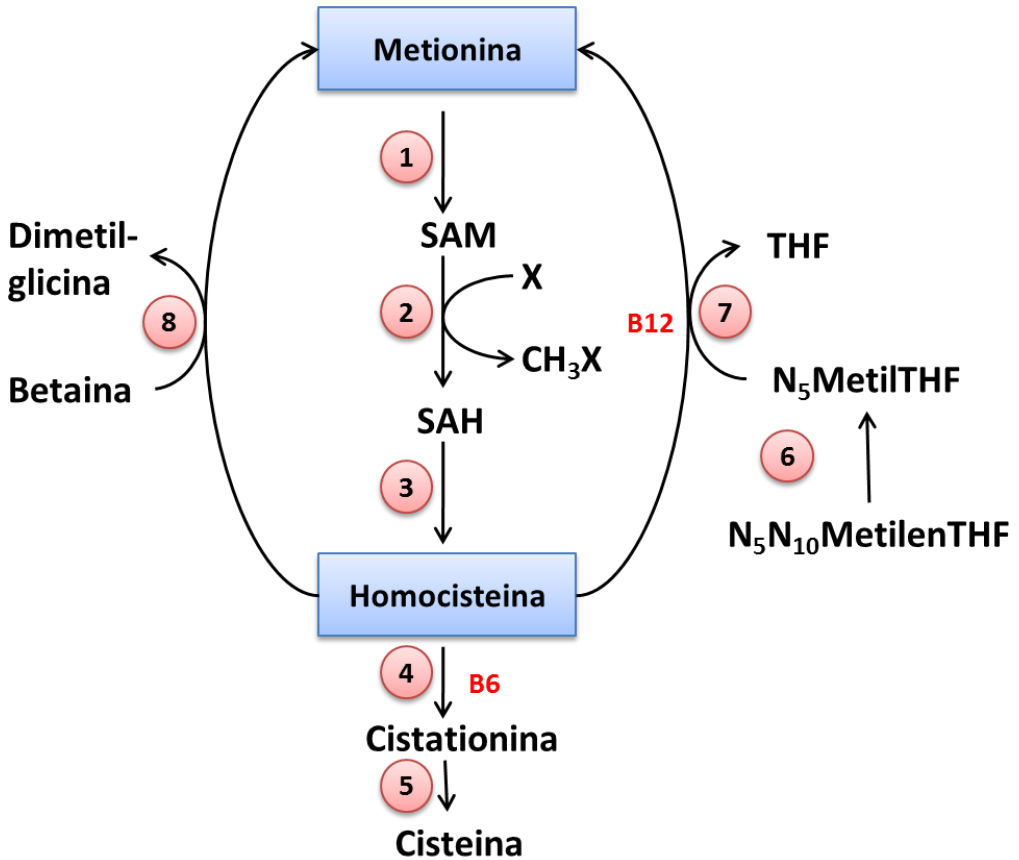


Figura 6: Ciclo de los metilos.

1: L-metionina adenosiltransferasa; 2: metiltransferasa; 3: S-adenosilhomocisteína hidrolasa; 4: cistationina β -sintetasa (CBS); 5: cistationina β -liasa; 6: metileno-tetrahidrofolatoreductasa; 7: metionina sintetasa; 8: betaína-homocisteínametiltransferasa; X: aceptor de metilos; CH₃X: aceptor metilado; SAM, SAH, THF, N₅MetilTHF, N₅N₁₀MetilenTHF: consultar índice de abreviaturas.

destacar que la reacción catalizada por la metionina sintetasa presenta dos aspectos metabólicos de interés: es una de las dos enzimas conocidas que utiliza vitamina B12 y es la única reacción en donde interviene el N⁵-metilTHF como dador de grupos metilos (Shane, 1995).

La otra vía de recuperación de Met a partir de Hcy por remetilación consiste en utilizar como sustrato la betaína en lugar del N⁵-metilTHF. La betaína es un derivado de la colina, la cual es el componente polar del fosfolípido de membrana más abundante, la fosfatidil colina. La betaína proviene de la oxidación del grupo aldehído de la colina. Esta es la que cede su grupo metilo a la Hcy mediante la enzima betaína: homocisteínametiltransferasa, transformándose en dimetilglicina. La enzima BHMT es inhibida reversiblemente por los productos de la reacción, Met, N,N,- dimetilglicina y por la SAM (Garrow et al, 1993). Su importancia en la recuperación de Met a partir de Hcy es muy pequeña ya que el sustrato, la colina, no suele estar disponible porque es fundamental para la síntesis de fosfolípidos. Además, esta enzima únicamente se encuentra en hígado y riñón, mientras que la recuperación de Met por folatos, está presente en todas las células del organismo.

1.3.2.2. Vía de la Transulfuración: Síntesis de Cisteína.

Como ya se ha mencionado, la Hcy, en su ruta metabólica de transulfuración, se transforma en Cys en dos reacciones dependientes de la vitamina B₆.

En la primera reacción se obtiene cistationina a partir de Hcy y serina (Ser) en respuesta a la acción sintetizadora de la enzima CBS. En la segunda reacción, la cistationina es desaminada por la acción de la enzima cistationina- β -liasa, obteniéndose Cys y β -cetobutirato.

La concentración plasmática de Met determina si la Hcy seguirá la ruta de la transulfuración o de la remetilación. Cuando la concentración plasmática de la Met está aumentada, se produce un incremento en el flujo de la transulfuración y una disminución de la tasa de la remetilación de la Hcy. Esto es debido al control metabólico que ejerce el incremento tisular de SAM, el cual simultáneamente activa la CBS e inhibe la MTHFR hepática. Por lo tanto, en estas condiciones hay un aumento de la síntesis de Cys y, en consecuencia, de Cys, y una disminución de N⁵-metilTHF. En cambio, ante una disminución de la concentración de Met, se inhibe la CBS y se activa la MTHFR (Córdoba et al, 1998).

1.3.3. LOS FOLATOS Y LA SÍNTESIS DE BASES PÚRICAS

La síntesis de bases púricas se realiza normalmente mediante la reutilización de los metabolitos formados durante su catabolismo (síntesis de recuperación): sin embargo, en aquellas células de un alto ritmo de crecimiento, esta vía es insuficiente y son capaces de sintetizar bases púricas paso a paso a partir de sustancias más elementales (síntesis de novo), mucho más costosa energéticamente (Kappock et al, 2000). En esta síntesis de novo, la base púrica se construye sobre un esqueleto de ribosa hasta llegar a los nucleótidos adenilato (AMP) y guanilato (GMP).

Los folatos intervienen en dos de estas reacciones, incorporando un átomo de carbono en cada una de ellas en forma de N¹⁰-formilTHF (Figura 7).

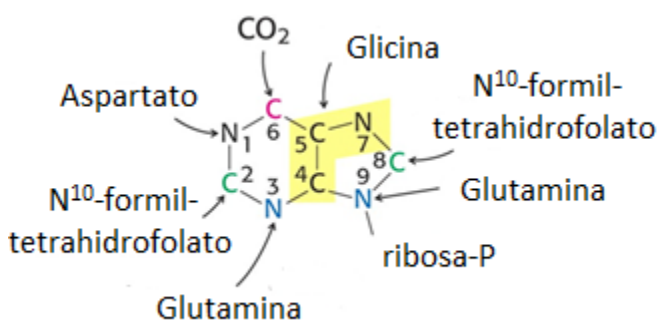


Figura 6: Procedencia de cada uno de los átomos de la síntesis del anillo de purina durante la síntesis de novo.

En la primera reacción en N^{10} -formilTHF transfiere su grupo formilo al grupo amino del residuo de glicina unido a la ribosa formando formilglicinamidaribonucleótido por medio de la glicinamida-ribonucleotidotransformilasa (GART), enzima que cataliza tres de las diez reacciones de la síntesis de novo. La segunda reacción de transferencia de N^{10} -formilTHF es la incorporación del último carbono del anillo, formando formaminoimidazol carboxiamida ribonucleótido, gracias a la enzima 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotido-formiltransferasa/IMP ciclohidrolasa (ATIC), que interviene también la ciclación final del anillo (Rayl et al, 1996).

1.3.4. FORMACIÓN DE DESOXITIMIDILATO

Los folatos también intervienen en la síntesis de timina, proceso de extraordinaria importancia en la duplicación y reparación de DNA. El grupo metilo de la timina procede del N^5, N^{10} -metilenTHF mediante una reacción catalizada por la timidilatosintetasa (TYMS) (Figura 8). El substrato de la reacción es el desoxiuridilato (dUMP) que se metila en desoxitimidilato (dTMP), transformándose el N^5, N^{10} -metilenTHF en dihidrofolato (DHF). La recuperación del N^5, N^{10} -metilenTHF se realiza en dos pasos. En primer lugar el DHF se transforma a THF gracias a la dihidrofolatoreductasa (DHFR). Por último, el THF recoge la cadena

lateral alcohólica de la Ser, gracias a la serina hidroximetiltransferasa (SHMT), convirtiéndose en glicina (Benkovic y Hammes-Schiffer, 2003).

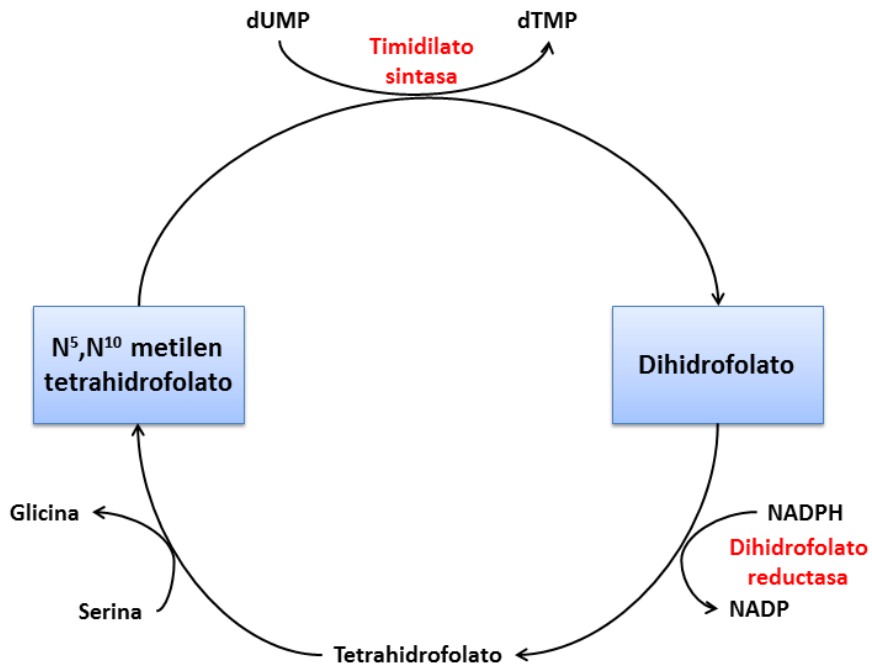


Figura 8: Regulación de la síntesis de desoxitimidilato por medio de la timidilatosintetasa y la dihidrofolatoreductasa.

1.3.5. METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS

Como ya se ha mencionado en el párrafo anterior, los folatos también intervienen en el metabolismo de la glicina y Ser, mediante una reacción reversible catalizada por la SHMT, que utiliza N⁵,N¹⁰-metilenTHF como cosustrato (Garrow et al, 1993). Existen dos

isofomas, una citosólica, que cataliza el paso de glicina a Ser y otra mitocondrial para el paso de Ser a glicina (Figura 9).



Figura 9: Mecanismos de acción de la serinahidroximetiltransferasa.

Además de estos dos aminoácidos, los folatos son fundamentales para el metabolismo de la Met y la Cys, tal como se comentó en el ciclo de los metilos.

1.3.6. ESQUEMA GENERAL DEL METABOLISMO DE LOS FOLATOS

A continuación se presenta un esquema general del metabolismo de los folatos, con las complejas relaciones que existen entre ellos y destacando los enzimas y coenzimas que intervienen en las reacciones.

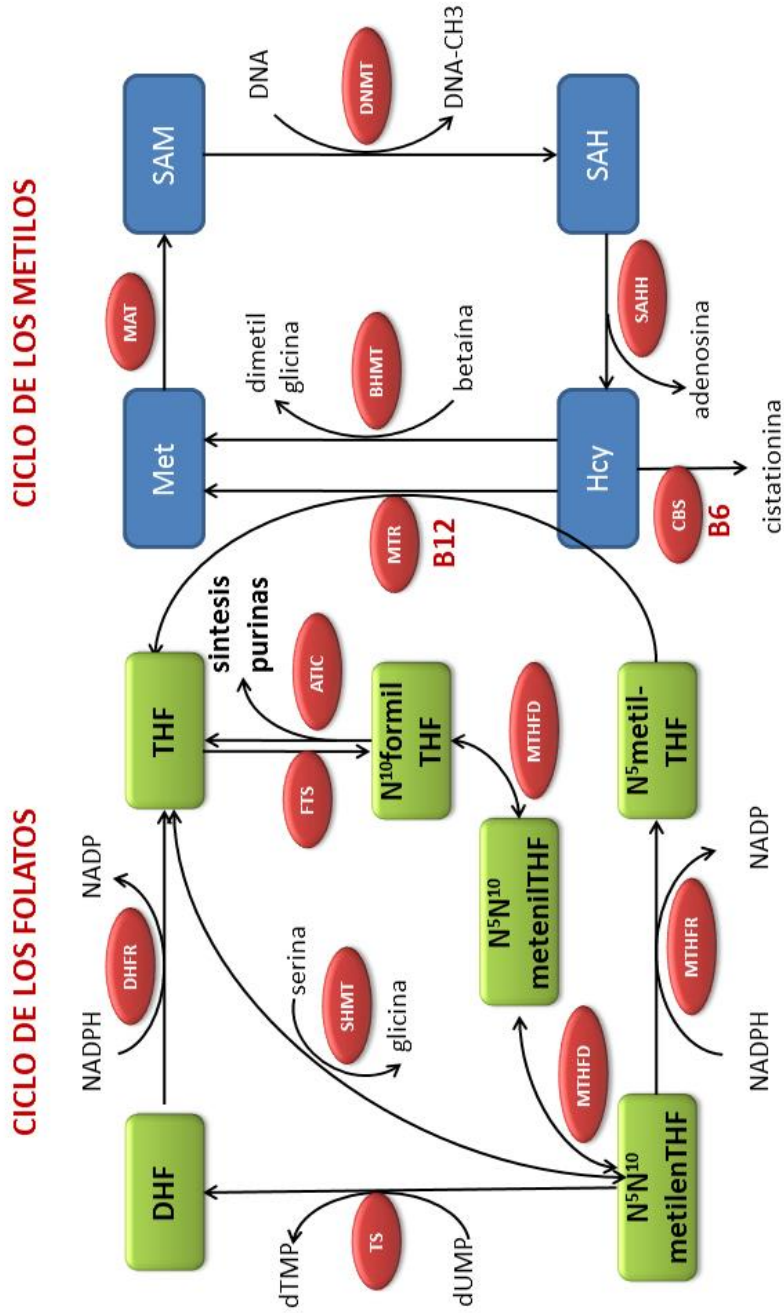


Figura 10. Esquema general del metabolismo de los folatos. En verde, tipos de folatos; en azul, metabolitos de ciclo de metilos; en rojo, enzimas. Consultar abreviaturas.

1.4. OTROS ASPECTOS MOLECULARES RELACIONADOS CON LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

1.4.1. LAS HORMONAS SEXUALES Y LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

Existen muchas evidencias que hablan a favor de una relación entre las hormonas sexuales (fundamentalmente el estradiol) y los TTM. Así, como se ha dicho anteriormente, es más frecuente en mujeres (Carlsson, 1999); la terapia hormonal sustitutiva se asocia con esta patología (LeResche et al, 1997); los niveles de estradiol en líquido sinovial son mayores en sujetos con TTM que en controles (Cheng et al, 2001).

Se ha sugerido una hipótesis inflamatoria sobre el efecto del estradiol sobre los TTM. Así, se sabe que el estradiol eleva la concentración de ciertas interleuquinas (IL) como IL-1 β , IL-6 e IL-8 en el cartílago de los TTM (Kawasaki et al, 2000; Yun et al 2008). Sin embargo, la forma en cómo los estrógenos inducen esta liberación de citoquinas no está aún aclarada.

Existen también algunos autores que han estudiado una posible relación etiológica entre ciertos polimorfismos genéticos del receptor tipo α de estrógenos y la predisposición a padecer TTM (Kim et al, 2010;

Ribero-Dasilva et al, 2009; Kang et al, 2007). Sin embargo, los resultados son contradictorios y a menudo no se refieren a los mismos genes.

1.4.2. GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES Y TRASTORNOS TEMPORO-MANDIBULARES

En Bioquímica, un radical libre es una especie molecular que posee un electrón desapareado, lo que la hace extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo. Los radicales libres se generan en la respiración celular debido a que los electrones transportados por los complejos de óxido-reducción de la mitocondria no siempre se transfieren al reductor final, el oxígeno, para producir agua. Esta reducción parcial de electrones genera un oxígeno con un electrón desapareado, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Aunque el transporte electrónico mitocondrial es muy eficiente para que no se produzcan estas reducciones parciales, es inevitable que se generen ciertas cantidades de anión superóxido (Culotta, 2000).

Tanto el anión superóxido como el peróxido de hidrógeno (generado por la superóxidodismutasa al actuar sobre el primero) y otras especies se llaman especies reactivas del oxígeno (ROS) y están implicadas cada vez más en una serie de procesos como el envejecimiento, la

aterogénesis, cáncer, etc (Beckman y Ames, 1998; Libby, 2000; Burr,1994). Esta generación de radicales libre se conoce también como estrés oxidativo.

En relación con los TTM, se ha desarrollado la hipótesis de que la producción de radicales libres en la ATM y la posterior inducción de los eventos moleculares pueden amplificar el daño en los tejidos articulares complicando el proceso (Milam et al, 1998).

1.4.3. ASPECTOS MOLECULARES DE LA SENSACIÓN DOLOROSA Y SU RELACIÓN CON LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

La percepción de la sensación dolorosa es un proceso complejo en el que intervienen múltiples procesos bioquímicos bien conocidos junto con otros de integración cortical, desconocidos hasta el momento. El dolor debe ser considerado una experiencia altamente subjetiva que se completa con experiencias físicas, psicológicas y sociales del individuo. La existencia de diferencias individuales en la respuesta al estímulo doloroso es una observación bien conocida que sugiere que algunos factores genéticos deben estar implicados en la modulación de la respuesta a estímulos dolorosos. Existe mucha bibliografía sobre polimorfismos genéticos y susceptibilidad al dolor, no sólo en su

aspecto nociceptivo, sino también en relación a factores psicosociales como el estrés, el miedo, el estado de humor... Estas variantes genéticas se han examinado recientemente en un artículo de revisión (Fernández Robles et al, 2012). Es interesante mencionar que, dentro de estos polimorfismos relacionados con la percepción dolorosa, destacan los sistemas de neurotransmisión (Price, 2000)

Así, se ha descrito que variantes de una región polimórfica del gen del transportador de serotonina SLCA4 relaciona el dolor con los TTM (Ojimaet al, 2007), aunque otros autores no encuentran esta asociación en la misma región polimórfica (Herken et al, 2001). También se han encontrado asociaciones entre el dolor de los TTM y ciertos haplotipos del gen del receptor β_2 adrenérgico (Diatchenko et al, 2007) y con ciertos polimorfismos del gen de la catecol-O-metiltransferasa (Nackley y Diatchenko, 2010).

OBJETIVOS

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TTM es un síndrome multifactorial que ha sido asociado a factores relativos al género (hormonales), anatómicos (morfogenéticos, biomecánicos e inflamatorios) y psicógenos (estrés, ansiedad). Como cualquier síndrome multifactorial, el TTM representa el problema de desentrañar los distintos factores que son la causa y la evolución del mismo. En este estudio se ha pretendido analizar posibles asociaciones de variantes genéticas, unas estudiadas previamente como receptores de estrógenos y el transportador de la serotonina SLC6A4, y otras nuevas, tales como los genes asociados al metabolismo de los folatos como factor nutricional, genes asociados al metabolismo oxidativo y el gen del receptor de Dopamina, como gen asociado a la percepción sensorial del bienestar.

Para este trabajo se ha planteado la implicación de 27 polimorfismos ubicados en 17 genes, y su relación con los TTM.

El estudio de genes relacionados con el ciclo de folatos participa directamente en las dos formas: la genética y la epigenética, a través de

la interacción de los factores nutricionales. De debe tener en cuenta que el déficit de folatos es la carencia vitamínica más prevalente en humanos. Por otro lado, el nivel oxidativo de los tejidos, mediado por marcadores genéticos polimórficos, está directamente relacionado con la inflamación, que a su vez se relaciona con tejidos susceptibles por su alto metabolismo o actividad, rol adjudicable a la ATM, y también sujeto a factores genéticos y epigenéticos. Un tercer planteamiento es que el estado emocional y el umbral y tolerancia a la percepción del dolor, relacionados con factores neurológicos y de neurotransmisión, también pueden estar asociados a marcadores genéticos. El conjunto de estos marcadores genéticos, analizados bien de forma individual o en interacción, puede aportar datos acerca de la etiología de la TTM.

2.2. HIPÓTESIS

2.2.1. GENERAL

El TTM es un síndrome multifactorial relacionado con un período de la vida humana de finalización del crecimiento en el que la base genética y su epigenética están asociados al metabolismo del ácido fólico, estrés oxidativo, hormonas y neurotransmisión. Existen polimorfismos

genéticos relacionados con cualquiera de estos metabolismos asociados al TTM.

2.2.2. PORMENORIZADAS

1. El TTM tiene un patrón de distribución poblacional claramente desequilibrado en favor de las mujeres. Esta desviación debe estar condicionada hormonalmente. Los receptores de las hormonas sexuales presentan polimorfismos genéticos con distinta funcionalidad. Las variaciones genéticas de los receptores de estrógenos están relacionadas con el TTM.
2. El ciclo de los folatos es un sistema enzimático gobernado por un conjunto de genes polimórficos y directamente relacionados con la nutrición. El déficit de folatos está relacionado con los TTM por vía genética y nutricional, dado que un déficit vitamínico asociado a unas variantes genéticas de menor o mayor funcionalidad favorece el proceso inflamatorio en tejidos articulares en fase de crecimiento.
3. El grado de oxidación de los tejidos está en relación con factores genéticos variables en función de las distintas actividades de las enzimas detoxicantes de radicales libres. La oxidación de los tejidos esta en relación directa con la actividad de los tejidos diana.

- La oxidación en los tejidos en la época de máximo crecimiento produce una activación de aquellos factores relacionados con la inflamación que, a su vez, están relacionados con la concentración de radicales libres y la capacidad de amortiguación por los sistemas enzimáticos antioxidativos. Los polimorfismos genéticos de las enzimas involucradas en la detoxicación oxidativa están relacionados con el TTM.
4. La percepción del dolor, síntoma univoco en el TTM, varía de unos individuos a otros a tenor de la variabilidad del metabolismo de la neurotransmisión. Los polimorfismos genéticos relacionados con el metabolismo de la serotonina y la dopamina están relacionados con el estado emocional y con la percepción del dolor, y por tanto, con el TTM.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 GENERAL

Determinar el grado de asociación de polimorfismos genéticos del metabolismo endocrino (estrógenos), nutricional (folatos),

neuropsicológico (dopamina y serotonina) y oxidativo (glutación) con el desarrollo de los TTM.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la asociación de los polimorfismos del receptor de estrógenos con el TTM.
2. Estudiar la asociación entre polimorfismos genéticos del ciclo de los folatos con el padecimiento de TTM.
3. Estudiar la asociación de polimorfismos genéticos relacionados con el grado oxidativo en pacientes con TTM.
4. Estudiar la asociación de algunas de las variantes más comunes asociadas al estado emocional y de la percepción del dolor con los TTM.
5. Determinar los grados de asociación de los haplotipos de los distintos polimorfismos estudiados con los TTM.

MATERIAL Y METODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio caso-control con objeto de evaluar el impacto de los polimorfismos genéticos, más adelante descritos, sobre los TTM. Un total de 229 individuos (69% mujeres, 31% hombres) se incluyeron en este estudio; 86 fueron pacientes diagnosticados de TTM y 143 fueron sujetos control sanos. El tamaño de la muestra se calculó en función de la prevalencia de los TTM y de la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos seleccionados en la población a estudiar.

3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Para el grupo de casos (pacientes afectados de TTM) se seleccionó, en primer lugar, 35 pacientes diagnosticados de TTM provenientes médicos odontólogos expertos en TTM de consultorios privados (“Clínica Rincón” y “Clínica Dental Aneiros”, ambas en Málaga, España). Por otro lado, se invitó a participar en el estudio a 556 estudiantes voluntarios de la Universidad de Málaga (57% mujeres, 43% hombres). Todos ellos contestaron a un cuestionario sobre TTM, descrito en la Tabla 2 (McNeill et al, 1990). 98 individuos respondieron

correctamente a cuatro o más preguntas del cuestionario. Estas personas fueron invitados a ser clínicamente evaluados por un odontólogo altamente cualificado en TTM siguiendo la guía RDC/TMD (Dworkin y LeResche, 1992). De ellos, 14 no acudieron al examen odontológico y 33 no tuvieron signos clínicos de TTM.

Por tanto, el grupo caso quedó constituido por 86 pacientes (35 diagnosticados previamente, 51 voluntarios diagnosticados), de los cuales el 74% fueron mujeres (edad media $19,4\pm 2,9$ años) y 26% hombres (edad media $23,6\pm 4,1$). Los criterios de exclusión para los pacientes con TTM fueron: historia clínica de lesiones traumáticas en cabeza y cuello, anomalías craneales de etiología conocida o desconocida, enfermedades inflamatorias crónicas, retardo mental, dependencia a drogas y enfermedades neurológicas.

El grupo control se construyó con los voluntarios que no respondieron afirmativamente a ninguna de las preguntas del cuestionario. Todos los participantes eran sujetos sanos sin ningún signo o síntoma de TTM. Se seleccionó a las personas con edad aproximada al grupo de casos. Resumiendo, el grupo control quedó constituido por 143 sujetos, 66% mujeres (edad media $19,6\pm 3,3$) y 34% hombres (edad media $22,3\pm 4,1$).

Tabla 2: Cuestionario para el diagnóstico de trastorno temporomandibular.

- 1. ¿Tiene dificultad o dolor, o ambos, cuando abre la boca o, por ejemplo, cuando bosteza?**
- 2. ¿Se queda su mandíbula atascada, bloqueada o se desencaja?**
- 3. ¿Tiene dificultad o dolor, o ambos, cuando mastica chicle, habla o usa sus mandíbulas?**
- 4. ¿Oye usted ruido en la articulación de su mandíbula?**
- 5. ¿Siente dolores en o cerca de los oídos, las sienas o las mejillas?**
- 6. ¿Se siente incómodo o extraño cuando muerde o mastica?**
- 7. ¿Tiene dolores de cabeza frecuentes?**
- 8. ¿Ha tenido una lesión reciente en la cabeza, en el cuello o en la mandíbula?**
- 9. ¿Ha sido previamente tratado por un problema de articulación de la mandíbula? Si es así, ¿cuándo?**

Todos los participantes firmaron un formulario de consentimiento informado y los entrevistadores registraron sus datos personales. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Málaga y conforme a la Declaración de Helsinki.

3.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN

Después de obtener el consentimiento informado, se recogieron muestras de mucosa oral de los 229 pacientes frotando la cara interna del carrillo con hisopos de algodón estéril y seco. Se notificó a los pacientes que no podían comer ni beber nada al menos una hora antes de la prueba.

La extracción de salting-out que se realizó, descrita previamente por Martínez et al (1998), consiste básicamente en:

- Lisis celular en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 con SDS (1%) y proteinasa K (1mg/ml) durante toda la noche a 37°C.
- Precipitación de las proteínas por adición de ClNa 3M y centrifugación a 12.000 rpm 5 min.
- Precipitación del DNA del sobrenadante mediante adición de isopropanol y centrifugación 12.000 rpm 5 min.

- Lavado del pellet con etanol al 70% varias veces.
- Reconstitución del pellet, una vez seco de etanol, con agua estéril libre de DNA.

3.4. TÉCNICAS DE GENOTIPADO

En este trabajo se analizaron 27 polimorfismos genéticos de 17 genes. Un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población, siempre que esta variación aparezca en al menos un 1% de la población. Estas variaciones en la secuencia pueden ser de tipos diferentes:

- Polimorfismos de una sola base (SNP, del inglés “single nucleotide polymorphism”). Este cambio de una sola base puede estar en los exones, en los intrones, o en regiones flanqueantes del gen (5'-URT o “corriente arriba”, si es la región previa al primer codón de traducción, o 3'-UTR o “corriente abajo”, en la región posterior al último codón traducido).
- Otros polimorfismos no son sustituciones de bases, sino que son deleciones o inserciones de una o varias bases, o la existencia

de un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) o, a veces, hasta la desaparición completa del gen (genotipo nulo). Es decir, la variabilidad está siempre relacionada con la disminución o aumento del número de bases del gen. Ya que las técnicas empleadas para el análisis de estos polimorfismos es diferente al análisis de SNPs. llamaremos a éste último *Análisis de Fragmentos (FRG)* y al primero *Análisis de SNPs*.

3.4.1. ANÁLISIS DE SNPs: AMPLIFICACIÓN DE DNA EN MULTIPLEX Y MINI-SECUENCIACIÓN

Todos los genotipados, sean de SNPs o de fragmentos, tienen en común un primer proceso, que es la amplificación de DNA mediante una técnica universalmente conocida como es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). No vamos a detenernos en una explicación detallada de esta técnica, y baste con decir que mediante el empleo de un par de pequeñas secuencias (denominadas primeras o cebadores) y un cierto número de ciclos de altas y bajas temperaturas, se puede obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA específico (Mullis et al, 1986). En la Figura 11 se resume el proceso de PCR.

La PCR se puede hacer individual, de una sola secuencia del genoma, o bien de varias secuencias a la vez en un mismo tubo de ensayo,

mediante el empleo de tantas parejas de cebadores como secuencias se quieran estudiar (Figura 12). A esta técnica se la conoce como PCR multiplex (Hayden et al, 2008). Las condiciones mínimas que debe cumplir una PCR multiplex son:

- Todos los cebadores deberán reaccionar a una Temperatura de fusión (T_m) similar, dentro de un rango de $\pm 5^\circ\text{C}$.
- Los tamaños de los productos amplificados de la PCR deberán ser también semejantes pero distinguibles, entre unos valores de 200 a 600 pares de bases (pb).

Una vez amplificadas las diferentes secuencias que se quieren estudiar, se debe emplear un método de detección de los diferentes polimorfismos. Estas técnicas son muy variadas, como la electroforesis en gel, el empleo de sondas fluorescentes o la mini-secuenciación. En este trabajo la detección de los SNPs, una vez amplificados, se realizó mediante la técnica de mini-secuenciación (Pastinen et al, 1997).

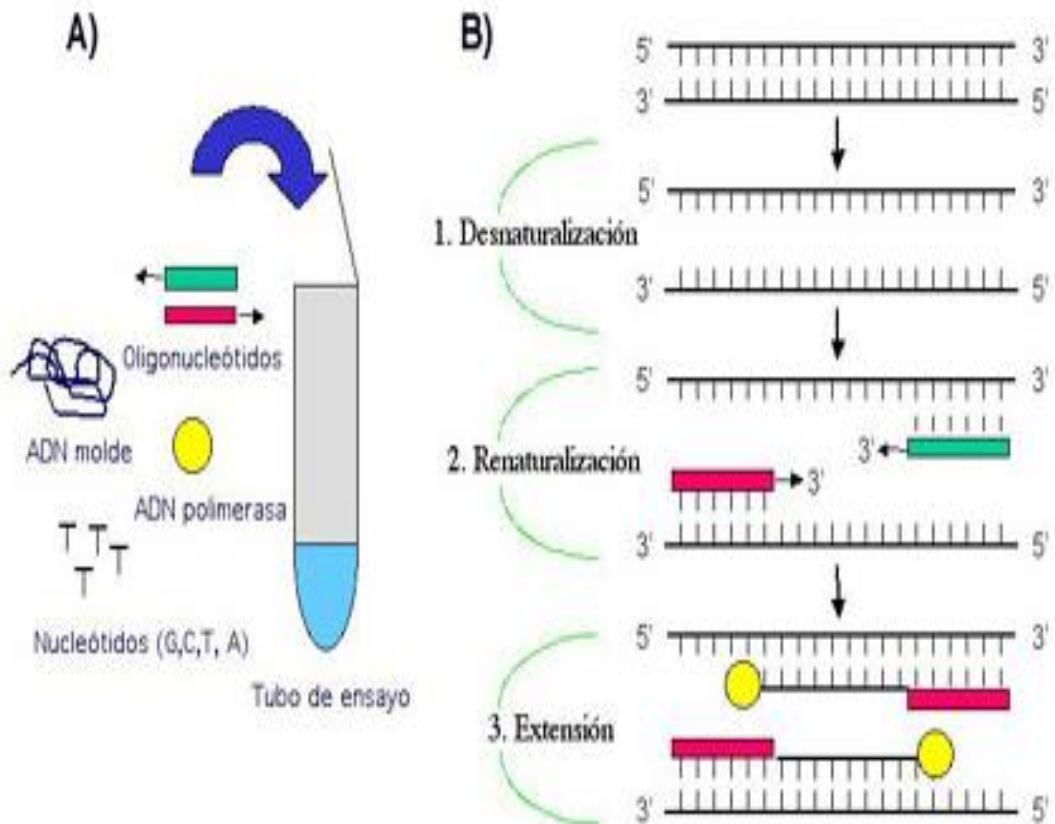


Figura 11: Ciclo de una PCR (B) y reactivos necesarios (A).

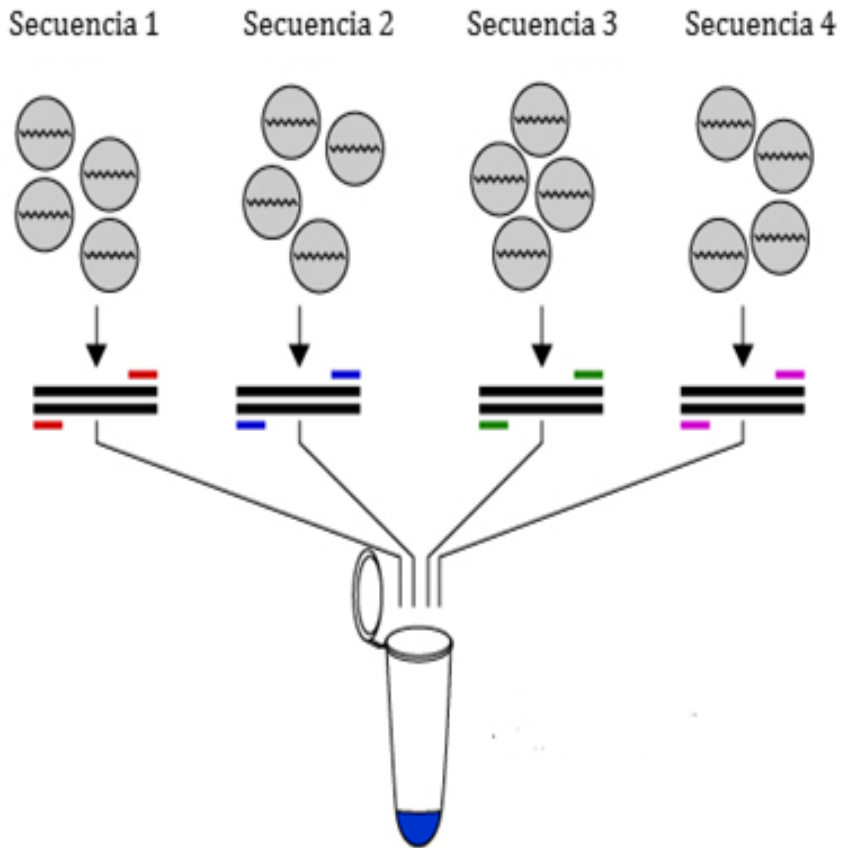


Figura 12: Esquema de una PCR multiplex de cuatro secuencias.

La mini-secuenciación consiste en la utilización de un cebador (cebador de mini-secuencia) que se hibrida a una secuencia inmediatamente adyacente a la posición donde se encuentra el SNP y, mediante el empleo de didesoxinucleótidos marcados fluorescentes y una DNA polimerasa, se añade el nucleótido marcado complementario al sitio donde se halla el SNP. Cada didesoxinucleótido (ddGTP,

ddATP, ddCTP y ddTTP) está marcado con una sustancia fluorescente diferente. La reacción de mini-secuenciación se realiza en todos los SNPs de la multiplex a la vez. Una vez realizada esta reacción se pasa al sistema de medida, que suele ser una electroforesis capilar (que separa cada SNP por su tamaño), seguida de una detección fluorescente de cada secuencia amplificada, para conocer qué base se ha incorporado en la mini-secuenciación.

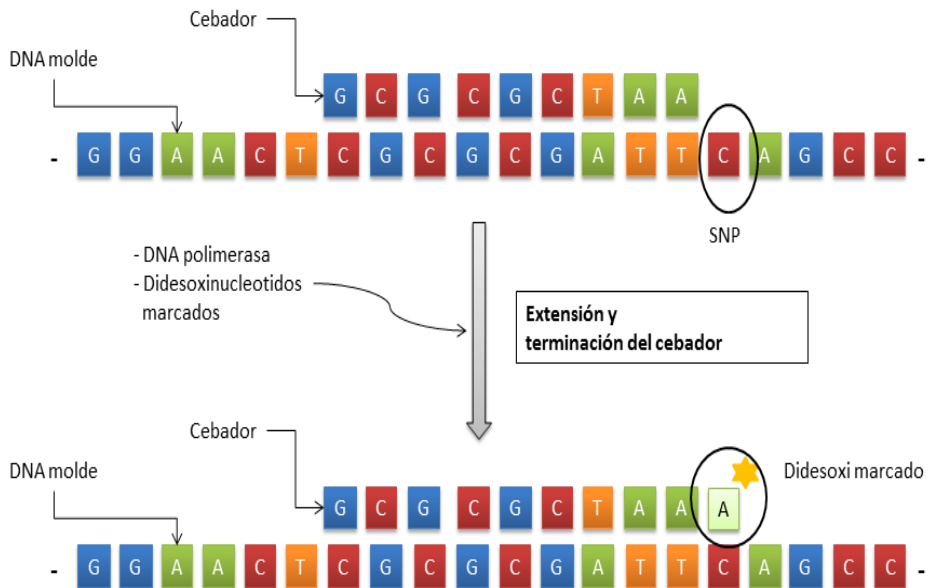


Figura 13: Mini-secuenciación de una sola base.

3.4.2. ANÁLISIS DE FRAGMENTOS: PCR MULTIPLEX Y DETECCIÓN DEL TAMAÑO AMPLIFICADO

En este caso, el procedimiento es más sencillo, ya que las secuencias cuyo polimorfismo consiste en deleciones, inserciones, VNTR, etc. tienen un número de pb diferentes, es decir, un tamaño diferente. Estos polimorfismos, por tanto, son fáciles de medir en electroforesis capilar marcando uno de los dos cebadores con fluorescencia (Butler et al, 2001).

En resumen, para el FRG (inserciones, deleciones, VNTR, alelo nulo) se realiza en primer lugar una PCR multiplex, dónde uno de los dos cebadores que usamos para cada secuencia esta marcado con una sustancia fluorescente. Una vez realizado el número de ciclos adecuados, se desarrolla una electroforesis capilar con detección fluorescente, y como cada amplificado tiene un tamaño (el delimitado por los dos cebadores) y una de las sondas está marcada en la zona polimórfica, son posibles de identificar.

3.5. PROTOCOLOS PARA EL GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS

Se diseñaron tres plataformas para el análisis de los diferentes polimorfismos genéticos estudiados (Tabla 3). Dos de ellas se diseñaron para el análisis de los 20 SNPs estudiados (SNP1 y SNP2) y la tercera para el análisis de otros polimorfismos de 7 variantes genéticas diferentes al SNP (deleciones, inserciones, VNTR, genotipo nulo) que hemos llamado FRG.

Los cebadores se diseñaron usando el software para análisis de cebadores *Oligo*, versión 4.0, y se sintetizaron comercialmente (AppliedBiosystem). Todas las secuencias de cebadores usadas en este trabajo se encuentran en la Tabla 4. Para verificar la validez y reproductibilidad de las técnicas, la calidad de cada polimorfismo aislado se chequeó mediante PCR aisladas.

Tabla 3: Diseño de las tres plataformas de genotipado.

<i>SNP1</i>	<i>SNP2</i>	<i>FRG</i>
SHMT rs1979276	TCN rs1801198	TYMS rs34489327
SHMT rs1979277	MTHFR rs1801131	TYMS rs34743033
SHMT rs643333	MTHFR rs1801133	CBS cbs844ins68
SHMT rs638416	CBS rs5742905	DHFR DHFR19bpdel
SHMT rs3783	ABCB1 rs1045642	GSTM1 GSTM1del
TYMS rs2853542	MTR rs12749581	DRD4 drd4-48bptr
TCN rs9606756	ESR1 rs9340799	SCC6A4 5-HTTLPR
ATIC rs2372536	ESR1 rs2234693	
BHMT rs3733890		
MTHFD1 rs2236225		
MTRR rs1801394		
RFC1 rs1051266		

Tabla 4: Información de los polimorfismos incluidos en el estudio.

Nombre	Referencia	SNP/F	Localización	A1	A2	Cebadores 5'	Cebadores 3'	Cebadores de Minisequencia	Mult.
SHMT1	rs1979276	SNP	3'-UTR	A	G	CTGGCAGGGGATAAAGTACAG	GTCAACAGTTCCTCTTTGGA	CCGGAGGACCCCCAC	SNP1
	rs1979277	SNP	EXON	A	G	CTGGCAGGGGATAAAGTACAG	GTCAACAGTTCCTCTTTGGA	(T)31-GCCAGGCAGGGGAAGA	SNP1
	rs643333	SNP	5'-UTR	A	C	TGGACGCACATTTTGCTCTAC	ATCAGAGAGCCGACCAAG	(T)24-ACCTGCAGAACTGACCC	SNP1
	rs638416	SNP	5'-UTR	C	G	TGGACGCACATTTTGCTCTAC	ATCAGAGAGCCGACCAAG	(T)91-GCAGGGCTGTTCTCC	SNP1
	rs3783	SNP	3'-UTR	C	G	CTGGCAGGGGATAAAGTACAG	GTCAACAGTTCCTCTTTGGA	(T)115-GGGGTCCTCCGGCAG	SNP1
TYMS	rs2853542	SNP	5'-UTR	C	G	GTGCCACACCCGTGGCTCC	GCCACAGGATG66GCGG	(T)84-GGGAGCGGAGGCAGGC	SNP1
	rs34489327	F	3'-UTR	I	D	PET-CAAACTCTGAGGAGCTGAGT	CAGATAAGTTGGAGTACAGA		F
	rs34743083	F	5'-UTR	2R	3R	VIC-GTGCACACCCGTGGCTCC	GCCACAGGATG66GCGG		F
TCN	rs9606756	SNP	EXON	A	G	GGAGAAGGCCCTGGTAACG	CTTCTTGTGCCAGCCTG	(T)64-GGCTGTCCATCTCTGGTA	SNP1
	rs1801198	SNP	EXON	C	G	GGGAAAGAGACCTGGAGC	GCTGGGAAATCATGAGAGC	(T)58-CCCAGTTCGCCCA	SNP2
MTHFR	rs1801131	SNP	EXON	A	C	CTTTGGGAGCTGAGGACTACTAC	CACTTTGTGACCAATCCGGTTTG	(T)71-AGGAGCTGACCAGTGAAG	SNP2
	rs1801133	SNP	EXON	C	T	GTGGTCTCTTCATCCCTCG	GACGGTCCGGTGAAGTGG	GAAGGTGTCTGCGGGAG	SNP2
CBS	rs5742905	SNP	EXON	C	T	GGTTCCTGGGTTTCTCATCC	CTCCGTCTGGTTCAGTCC	(T)42-GCGCCCTCTGCAGATCA	SNP2
	cbs844ins68	F	INTR/EXON	S	L	6FAM-GTTGTTAAAGCGCGGTAATGG	GTTGTCTGCTCCGTCTGGTT		F
ABCB1	rs1045642	SNP	EXON	C	T	GCTGAGAACATTCGCTATGG	TAAGGGTGTGATTTGGTTGC	(T)34-GGTTGCACAGGAGAGAT	SNP2
	rs2372536	SNP	EXON	C	G	CCTAGATAGCTGTAACCAC	GTAATCCCAAAACACAATC	(T)18-CCACAGCCTCTCAACA	SNP1
BHMT	rs3733890	SNP	EXON	A	G	TGTGAACCTGCCACTTTGACC	ATGGGAAATCTGGGAGATCG	ATCAGGTGAGCTTTCAGT	SNP1
	DHFR19pdel	F	INTRON	+	-	ACGGTCGGGGTGGCCGACTC	6FAM-AAAAGGGGAATCCAATCGG		F
GSTM1	GSTM1del	F	EXON	+	-	PET-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC	GTTGGGCTCAAATAACGGTGG		F
	rs2236225	SNP	EXON	C	T	CCCACTTGAAGCAGGATTG	CATCCAAATTCCTCTGATG	(T)59-AACAAGCTTGAGTGGCATC	SNP1
MTHFD1	rs12749581	SNP	EXON	A	G	GCAATTGACCAATACTACACC	TCCAAAGCCTTTTACATCC	AATATGAAGATATTAGACAGG	SNP2
	rs1801394	SNP	EXON	A	G	TTTCAGTTTCACTGTTTACATGC	GTAACGGCTCTAAACCTTATCG	(T)51-ACCACAGCTTGCTCAACA	SNP1
RFC1	rs1051266	SNP	EXON	A	G	TTCCAGGCACAGTGTCCACC	CCCGTGAAGTTTCTGTGC	(T)40-CCGGTCTGCGCGC	SNP1
	rs9340799	SNP	INTRON	A	G	AGGGTTATGTGGCAATGACG	CTGCACCAAGAATAITGTTACC	(T)4-AGACCTCTGAGTGTGGTCT	SNP2
DRD4	rs2234693	SNP	INTRON	C	T	AGGGTTATGTGGCAATGACG	CTGCACCAAGAATAITGTTACC	(T)28-AGTTCCAAATGTCCACGC	SNP2
	drd4-48bptr	F	EXON	S	L	NED-GCTGCTGCTCTACTGGGC	CCGCGCGGTGATCTGG		F
SLC6A4	5-HTTLPR	F	5-HTTLPR	S	L	VIC-GGCTGGCCGCTCTGAAGTC	GTGCCACCTAGACGCCAGG		F

F = Fragmento; A1 = Alelo 1; A2 = Alelo 2; Mult. = Reacción de multiplex.

3.5.1. PROTOCOLO PARA EL GENOTIPADO DE SNPs

Los genotipados de las dos plataformas de SNP se realizaron mediante mini-secuenciación multiplex precedida de PCR multiplex (Carvalho y Pena, 2005). Este protocolo consta de tres pasos:

1. Amplificación de las regiones flanqueantes de los SNPs por PCR multiplex. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ L con los siguientes componentes:

- 100 ng de DNA genómico.
- Tampón 1xAmpliTaq Gold® (Applied Biosystem).
- $MgCl_2$ 1.5 mM.
- dNTPs 0.2 mM.
- 1 unidad de ampliTaq Gold® DNA polimerasa.
- Mezcla de pares de cebadores (concentración de cebador entre 0,1 y 0.6 mM).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2720 (AppliedBiosystem) y consistió 94°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a

72°C. Terminados los ciclos se continuó con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los productos del PCR se chequearon en un gel de agarosa (Aldrich) al 2% y se tiñeron con SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen), observándose las bandas correspondientes entre 100 y 400 pb.

Para eliminar el exceso de cebadores y dNTPs, los productos de PCR se digirieron con una mezcla de exoCIAP (exonucleasa I y fosfatasa alcalina de intestino de ternera) que consistió en 2 unidades /10 µL PCR de exonucleasa I de *E.colli* (Exo I, Takara®) y 5 unidades/10 µL PCR de fosfatasa alcalina (CiAP, Takara®), incubándose a 37°C durante 60 minutos. Una vez acabado, las enzimas se inactivaron por calor a 80°C durante 20 minutos.

2. Mini-secuenciación multiplex de cada locus de los multiplex SNP (SNP1, SNP2). Los cebadores de mini-secuenciación con el extremo 3' adyacente al SNP diana se diseñaron para que se hibridaran con los productos de PCR correspondientes (ver Tabla 4). Una reacción de mini-secuenciación extendió este cebador, produciéndose diferentes productos para cada alelo. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 11 µL:

- 4 µL de producto de PCR purificado.

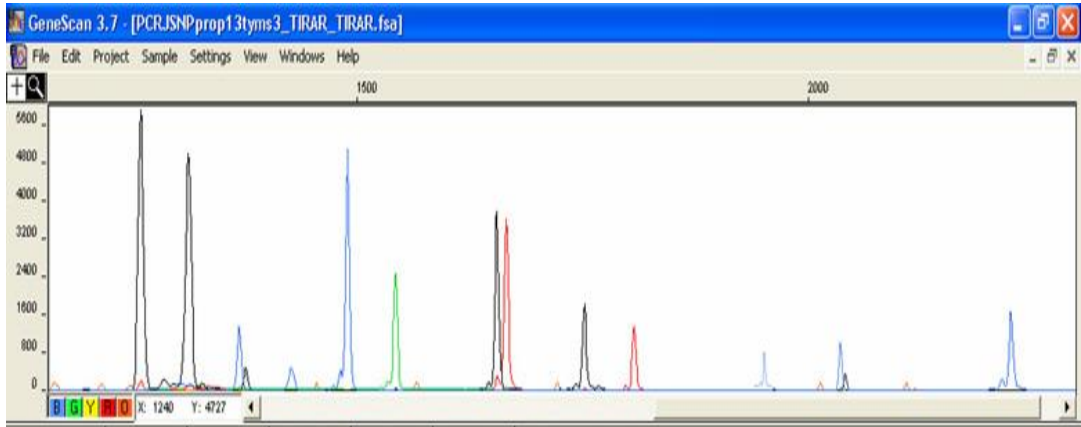
- 6 μL de una mezcla de los cebadores de mini-secuenciación (2 $\text{pM}/\mu\text{L}$).
- 1 μL de kit SNaPshot® multiplex (Applied Biosystem).

Las condiciones de mini-secuenciación consistieron en 40 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 7 segundos y 60°C durante 30 segundos. Después de esto, se procedió a purificar la muestra usando 1 unidad de fosfatasa alcalina (Takara®) a 37°C durante una hora. Por último, se inactivó la actividad enzimática durante 20 minutos a 80°C.

3. Análisis de los productos de mini-secuenciación por electroforesis capilar. Se mezclaron 4 μL de los productos de mini-secuenciación purificados con 10 μL de HIDITM formamida y 0,2 μL de GeneScan-120 LIZ® size standard (AppliedBiosystem) y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Los productos marcados fluorescentes se resolvieron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3130 (AppliedBiosystem). La matriz DS02 (AppliedBiosystem) se usó a velocidad total durante 17 minutos con 8 segundos de inyección. Los datos recogidos se analizaron con el software GeneMapper™ 4.0 (AppliedBiosystem).

En la Figura 14 se muestra el electroforograma con los diferentes picos de los locus analizados de las dos plataformas de SNP.

A. Secuenciación de los genotipos de la plataforma SNP1.



B. Secuenciación de los genotipos de la plataforma SNP2.

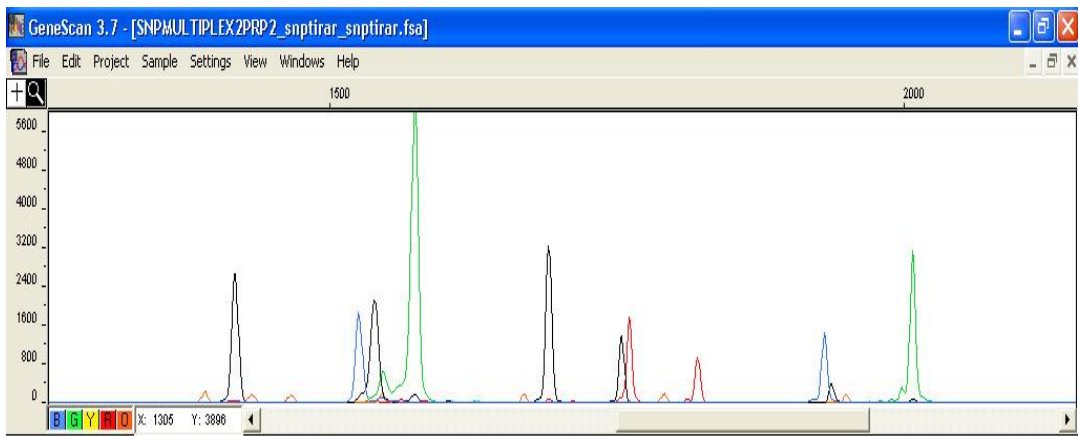


Figura 14: Análisis de picos de los electroforogramas de las plataformas de genotipado SNP1 (A) y SNP2 (B).

3.5.2. PROTOCOLO PARA EL GENOTIPADO DE FRAGMENTOS

Aquellos polimorfismos diferentes a SNPs (inserciones, deleciones, repeticiones en tándem, genotipo nulo) se detectaron mediante un PCR multiplex bajo las siguientes condiciones:

- 100 ng DNA genómico.
- Tampón 1xGoTaq Flexi® (Promega).
- MgCl₂ 1,5 mM.
- 0,2 mM de pares de cebadores (concentración de cebador entre 0,1 y 0.6 mM), uno de cada par marcados.
- Betaína 50 mM.
- 1 unidad de GoTaqFlexi® DNA polimerasa (Promega).

Los cebadores marcados con fluorescencia se muestran en la Tabla 4. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2720 (AppliedBiosystem) y consistió en 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C y 60 segundos a 72°C. Al acabar los ciclos se terminó con una extensión final durante 7 minutos a 72°C.

Los productos del PCR se chequearon en un gel de agarosa (Aldrich) al 2% y se tiñeron con SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen), observándose las bandas correspondientes entre 100 y 600 pb.

Para eliminar el exceso de cebadores y dNTPs, los productos de PCR se digirieron con una mezcla de exoCIAP (exonucleasa I y fosfatasa alcalina de intestino de ternera) que consistió en 2 unidades /10 µL PCR de exonucleasa I de *E.colli* (Exo I, Takara®) y 5 unidades/10 µL PCR de fosfatasa alcalina (CiAP, Takara®), incubándose a 37°C durante 60 minutos. Una vez acabado las enzimas se inactivaron por calor a 80°C durante 20 minutos.

A continuación se llevó a cabo el análisis de los productos de PCR por electroforesis capilar. Se mezclaron 4 µL de los productos de minisequenciación purificados con 10 µL de HIDIT™ formamida y 0,2 µL de GeneScan-600 LIZ® size standard (AppliedBiosystem) y se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos. Los productos marcados fluorescentes se resolvieron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3130 (AppliedBiosystem). La matriz DS33 (AppliedBiosystem) se usó a velocidad total durante 45 minutos con 5 segundos de inyección. Los datos recogidos se analizaron con el software GeneMapper™ 4.0 (AppliedBiosystem).

En la Figura 15 se muestra el electroforograma con los diferentes picos de los locus analizados de la plataforma de fragmentos.

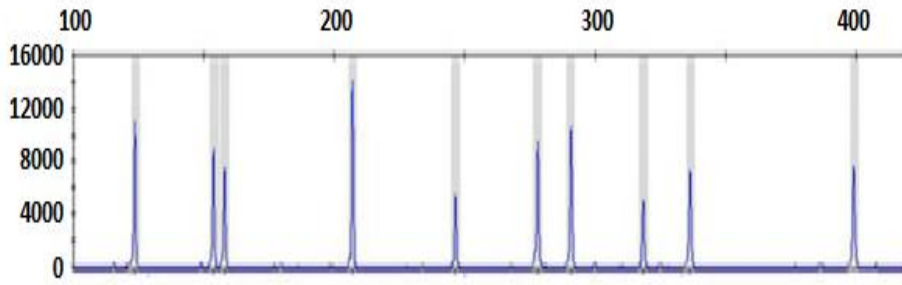


Figura 15: Análisis de picos de los electroforogramas de las plataformas de genotipado de fragmentos.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis relativos a los test y anamnesis se realizaron mediante el software estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS v. 16,0 para Macintosh; SPSS Inc., Chicago, IL).

Para determinar las diferencias de frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo estudiado entre pacientes TTM y sanos, un se utilizó la prueba de chi-cuadrado (χ^2). Cualquier valor $p < 0,05$ fue considerado como diferencia estadísticamente significativa. Para la evaluación del riesgo entre sujetos con TTM y controles sanos se

calculó la *odds ratio* (OR) mediante el test de Cochran-Mantel-Haenzel con un intervalo de confianza (IC) del 95%. La *odds ratio* se puede definir como la probabilidad de que un determinado rasgo (en este caso los genotipos estudiados) se presente en un grupo de población (en nuestro caso los TTM) frente al riesgo de que ocurra en otro (en nuestro caso los controles). Si el valor de este parámetro se acerca a 1 significa que dicho rasgo (genotipo) tiene el mismo riesgo en ambas poblaciones. Se considerará significativo cuando $OR \pm IC$ no incluya el valor 1.

También se estudió si las frecuencias de los diferentes genotipos estudiados, tanto en TTM como en controles sanos, se hallaban en equilibrio de Hardy-Wainberg mediante un análisis de frecuencia χ^2 . Dicho equilibrio significa que en una población la frecuencias relativas de cada uno de los tres genotipos de un polimorfismo (homocigóticos salvajes, heterocigóticos y homocigóticos mutados) deben permanecer constantes y seguir un modelo de distribución estadística. Es decir, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. Estas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus. En el caso más sencillo, con un locus con dos alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el equilibrio de Hardy-

Weinberg predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto salvaje AA es p^2 , la del heterocigoto Aa es $2pq$ y la del homocigoto mutado aa, es q^2 . El principio de Hardy-Weinberg es una expresión de la noción de una población que está en "equilibrio genético", y es un principio básico de la genética de poblaciones.

RESULTADOS

Los análisis de genotipo se realizaron en 229 sujetos (69% mujeres), de los cuales 86 fueron diagnosticados de TTM y 143 fueron clasificados como controles sanos. No todas las muestras fueron válidas para todos los genotipos, debido a que el número de los individuos puede variar de uno a otro polimorfismo.

4.1. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

En las Tabla 5.1 y 5.2 se expresan los resultados del análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg de todos los polimorfismos, tanto en casos como en controles. El cociente expresa la frecuencia relativa de cada alelo. La columna referencia indica la frecuencia alélica en poblaciones caucásicas encontradas en las bases de datos. Como base de datos referencia se han usado las encontradas en el Proyecto Internacional HapMap. En caso de no hallarse distribuciones poblacionales en el HapMap, se ha usado bibliografía de referencia en ese polimorfismo. Todas las poblaciones referenciales son caucásicas.

El HapMap es un catálogo de variantes genéticas comunes que se producen en los seres humanos. Describe lo que son estas variantes, dónde se encuentran en nuestro ADN, y la forma en que se distribuyen

entre las personas dentro de las poblaciones y entre poblaciones de diferentes partes del mundo. El proyecto está diseñado para proporcionar información que otros investigadores puedan utilizar para vincular las variantes genéticas de riesgo con enfermedades específicas, lo que dará lugar a nuevos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Como se observa en dicha tabla, únicamente se encontraron dos polimorfismos que no se hallaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. El rs1979277 del SHMT en el grupo control y el rs2236225 de la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa tipo 1 (MTHFD1) en el grupo de TTM. En la discusión se hablara de las consecuencias que dicho desequilibrio origina en estos polimorfismos.

Tabla 5.1: Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos estudiados.

GEN	CONTROLES	TMD	REFERENCIA	ORIGEN DATOS
SHMT				
rs1979276	0.66/0.34; p=0.60	0.57/0.43; p=0.46	0.67/0.32	HapMap
rs1979277	0.43/0.57; p<0.01*	0.67/0.33; p= 1.0	0.66/0.33	HapMap
rs64333	0.72/0.28; p=0.82	0.76/0.24; p=0.37	0.69/0.31	HapMap
rs638416	0.70/0.30; p=0.83	0.51/0.59; p=0.91	0.68/0.32	HapMap
rs3783	0,85/0,15; p=0,74	0,80/0,20; p=0,30	0,71/0,29	HapMap
TYMS				
rs2853542	0,88/0,12; p=0,21	0,87/0,13; p=0,34	0,78/0,22	Lima et al, 2013
rs34489327	0,75/0,25; p=0,42	0,70/0,30; p=0,16	0,72/0,28	Hap Map
rs34743033	0,56/0,54; p=0,83	0,58/0,42; p=1.0	0,56/0,44	HapMap
TCN				
rs9606756	0,86/0,14; p= 0,69	0,86/0,14; p=0,18	0,80/0,20	HapMap
rs1801198	0,70/0,30; p=0,51	0,63/0,37; p=0,81	0,55/0,45	HapMap
MTHFR				
rs1801131	0,72/0,28; p=0,82	0,73/0,27; p=0,15	0,66/0,34	HapMap
rs1801133	0,58/0,42; p=1.0	0,59/0,41; p=1.0	0,69/0,31	HapMap
CBS				
rs5742905	0,86;0,14; p=1.0	0,91/0,09; p=1,0	0,95/0,05	HapMap
cbs844ins68	0,89/0,11; p=0,33	0,92/0,08; p=0,88	0,89/0,11	Franco et al, 1998
ABCB1				
rs1045642	0.50/0.50; p=0.86	0.60/0.40; p=1.00	0.52/0.47	HapMap
ATIC				
rs2372536	0.63/0.37; p=0.21	0.65/0.35; p=0.5	0.72/0.28	HapMap

Se muestra la razón de las frecuencias relativas de cada alelo de todos los genes estudiados, tanto en casos como en controles.

Tabla 5.2: *Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos estudiados.*

GEN	CONTROLES	TMD	REFERENCIA	ORIGEN DATOS
BHMT				
rs3733890	0.63/0.37; p=0.70	0.65/0.35; p=0.31	0.71/0.29	HapMap
DHFR				
dhfr19del	0.57/0.43; p=0.68	0.52/0.58; p=0.24	0.55/0.45	Johnson et al, 2004
GSTM1				
gstm1del	0.70/0.30	0.62/0.38	0.57/0.43	Verlaan et al, 2003
MTHFD1				
rs2236225	0.54/0.46; p=0.09	0.41/0.59; p=0.016*	0.54/0.46	HapMap
MTR				
rs185087	0.80/0.20; p=0.78	0.84/0.16	0.77/0.23	HapMap
MTRR				
rs1801394	0.52/0.48; p=0.46	0.39/0.61; p=1.0	0.55/0.44	HapMap
RFC1				
rs1051266	0.52/0.48; p=0.86	0.53/0.47; p=0.49	0.55/0.45	HapMap
ESR1				
rs9340799	0.67/0.33; p=0.69	0.71/0.29; p=0.58	0.70/0.30	HapMap
rs2234693	0.51/0.49; p=0.60	0.55/0.45; p=0.26	0.59/0.41	HapMap
DRD4				
Drd4448bpr	0.92/0.08; p=0.15	0.98/0.02; p=1.0	0.95/0.05	Seaman et al, 1999
SLC6A4				
5-HTTLPR	0.60/0.40; p=0.24	0.61/0.39; p=0.07	0.69/0.31	Gelernter et al, 1999

Se muestra la razón de las frecuencias relativas de cada alelo de todos los genes estudiados, tanto en casos como en controles.

4.2. ANÁLISIS DE RIESGO DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS

Las diferencias observadas entre las frecuencias genotípicas en pacientes con TTM y controles sanos, así como su $OR \pm IC$ se muestran en la Tabla 6. Solamente se encontraron diferencias significativas y riesgos en unos pocos polimorfismos, que a continuación describiremos con detalle. Aquellos dónde no hubo diferencias significativas no se mencionarán en el texto, pero se mostrara una representación gráfica de los datos de todos ellos en las figuras de la 16 a la 21, que aparecen al final de los resultados.

Tabla 6: Frecuencia de alelos y genotipos en grupos y controles y TTM.

GENE	REFERENCE	ALLELE	PATIENTS			CONTROLS			A1/A2	χ ² genotype	Allele	ODDS RATIOS OD	95%CI	p
			G1	G2	G3	G1	G2	G3						
SHMT1	rs1979276	A/G	7 (0.10)	36 (0.49)	30 (0.41)	0,34/0,66	24 (0,20)	54 (0,45)	41 (0,34)	0,43/0,57	G	3,99	1,72-9,25	0,002
	rs1979277	A/G	8 (0.11)	31 (0.44)	32 (0.45)	0,33/0,67	35 (0,34)	28 (0,27)	41 (0,39)	0,47/0,53	ns	-	-	-
	rs643333	A/C	3 (0.04)	32 (0.43)	39 (0.53)	0,26/0,74	10 (0,08)	47 (0,39)	64 (0,53)	0,28/0,72	ns	-	-	-
	rs638416	C/G	19 (0.24)	39 (0.50)	20 (0.26)	0,49/0,51	12 (0,10)	50 (0,41)	60 (0,49)	0,30/0,70	0,001	2,80	1,51-5,21	0,013
	rs3783	C/G	1 (0.01)	27 (0.36)	46 (0.62)	0,20/0,80	2 (0,02)	33 (0,28)	85 (0,71)	0,15/0,85	ns	-	-	-
TYMS	rs2853542	C/G	55 (0.73)	20 (0.27)	0 (0.00)	0,87/0,13	96 (0,76)	30 (0,24)	0 (0,00)	0,88/0,12	ns	-	-	-
	rs34489927	DI	9 (0.13)	25 (0.35)	38 (0.53)	0,30/0,70	7 (0,08)	32 (0,34)	54 (0,58)	0,25/0,75	ns	-	-	-
TCN	rs34743033	2R3R	12 (0.17)	36 (0.50)	24 (0.33)	0,42/0,58	10 (0,12)	55 (0,64)	21 (0,24)	0,44/0,56	ns	-	-	-
	rs9606756	A/G	57 (0.75)	16 (0.21)	3 (0.04)	0,86/0,14	85 (0,73)	30 (0,26)	1 (0,01)	0,86/0,14	ns	-	-	-
MTHFR	rs1801198	C/G	30 (0.38)	38 (0.49)	10 (0.13)	0,63/0,37	56 (0,46)	61 (0,50)	6 (0,05)	0,70/0,30	ns	-	-	-
	rs1801131	A/C	44 (0.57)	25 (0.32)	8 (0.10)	0,73/0,27	64 (0,53)	47 (0,39)	10 (0,08)	0,72/0,28	ns	-	-	-
CBS	rs1801133	C/T	27 (0.35)	37 (0.48)	13 (0.17)	0,59/0,41	43 (0,34)	62 (0,49)	22 (0,17)	0,58/0,42	ns	-	-	-
	rs5742905	C/T	0 (0.00)	12 (0.18)	54 (0.82)	0,09/0,91	2 (0,02)	27 (0,25)	81 (0,74)	0,14/0,86	ns	-	-	-
ABCB1	cbs844ins68	SL	59 (0.84)	11 (0.16)	0 (0.00)	0,92/0,08	68 (0,81)	14 (0,17)	2 (0,02)	0,89/0,11	ns	-	-	-
	rs1045642	C/T	28 (0.36)	38 (0.49)	12 (0.15)	0,60/0,40	30 (0,24)	64 (0,51)	31 (0,25)	0,50/0,50	ns	-	-	-
AT1C	rs2372536	C/G	23 (0.49)	18 (0.38)	6 (0.13)	0,68/0,32	44 (0,43)	42 (0,41)	17 (0,17)	0,63/0,37	ns	-	-	-
	rs3733890	A/G	11 (0.15)	29 (0.40)	32 (0.44)	0,35/0,65	17 (0,14)	54 (0,45)	49 (0,41)	0,37/0,63	ns	-	-	-
DHFR	DHFR19del	+	22 (0.31)	31 (0.43)	19 (0.26)	0,52/0,48	29 (0,31)	48 (0,52)	16 (0,17)	0,57/0,43	ns	-	-	-
	GSTM1del	-	17 (0.23)	56 (0.77)		0,62/0,38	39 (0,40)	58 (0,60)		0,70/0,30	0,015	2,21	1,24-4,36	0,030
MTHFD1	rs2236225	C/T	7 (0.09)	47 (0.63)	21 (0.28)	0,41/0,59	28 (0,24)	70 (0,60)	18 (0,16)	0,54/0,46	0,011	3,09	1,27-7,50	0,016
	rs1805087	A/G	55 (0.71)	20 (0.26)	2 (0.03)	0,84/0,16	80 (0,63)	42 (0,33)	4 (0,03)	0,80/0,20	ns	-	-	-
MTRR	rs1801394	A/G	28 (0.37)	37 (0.49)	11 (0.14)	0,61/0,39	29 (0,25)	54 (0,47)	33 (0,28)	0,48/0,52	0,046	2,35	1,10-5,00	-
	rs1051266	A/G	15 (0.20)	42 (0.55)	19 (0.25)	0,47/0,53	28 (0,23)	59 (0,49)	33 (0,28)	0,48/0,52	ns	-	-	-
ESR1	rs9340799	A/G	37 (0.48)	35 (0.45)	5 (0.06)	0,71	55 (0,43)	59 (0,46)	13 (0,10)	0,67/0,33	ns	-	-	-
	rs2234693	C/T	13 (0.17)	44 (0.56)	21 (0,27)	0,45	32 (0,25)	60 (0,48)	34 (0,27)	0,49/0,51	ns	-	-	-
DRD4	dr448bptr	SL	50 (0.96)	2 (0.04)	0 (0.00)	0,98	69 (0,87)	7 (0,09)	3 (0,04)	0,92	3,12	0,76-17,2	0,161	
SCL6A4	5-HTTLPR	SL	20 (0.43)	16 (0.35)	10 (0.22)	0,61	31 (0,40)	32 (0,41)	15 (0,19)	0,60	-	-	-	

ns = sin diferencia estadística.

4.2.1. GEN DE LA SERINA HIDROXIMETILTRANSFERASA TIPO 1 (SHMT1)

Esta enzima cataliza la conversión reversible de Ser a glicina, transfiriendo grupos metilo a THF, que se transforma en 5,10 metilentetrahidrofolato (5,10-CH₂-THF). Durante la proliferación celular, esta es la vía predominante para la síntesis de pirimidina (ver Figura 10).

Se observó en pacientes TTM un aumento significativo del alelo G del polimorfismo rs1979277 (Leu435Phe), en comparación con los controles (OR = 3,99; IC 95% 1,72-1,25; p = 0,002). En cuanto al polimorfismo rs638416 del gen de la SHMT1 de la región promotora (5'-UTR), se observó un aumento también significativo del alelo C y el genotipo CC en pacientes con TTM (OR = 2,80; IC 95% 1,51-5,21; p = 0,013). Ambos polimorfismos están en equilibrio (Wang et al, 2007), por lo que sus frecuencias se pueden medir de forma independiente como un factor de riesgo para TTM.

4.2.2. GEN DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO DES-HIDROGENASA TIPO 1

El gen de la MTHFD1 codifica una proteína que tiene tres distintas actividades enzimáticas: 5,10-metilenotetrahidrofolatorreductasa

deshidrogenasa, 5,10 metilentetrahidrofolatociclohidrolasa y-10-formiltetrahidrofolato sintetasa (FTS). Cada una de estas actividades cataliza una de las tres reacciones de interconversión de los derivados de un carbono del THF, que son sustratos para la síntesis de Met, timidilato y purinas. La actividad enzimática trifuncional se confiere por dos grandes dominios: una parte amino terminal que contiene las actividades deshidrogenasa y ciclohidrolasa, y un dominio más grande carboxi terminal con la actividad sintetasa. La transición de G a A (rs2236225) en el gen de la MTHFD1, que se traduce en una sustitución de Arg-653-Gln está clínicamente asociada con la susceptibilidad a los defectos del tubo neural (DTN) sensibles a los folatos (De Marco et al, 2006). En nuestro estudio hemos encontrado diferencias estadísticas en las frecuencias alélicas y genotípicas entre los pacientes TTM y los controles sanos. El alelo T presentó más riesgo en pacientes con TTM (OR = 3,09; IC 95% 1,27-7,50; p = 0016).

4.2.3. EL GEN DE LA METIONINA SINTETASA REDUCTASA (MTRR)

La MTRR es responsable de la regeneración de MTR por metilación reductora usando la SAM como donante de metilo. La sustitución de A por G (rs1801394) en la región codificante se traduce en la sustitución

de aminoácidos Ile22Met. El alelo G produce una enzima con menos afinidad por el sustrato (Olteanu et al, 2002). Un aumento estadístico del alelo A (OR = 2,35; IC del 95% 1,10-5,00; p = 0,037) se observó en el grupo TTM.

4.2.4. EL GEN DE LA GLUTATIÓN S TRANSFERASA TIPO MU 1 (GSTM1)

Este gen codifica una clase de glutatión S-transferasa, la tipo mu. Su función es la desintoxicación de compuestos electrófilos, incluyendo carcinógenos, drogas, toxinas y productos del estrés oxidativo, mediante su conjugación con glutatión. El polimorfismo GSTM1-nulo es una delección completa del Gen GSTM1. La variante nula de este gen se ha asociado a un aumento del cáncer y la infertilidad masculina (Strange et al, 1991; Dhillon et al, 2007), posiblemente debido a una mayor susceptibilidad a las toxinas ambientales y agentes carcinógenos, así como una alteración en la toxicidad y la eficacia de ciertas sustancias. Nuestro estudio encontró un aumento estadística (OR = 2,21; IC del 95% 1,24-4,36; p = 0,030) de la variante nula en los pacientes TTM en comparación con el grupo de control.

4.2.5. EL GEN DEL RECEPTOR D4 DE LA DOPAMINA (DRD4)

El DRD4 es un subtipo de receptor de la dopamina acoplado a las proteínas G. El polimorfismo DRD4-48bptr es el VNTR de 48 pb en el exón 3 del DRD4 y presenta entre 2 a 11 repeticiones. Según el número de repeticiones, se puede caracterizar el polimorfismo como el alelo corto (S; DRD4 de 2 a 5 repeticiones) y el alelo largo (L; DRD4 de 6 o más repeticiones) (De Luca et al, 2003). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas de ambos grupos ($p = 0,039$), pero no hay significación a la hora de estudiar el riesgo entre pacientes TTM y controles sanos (OR = 3.12; 95% CI 0,76-17,26; $p = 0,181$). El genotipo LL no se encontró en ninguna de las personas con TTM.

4.3. ANÁLISIS DE FRECUENCIA POR SEXO EN CONTROLES SANOS Y TTM

En la Tabla 7 se ofrecen los datos de las frecuencias de los diferentes polimorfismos estudiados en el grupo control y TTM subagrupándolos por sexo. No se encontraron diferencias significativas entre hombre y mujeres ni dentro de los grupos ni entre grupos, quizás debido a la disminución del tamaño muestral al aplicar la variable sexo.

Tabla 7: Número de sujetos de los grupos de estudio. ALU-TMD.

	TOTAL			MUJERES ENFERMAS			HOMBRES ENFERMOS			MUJERES SANAS			HOMBRES SANOS			MUJERES			HOMBRES			LEYENDA DE GENOTIPOS		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
SHMT276	31	90	72	6	17	15	0	7	3	16	45	34	9	21	19	22	62	49	A/A	A/G	A/G	A/A	A/G	G/G
SHMT277	43	59	74	3	19	17	0	6	4	29	23	31	11	11	21	32	42	48	A/A	A/G	A/G	A/G	G/G	
SHMT333	13	79	104	2	20	19	0	5	4	5	38	53	6	16	27	7	58	72	A/A	A/C	A/C	C/C	C/C	
SHMT416	81	89	31	5	23	15	2	5	4	48	43	6	25	18	6	53	66	21	C/C	C/G	C/G	G/G	G/G	
SHMT783	132	60	3	19	21	1	5	4	0	74	20	1	33	15	1	93	41	2	C/C	C/G	C/G	G/G	G/G	
TYMS	152	50	0	27	13	0	8	3	0	77	21	0	39	13	0	104	34	0	C/C	C/G	C/G	G/G	G/G	
TYMS5UTR	16	58	92	6	15	22	2	3	6	6	24	39	2	15	25	12	39	61	DD	DI	II			
TYMS5UTR	22	92	45	9	19	15	2	4	5	7	39	17	4	29	8	16	58	32	2R2R	2R3R	3R3R			
TCN267	143	46	4	32	8	1	8	2	1	67	25	1	35	11	1	99	33	2	A/A	A/G	A/G	G/G	G/G	
TCN2776	87	99	16	17	17	9	2	7	1	45	47	2	22	28	4	62	64	11	C/C	C/G	C/G	G/G	G/G	
MTHFR1298	109	72	18	21	16	6	6	4	0	54	30	8	27	22	4	75	46	14	A/A	A/C	A/C	C/C	C/C	
MTHFR677	70	100	35	14	22	6	5	4	1	31	48	20	20	25	8	45	70	26	C/C	C/T	T/T	T/T	T/T	
CBS	2	39	136	0	5	29	0	1	9	2	21	63	0	12	34	2	26	92	C/C	C/T	T/T	T/T	T/T	
CBS833a	128	25	2	36	7	0	9	2	0	50	10	1	32	6	1	86	17	1	SS	SL	LL			
ABC1	59	102	43	15	22	6	4	5	1	21	56	20	18	19	16	36	78	26	C/C	C/T	T/T	T/T	T/T	
ATC	68	60	23	9	7	1	3	2	0	39	34	12	16	17	10	48	41	13	C/C	C/G	G/G	G/G	G/G	
BHMT	28	83	82	5	15	18	1	3	5	14	41	41	8	24	17	19	56	59	A/A	A/G	A/G	G/G	G/G	
DHFR19delA	52	79	35	15	18	10	1	5	5	24	34	11	11	22	9	39	52	21	++	+	-	-	-	
DNM73B	148	48	10	22	20	1	7	3	0	77	15	7	41	10	2	99	35	8	C/C	C/T	T/T	T/T	T/T	
GSTM1	57	0	114	7	0	37	1	0	10	33	0	39	15	0	28	40	0	78	+					
MTHFD1	0	55	20	0	28	12	0	9	2	0	11	3	0	7	3	0	39	15	C/C	C/T	T/T	T/T	T/T	
MTR	136	62	6	31	11	0	8	2	0	63	32	4	33	17	2	94	43	4	A/A	A/G	A/G	G/G	G/G	
MTRR	57	92	44	16	21	4	3	6	2	24	43	27	14	21	11	40	64	31	A/A	A/G	A/G	G/G	G/G	
RFC1	43	101	53	11	22	9	0	6	4	20	53	23	12	20	16	31	75	32	A/A	A/G	A/G	G/G	G/G	
ESR13P	93	94	18	19	20	3	6	2	2	42	48	9	25	24	4	61	68	12	A/A	A/G	A/G	G/G	G/G	
ESR15P	45	104	56	6	27	10	2	6	2	26	45	27	11	26	16	32	72	37	C/C	C/T	T/T	T/T	T/T	
DRD4	120	9	3	28	0	0	6	0	0	54	4	1	31	5	2	82	4	1	SS	SL	LL	LL	LL	
SLC6A4	52	48	25	14	6	5	2	0	1	18	30	11	17	12	8	32	36	16	SS	SL	LL	LL	LL	

SHMT

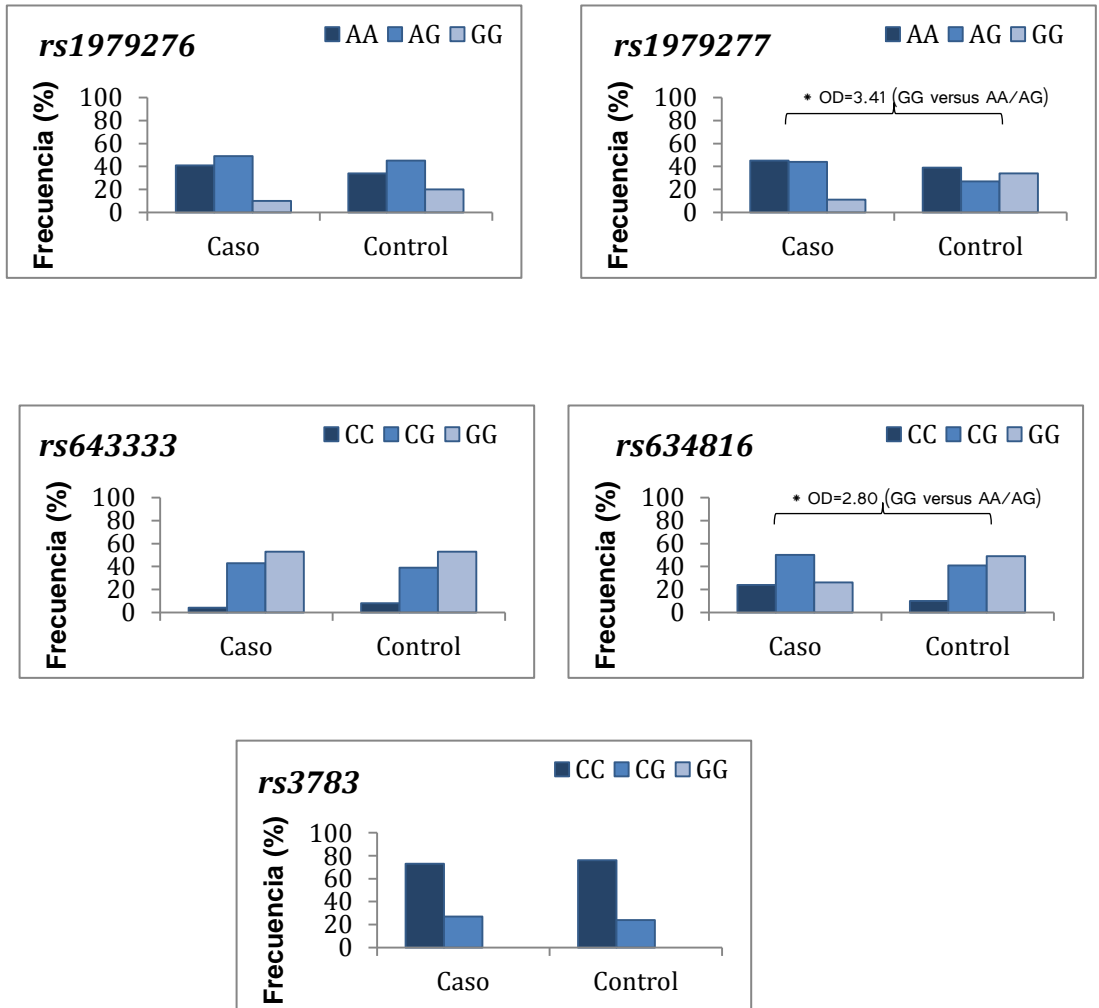


Figura16: Distribución de frecuencias de los tres genotipos de los cinco polimorfismos del gen de la SHMT.

Casos = pacientes TTM; controles = sujetos sanos; OR = odds ratio.

TYMS

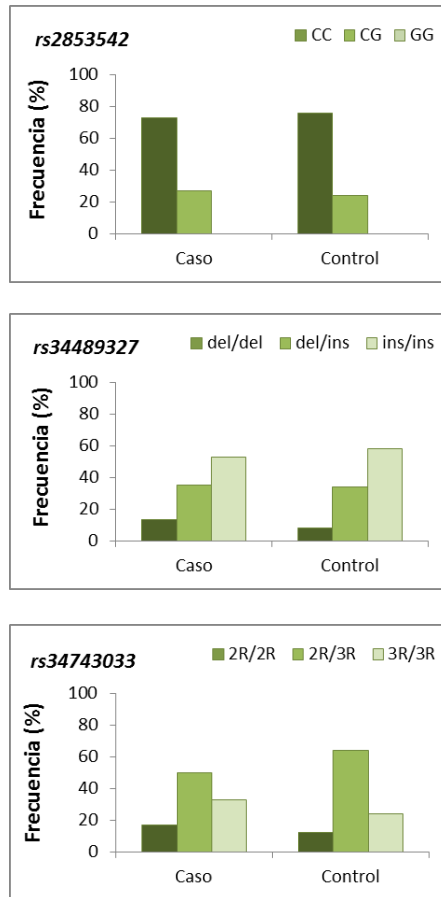
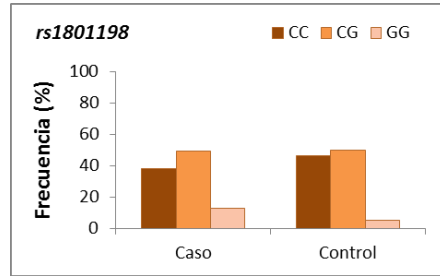
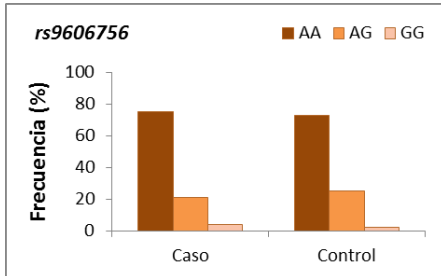


Figura 17: Distribución de frecuencias de los tres genotipos de los tres polimorfismos del gen de la TYMS.

Casos = pacientes TTM; controles = sujetos sanos.

TCN



CBS

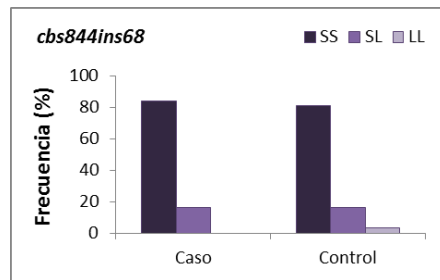
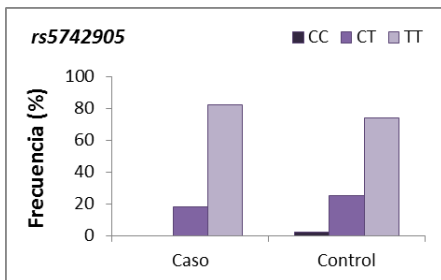
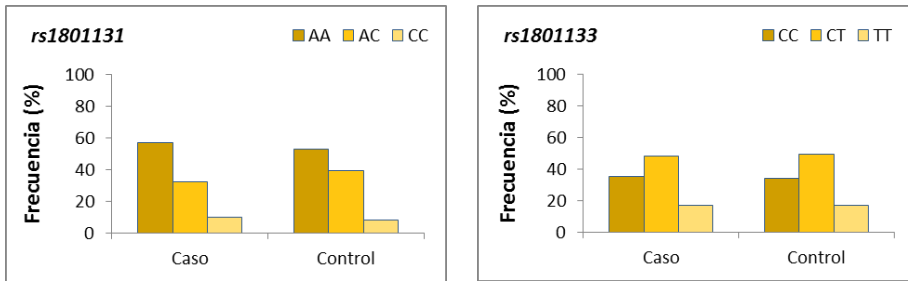


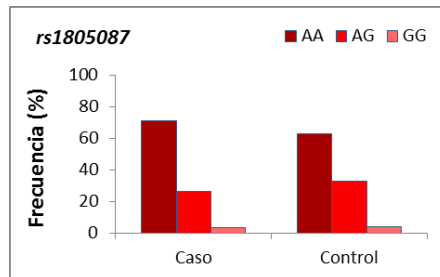
Figura 18: Distribución de frecuencias de los tres genotipos de los dos polimorfismos del gen de la TCN y de los dos polimorfismos de la CBS.

Casos = pacientes TTM; controles = sujetos sanos.

MTHFR



MTR



MTRR

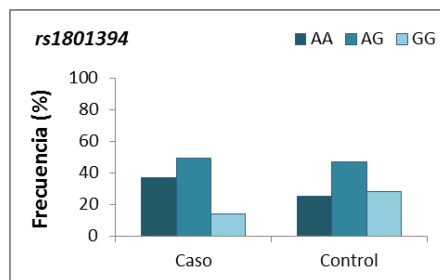


Figura 19: Distribución de frecuencias de los tres genotipos de los polimorfismos de los genes de la MTHFR, MTR y MTRR.

Casos = pacientes TTM; controles = sujetos sanos; OR = odds ratio

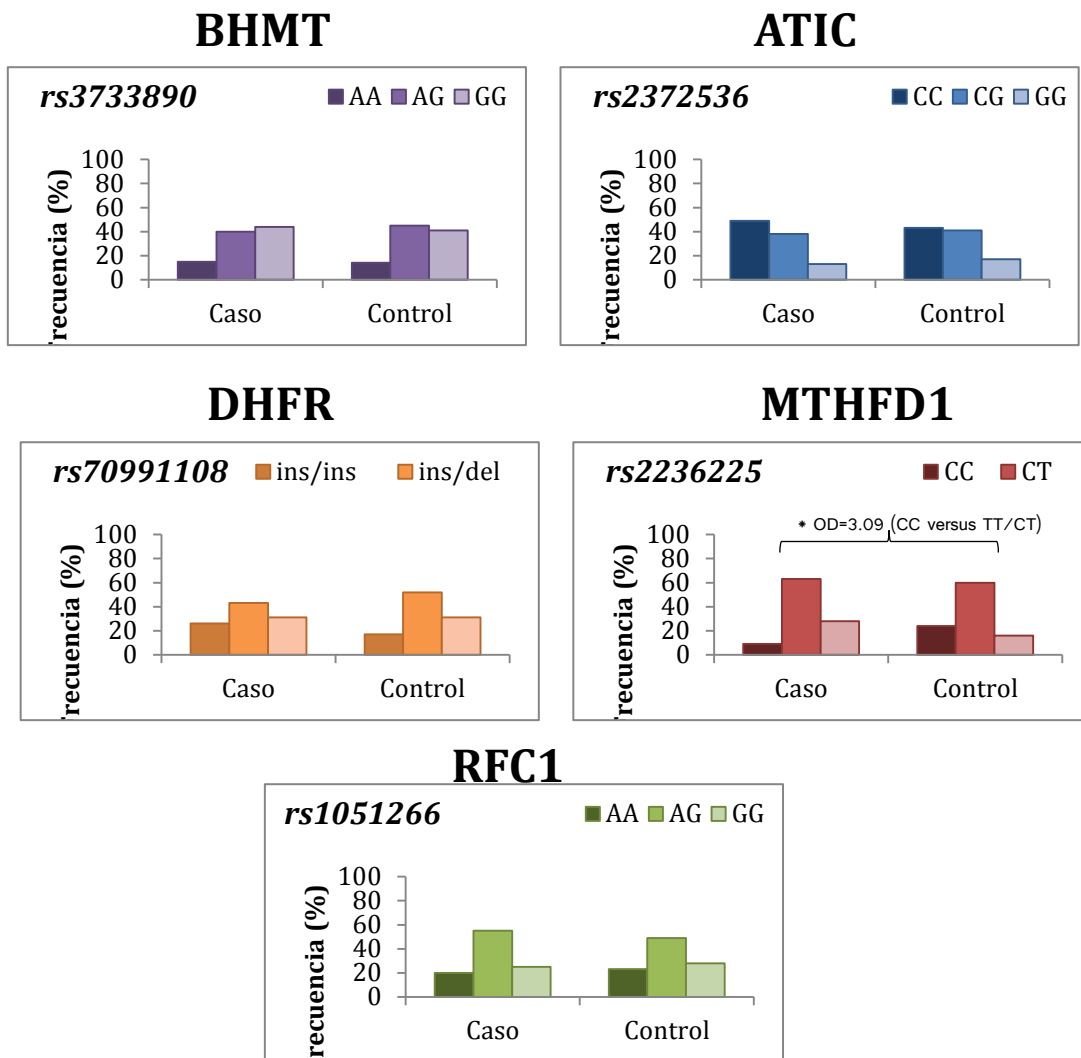
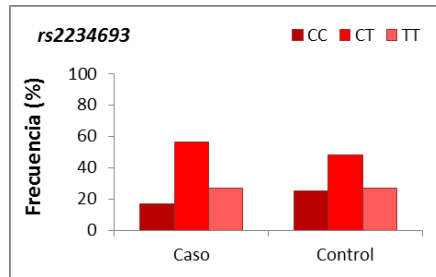
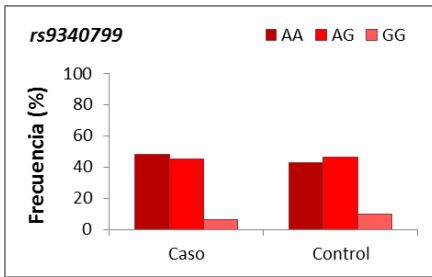


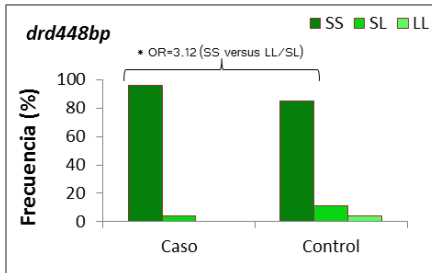
Figura 20: Distribución de frecuencias de los tres genotipos de los polimorfismos de los genes de la BHMT, ATIC, MTHFD1 y RFC1.

Casos = pacientes TTM; controles = sujetos sanos; OR = odds ratio

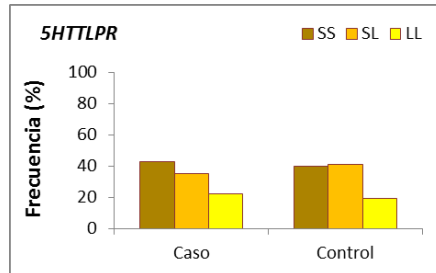
ESR1



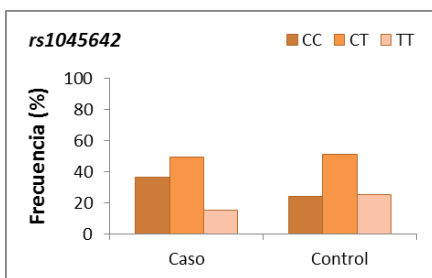
DRD4



SCL6A4



ABCB1



GSTM1

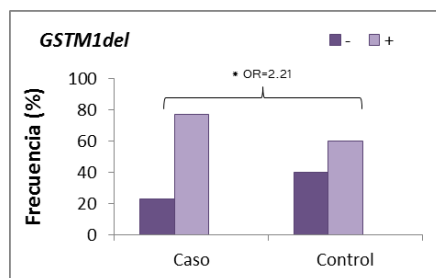


Figura 21: Distribución de frecuencias genotípicas de los dos polimorfismos del gen de ESR1 y de los polimorfismos de la DRD4, SLC6A4, ABCB1 y GSTM1.

Casos = pacientes TTM; controles = sujetos sanos; OR = odds ratio

DISCUSION

La etiología de los TTM ha sido y es motivo de controversia. Diversos campos del conocimiento han sido involucrados. Desde aspectos puramente anatómicos referidos a las características de la ATM, pasando por factores hormonales asociados a la distribución sexual dismórfica en la población, hasta su relación con estados psicopatológicos. El concepto más generalizado sobre su etiología actual es el de un proceso multifactorial con un enfoque bio-psicosocial. Los genes candidatos para TTM estudiados hasta ahora incluyen genes con variaciones involucradas en la percepción del dolor, género y etnicidad, citoquinas proinflamatorias, hormonas femeninas, de la estructura de la matriz extracelular y formas sindrómicas de TTM. Muchos de los estudios realizados se han dedicado a la perspectiva inflamatoria inmune y, más recientemente, a aspectos relativos a la percepción del dolor.

En el presente trabajo se ha pretendido abordar esta multifactorialidad desde un planteamiento genético. Para ello, hemos abordado algunos polimorfismos estudiados previamente en los que se hallaron asociaciones con los TTM, tales como polimorfismos relacionados con los receptores hormonales de estrógenos y los referidos a aspectos psicológicos como los relativos a la recaptación de serotonina.

Además, hemos incluido otros nuevos, como la posible asociación de

polimorfismos de receptores de dopamina, factores nutricionales, involucrados sobretudo en el eje folato Met, que inciden directamente en los niveles de Hcy, y factores asociados a la eliminación de radicales libres como posibles agentes etiopatogénicos involucrados en la inflamación.

El Instituto Nacional de Investigación Dental Craneofacial (NIDCR) del Instituto Nacional de Salud (NIH), establece que el TTM afecta a unas 10 millones de personas en USA en cualquier periodo de estudio. Es una patología que afecta tanto a hombres como a mujeres, sin embargo, las mujeres en edad fértil constituyen el 90% de los casos que buscan tratamiento. En un estudio durante 20 años, Magnusson et al (2005) observan que los signos y síntomas de TTM se presentan en la niñez, aumentando en la adolescencia, para descender en la edad adulta. Hay que tener presente que este patrón de aparición, como discutiremos posteriormente, tiene una temporalidad referida a la epigenética del crecimiento y desarrollo del ser humano. De esta manera, y teniendo en cuenta que los síntomas referidos a músculos, articulaciones y sistema masticador pueden asimilarse a una multifactorialidad, se han propuesto razones para no considerar los factores genéticos como implicados en el proceso. La falta de asimilación de conceptos, como que la epigenética es una parte de la

genética, también ha contribuido a desvincular dicha posible asociación. Por otro lado, estudios de segregación familiar no han aportado tampoco datos que avalen la hipótesis genética. Los TTM no tienen una predisposición familiar, según diversos autores (Raphael et al, 1999), y no se da en gemelos (Heiberg et al, 1980), aunque más recientemente existen estudios que proponen posibles asociaciones en gemelos monocigóticos comparados con dicigóticos que contradicen los estudios anteriores (Matsuka et al, 2007; Plesh et al, 2012).

Hoy en día, el reconocimiento de la epigenética como parte de la genética, que comprende la interacción con el medio y la valoración de las variantes genéticas de distintos genes involucrados en procesos multifactoriales, aporta una nueva perspectiva del papel de la genética en los procesos multifactoriales.

En la mayoría de los síndromes, como los TTM, se admite que están gobernados por fórmulas genotípicas que interactúan con el medio dando lugar a procesos sindrómicos, en los cuales existen factores genéticos y factores ambientales involucrados, y con múltiples combinaciones posibles.

Por lo referido hasta ahora, y teniendo en cuenta que la esencia de los TTM es un síndrome doloroso en una zona articular de alto rendimiento y que puede estar relacionada con el crecimiento y con el

estado psicológico del sujeto, podríamos sugerir que genes relacionados con la percepción del dolor, con el género, con la epigenética del desarrollo articular en las fases de crecimiento, con el sistema hormonal, con la reactividad inflamatoria y con aspectos psicógenos y nutricionales pueden tener participación directa o indirecta en el proceso de los TTM. De entre todas estas posibilidades en este estudio, hemos pretendido abarcar algunos de estos aspectos que se concatenan e interrelacionan.

Relativo a la percepción individual dolorosa, que creemos que puede ser un factor importante, hemos seleccionado dos polimorfismos de dos de los genes más estudiados, que son el transportador de serotonina SLC6A4 y el receptor de dopamina DRD4. El TTM se ha asociado con trastornos psicológicos, y algunos autores concluyen que los pacientes que sufren ansiedad están en un mayor riesgo de sufrir dolor crónico (Wright et al, 2004). Respecto al dimorfismo sexual, la evidencia sugiere que el TTM presenta una predilección por el sexo femenino, basándose en factores biológicos, genéticos, psicológicos y de comportamiento (Halpbern et al, 2007). Su aparición, además, parece coincidir con la pubertad. Las mujeres constituyen la mayoría de los pacientes tratados de la ATM, hecho contrastado en numerosos estudios epidemiológicos. En contraste, ciertos estudios proponen que

no hay diferencias de género en la incidencia real de los cambios en la morfología de la articulación. Sin embargo, la realidad de los datos sugiere que el trastorno es 1,5-2 veces más frecuente en mujeres que en hombres, y que el 80% de los pacientes tratados por TTM son mujeres. La gravedad de los síntomas también se relaciona con la edad de los pacientes. El inicio del dolor tiende a ocurrir después de la pubertad, con picos en los años reproductivos. La prevalencia más alta ocurre en mujeres de 20 a 40 años, y la más baja entre los niños, adolescentes y ancianos. La distribución por sexo y edad de TTM sugiere una posible relación entre su patogenia y el eje hormonal femenino (Warren y Fried, 2001).

Respecto a los factores ambientales, mayormente nutricionales, existen muy pocos estudios. Se observó una reducción en el dolor con mayor frecuencia en los pacientes tratados con ácido fólico y cianocobalamina, mejorando el curso de la disfunción dolorosa craneofacial en este estudio. La administración de vitamina en dosis fisiológicas, evidentemente, tiene sólo efectos débiles sobre el comportamiento del dolor. Los efectos analgésicos de vitamina pueden presumirse en el caso de altas dosis terapéuticas correspondientes durante un período prolongado (Mäder et al, 1988).

El eje de folato-Met participa del factor nutricional y genético. En este eje hay varias variantes polimórficas de las enzimas involucradas que, junto con la ingesta de folato, determina el metabolismo final del eje. Además, la transferencia de grupos metilos al ADN y proteínas es uno de los factores limitantes para el correcto desarrollo de los tejidos proliferantes. Por lo tanto, este último es clave para el crecimiento continuo de tejido y modificaciones epigenéticas.

En el presente trabajo se ha pretendido abordar la multifactorialidad de los TTM desde un planteamiento genético. Para ello, hemos seleccionado 27 polimorfismos ubicados en 17 genes y analizado su grado de asociación con la patología. Los mencionados polimorfismos se han elegido bajo la hipótesis de que el TTM es un síndrome multifactorial relacionado con un período clave de la vida humana en el que, partiendo de una base genética, la interacción de esta con el ambiente dan lugar a una epigenética que podría explicar en parte el TTM.

5.1. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL EJE FOLATOS METIONINA Y TRASTORNO TEMPORO-MANDIBULAR

De los polimorfismos genéticos estudiados del metabolismo de los folatos, sólo 3 de ellos correspondientes a los genes SHMT, metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (MTHFD) y MTRR mostraron una asociación con el TTM.

La SHMT cataliza un paso reversible de THF a N⁵, N¹⁰-metilenTHF, que a su vez es el sustrato clave para la obtención de N⁵-metilTHF por una parte, y para la síntesis del nucleótido timidilato por otra, es decir, que el mismo sustrato sirve a dos pasos claves en el metabolismo celular, como es la disponibilidad de timidilato para el ADN y la síntesis de Met, que lleva consigo la síntesis de SAM, principal transportador de metilos y de la evacuación de Hcy agente oxidante y aterogénico.

Por otro lado, la MTHFD es también proveedora de N⁵, N¹⁰-metilenTHF, por lo que tiene la misma repercusión funcional, aunque en este caso la MTHFD está acoplada a tres reacciones intermedias.

La tercera enzima polimórfica asociada es la MTRR. Esta enzima, en cooperación con la TCN, es esencial en la reactivación de la enzima MTR mediante la vitamina B12, siendo la MTR la enzima central del

ciclo de los folatos, que convierte la Hcy en Met y restituye THF para su reutilización.

En este trabajo hemos hallado que el alelo rs1979277G de la SHMT está significativamente elevado en los pacientes de TTM (0,67 vs. 0,53). Si tenemos en cuenta que este alelo G ha sido relacionado con altos niveles de folatos y Hcy (Herbig et al, 2002), esto puede significar que la actividad enzimática está desviada a la síntesis de THF y glicina opuesta a la de Ser y N⁵, N¹⁰-metilTHF, que es el sustrato de la MTHFR que a su vez provee de N⁵-metilTHF necesario para la síntesis de Met mediante Hcy. Hay que tener presente que este polimorfismo produce un aumento de la Hcy, que está clasificada como oxidante y, por tanto, como una molécula pro-inflamatoria, pero también la podemos considerar como el marcador del metabolismo general de folatos, ya que su paso a Met está regulado por los niveles de N⁵-metilTHF, que es una molécula clave por su unidireccionalidad metabólica. De todas formas, el efecto del rs1979277G de la SHMT, como otros muchos polimorfismos en sistemas enzimáticos complejos con acciones reversibles, está por aclarar (Herbig et al, 2002).

También se halló significación estadística en las frecuencias del alelo C del rs638416 situado en la región promotora del mismo gen SHMT. Este alelo está relacionado con un aumento de la actividad enzimática

que parece tender hacia un aumento de la síntesis de timidilato, más que a la de N⁵, N¹⁰-metilTHF. Este hecho, junto con el papel de secuestrador de N⁵-metilTHF, nos lleva a una disminución de la síntesis de Met, un aumento de la Hcy y una disminución de la síntesis de SAM. En este sentido, el trabajo de Herbig et al (2002) es muy clarificador, ya que concluye que la síntesis de SAM tiene una prioridad mayor que la síntesis metabólica dTMP. El aumento de la expresión de SHMT citoplasmática inhibe las concentraciones de SAM por dos mecanismos posibles. La SHMT citoplasmática compite, en forma dependiente de la glicina, con la MTHFR proveedora de N⁵-metilTHF, porque la SHMT citoplasmática tiene una alta afinidad por el N⁵-metilTHF, de manera que secuestra este cofactor e inhibe la síntesis de la Met. Derivado de estos estudios, se llega a la conclusión de que la SHMT1 tiene tres funciones importantes en el citoplasma: (1) un suministro preferente de unidades de carbono para la biosíntesis de timidilato, (2) reducción del "pool" de 5'-metil-THF para la síntesis de SAM favoreciendo la síntesis de Ser, y (3) que secuestra a N⁵-metilTHF e inhibe la síntesis de SAM. Estos resultados indican que SHMT1 es un interruptor metabólico que, cuando se activa, da a la síntesis de dTMP mayor prioridad metabólica de la síntesis de SAM.

Hay que recordar que SAM es el principal metilador de proteínas y ADN. De esta forma, ambos polimorfismos, que aumentan la actividad de la SHMT en uno de sus sentidos, producirían una disminución de N⁵-metilTHF por secuestro, una inhibición de la síntesis de Met y una disminución de SAM, que podría dar lugar ante un déficit nutricional a una disminución de la metilación en la síntesis de ADN de novo, generando tejidos proinflamatorios que a su vez activarían aún más el crecimiento local y, por tanto, la inflamación y el dolor.

También hallamos una diferencia significativa en el polimorfismo rs2236225 de la MTHFD. La triple funcionalidad de la MTHFD juega un papel central en el ciclo de los folatos, siendo uno de los puntos claves del equilibrio de esta ruta metabólica (Schmidt et al, 2000). De esta manera, aunque el papel funcional de este polimorfismo requiere ser objetivado mejor, es fácil pensar que los cambios de funcionalidad de esta enzima puedan tener consecuencias directas sobre la síntesis de Met y, por tanto, sobre la epigenética de cualquier tejido de alta actividad proliferativa.

Los resultados de esta memoria muestran que las variantes polimórficas SHMT-rs1979277, rs638416 y MTHFD1-rs2236225 del ciclo de folatos se asociaron significativamente con los TTM. Ambas

asociaciones coinciden con una disminución global de la disponibilidad de grupos metilos a través de una disminución del sustrato N⁵, N¹⁰-metilTHF (SHMT y MTHFD1), mientras que el SNP MTRR-rs1801394 no siguió el mismo patrón. El alelo salvaje A, predominante en el TTM, produce una mayor eficiencia en el paso de Hcy a Met, teniendo el mismo efecto final de las variantes de SHMT y MTHFD, un aumento de los niveles THF y una disminución de N⁵-metilTHF pero, en contraposición, un aumento en la síntesis de SAM. Aunque el complejo de vitaminas del grupo B es normalmente utilizado en la clínica como acompañante de los tratamientos antiálgicos, sobre todo en los casos de neuropatías, la asociación etiológica de estos compuestos no ha sido demostrada de una forma clara. Sin embargo, en algunos trabajos se ha estudiado el efecto de los complejos vitamínicos sobre el dolor craneofacial, tal es el caso de una reducción del dolor en pacientes tratados con ácido fólico y cianocobalamina que padecían disfunción dolorosa (Mäder et al, 1988). Estos autores concluían que la administración de vitaminas en dosis fisiológicas tiene sólo efectos débiles sobre el comportamiento del dolor. Los efectos analgésicos de estas vitaminas se observaron en los tratamientos con altas dosis y durante un período prolongado. En un trabajo reciente se ha encontrado una asociación estadísticamente

significativa entre los niveles de vitaminas del grupo B y el MPDS (Okumus et al, 2010).

Estos resultados, aunque han sido estudiados en una población diez años de media mayor que la del presente estudio, son una aproximación similar a la nuestra, pero en el aspecto nutricional, o sea, desde un abordaje distinto llegan a unos resultados parecidos. En este trabajo se concluye que el déficit de vitaminas de complejo B el Zn y el Mg están asociados al síndrome miofacial. Nosotros hayamos que los estados metabólicos derivados de las variaciones de los polimorfismos (genotipos) implicados en el eje B6, B12, folatos-homocisteína-metionina están asociados a los TTM. La posible explicación a esta asociación puede referirse al hecho de que el eje de folato-Met participa del componente genético hereditario y del componente ambiental nutricional, y que juntos establecen la epigenética de cualquier patología. En el eje de los folatos, conviven todas las enzimas involucradas en el mantenimiento de sus niveles junto con la implicación de vitaminas tales como la B6 y B12 en pasos claves del sistema de recuperación de folatos. Hay que tener en cuenta que nuestro organismo no sintetiza folatos y que, por tanto, sus niveles están directamente relacionados con la ingesta y con un sistema de recuperación eficiente. Todas las enzimas del sistema presentan

variantes polimórficas funcionales que, junto con la ingesta de folatos, determina el metabolismo del eje. Por otra parte el sistema de folatos es quizás la clave metabólica de cualquier tipo de crecimiento y proliferación celular. Esta importancia contiene las dos vertientes: la necesidad de folatos para la síntesis de nucleótidos componentes del ADN y la disponibilidad de grupos metilos como elementos claves en la epigenética que da especificidad a las células de cada tejido. Por lo tanto, de este eje dependen el crecimiento continuo de tejido y sus modificaciones epigenéticas.

Por último, se debe destacar que el ciclo de los folatos está íntimamente ligado al desarrollo embrionario del tubo neural. Este tubo da lugar a la mayor parte del sistema nervioso; anteriormente se ensancha y se diferencia en el encéfalo y los nervios craneales; posteriormente forma la médula espinal y los nervios motores. La mayor parte del SNC deriva de las células de la cresta neural, que emigran antes de que el tubo neural se cierre. En la cresta neural se originan los nervios craneales, células de pigmento, cartílago y huesos de la mayor parte del cráneo, incluidas las mandíbulas. Por ello, también se puede presumir que ciertos polimorfismos de este ciclo puedan afectar al desarrollo correcto de la ATM, predisponiendo a la aparición de TTM.

5.2. POLIMORFISMOS DE GENES IMPLICADOS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

Los TTM se han asociado al estrés oxidativo de la ATM (Milam et al, 1998; Yamaza et al, 2004). Estos autores proponen que la producción de radicales libres en la ATM y la posterior inducción de los eventos moleculares pueden tener influencia en la generación de los TTM, por lo que estrategias terapéuticas dirigidas al control del estrés oxidativo podrían ser eficaces en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la ATM.

La GSTM1 es una de las enzimas detoxicantes de compuestos electrofílicos, incluyendo carcinógenos, fármacos, toxinas ambientales y productos del estrés oxidativo, por conjugación con glutatión. La mutación nula que estudiamos en este trabajo se ha asociado a una susceptibilidad aumentada a carcinógenos y toxinas (Navarro et al, 2009). Sobre esta enzima GSTM1, encontramos una asociación estadística de personas con TTM con la variante nula del gen.

El estrés oxidativo producido por la carencia enzimática conduce a un aumento de NO y peroxinitrito, perjudicial para el ADN, que estaría

asociado a un aumento de la proliferación celular de causa inflamatoria, en respuesta a la sobrecarga mecánica excesiva, que a su vez promueve la hiperplasia sinovial en la ATM (Yamaza et al, 2004), siendo la hiperplasia sinovial una de las características de enfermedad degenerativa de ATM. Estos autores realizaron un estudio sobre la formación de peroxinitratos y el grado de daño de DNA en células del líquido sinovial. Después de someter las ATM de ratas a una prolongada hipermovilidad, la nitrosina (un marcador de peroxinitratos) se localizó en las células sinoviales y en fibroblastos de TTM inducido en ratas. En el núcleo de las células sinoviales observaron roturas de hebras de DNA. Estos hallazgos indican que los sobremovimientos condilares inducen a una proliferación de células sinoviales, y sugiere que el estrés oxidativo conduce a una hiperplasia sinovial inducida por vía del daño del DNA de células sinoviales consecuentes a carga en la articulación. Sobre este presupuesto, una capacidad reducida de desintoxicación nos haría más susceptibles al TTM.

Este resultado lo respalda, ya que la ATM es una articulación diartrosica de carga en desgaste continuo de las superficies articulares con un aumento del estrés oxidativo que, si no está compensado,

conduce a la inflamación y, posiblemente, es un coadyuvante de los TTM.

5.3. DIMORFISMO SEXUAL Y TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES

El dimorfismo sexual, que desde un principio se observó en los TTM en estudios poblacionales, ha hecho que se hayan planteado hipótesis de asociación hormonal a este trastorno. Para observar esta posible asociación, se han realizado estudios poblacionales de polimorfismos relativos a receptores de estrógenos como posibles dianas etipatógenicas.

Dos polimorfismos definidos por las enzimas de restricción PvuII y XbaI (actualmente denominados rs93340799 y rs2234693), situados en el primer intrón del gen del receptor de estrógenos tipo α (nomenclatura actual ESR1), pueden influir en la expresión génica, habiéndose obtenido resultados contradictorios. Los primeros análisis se realizaron en pacientes con osteoartritis de la ATM, e indicaban una clara asociación entre la intensidad del dolor y las asociaciones haplotípicas de ambos polimorfismos (Kang et al, 2007). Estos datos fueron reafirmados posteriormente, dónde encontraron que el

polimorfismo XbaI puede incrementar el riesgo de padecer TTM (Ribeiro-Dasilva et al, 2009). Sin embargo, estudios posteriores en series más amplias no han encontrado una relación clara entre estos polimorfismos y los TTM (Kim et al, 2010). Se ha sugerido la hipótesis de que ciertos haplotipos de estos polimorfismos estuviesen relacionados con la morfogenia cráneo-facial en la mujer, contribuyendo a alteraciones de las dimensiones mandibulares, lo cual favorecería la aparición de TTM (Lee et al, 2006).

En esta memoria se ha examinado la influencia de estos dos polimorfismos (rs93340799 y rs2234693) del ESR1 en personas con TTM. No se han observado diferencias significativas entre sujetos controles y pacientes, ni en la población general, ni en la población agrupada por sexo (tanto entre hombres y mujeres, como dentro de los hombres y las mujeres). Estos datos están más en consonancia con los últimos resultados obtenidos de estos polimorfismos y los TTM (Kim et al, 2010).

5.4. GENES RELACIONADOS CON EL COMPOR- TAMIENTO PSICOSOCIAL Y TRASTORNOS TEMPORO- MANDIBULARES

Como se ha hablado en la introducción, uno de los elementos más comunes encontrados en los TTM son las alteraciones psicosociales y de comportamiento (depresión, estrés, trastornos del sueño, fatiga crónica, etc.). Por otro lado, cada vez se conocen más genes cuyos polimorfismos están relacionados con estas alteraciones psicosociales. En este trabajo hemos elegido polimorfismos de dos genes muy relacionados con la conducta: un transportador de la serotonina, el SLC6A4 (relacionado con la recaptación sináptica) y un receptor de la dopamina, el DRD4.

En referencia al SLC6A4, un estudio de Ojima et al (2007) determinó el polimorfismo 5-HTTLPR en 38 pacientes de TTM en la población japonesa. Dicho polimorfismo consiste en la inserción/delección de elementos de repetición de 44 pb que pueden variar de 6 a 8 elementos, refiriéndose como variantes largas (L) y cortas (S), respectivamente. Estos autores observaron que el alelo L estaba significativamente sobrerrepresentado en los sujetos con TTM, en

comparación con el alelo S. El alelo L está asociado a una mayor expresión del recaptador de serotonina, el SLC6A4, por lo que en estos sujetos los niveles de serotonina intercelulares son menores que en los que poseen el alelo S. Esto presupone una menor disponibilidad de serotonina a nivel intersináptico. Por otro lado, en otro estudio del mismo polimorfismo en población caucásica (Herken et al, 2001), no se halló relación entre el alelo L y la TTM, aunque sí se observó una asociación con otro polimorfismo del mismo gen, el STin 2.10/10, que sólo se relacionaba con el alelo L en los pacientes, confirmando de alguna manera que existe una correlación entre el metabolismo de la serotonina y los TTM. En nuestro estudio de 89 pacientes no hemos encontrado correlación estadística del polimorfismo 5'-HTTLPR con el TTM. Pensamos que, quizás debido a que diversos haplotipos relacionados con el SLC6A4 presentan cierta diversidad étnica, los resultados obtenidos pueden ser refinados en posteriores estudios mediante la detección de haplotipos que pueden variar la expresión de este gen hasta diez veces, tal y como hemos comentado con el polimorfismo STin 2.10/10. Esto, junto con estudios poblacionales más amplios, permitiría aclarar la posible asociación de este polimorfismo o del metabolismo de la serotonina con el TTM.

Por otro lado, diversos genes involucrados en el sistema dopaminérgico de neurotransmisión se han asociado a síndromes dolorosos, tales como fibromialgia, dolor de cabeza crónico y dolor postoperatorio (Treister et al, 2009). No obstante, el mecanismo por el cual se produce esta asociación es aún desconocido.

En el presente estudio hemos encontrado una asociación significativa en el polimorfismo de VTNR de 48-bp del gen DRD4 con los TTM; los alelos hallados en los pacientes son los de menor actividad del receptor, lo que presupone que una menor actividad dopaminérgica está asociada a un aumento de la sensibilidad al dolor en los pacientes con TTM. No existen resultados previos entre TTM y DRD4. De cualquier forma, los polimorfismos asociados al dolor y gratificación no tienen por qué constituir agentes etiológicos directos, sino simplemente agentes coadyuvantes al diagnóstico clínico, que pueden incluso enmascararlos en casos de asociación genética débil, y por lo que podríamos incluso considerarlos como excluyentes desde el punto de vista de la etiopatogenia de la TTM.

CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio, la incidencia de TTM fue tres veces superior en las mujeres. Sin embargo, ninguno de los polimorfismos estudiados presentó diferencias en las distribuciones genotípicas entre hombres y mujeres dentro del grupo de TTM. Tampoco se observó diferencias cuando se compararon dichas frecuencias entre casos y controles por género.
2. En referencia a los polimorfismos del ESR1 estudiados (rs9340799 y rs2234693), no encontramos ningún tipo de asociación en la distribución de genotipos, ni entre hombres y mujeres, ni en la población en general. Estos resultados están en consonancia con los últimos estudios sobre estos polimorfismos y su relación con los TTM.
3. De las variantes estudiadas del eje de los folatos hallamos que los polimorfismos de los genes de la SHMT rs1979277, rs638416 y de la MTHFD1rs2236225 están asociados con TTM, proponiendo que un déficit vitamínico asociado a unas variantes genéticas de menor o mayor funcionalidad favorecen el proceso inflamatorio en tejidos articulares en fase de crecimiento.

4. De las variantes genéticas relacionadas con el control de la oxidación tisular en los TTM se observó que el polimorfismo de delección del gen de la GSTM (GSTM1del) se asoció significativamente al padecimiento de los TTM, lo que nos lleva a concluir que el grado de oxidación de los tejidos está en relación con factores genéticos variables en función de las distintas actividades de las enzimas detoxicantes de radicales libres en esta patología. Los polimorfismos genéticos de las enzimas involucradas en la detoxicación oxidativa están relacionados con la TTM.

5. La percepción del dolor, síntoma unívoco en la TTM, varía de unos individuos a otros a tenor de la variabilidad del metabolismo de la neurotransmisión. En nuestro trabajo hemos encontrado una asociación con los TTM en un polimorfismo del gen del DRD4, que consiste en un número variable de repeticiones en tándem de un fragmento de 48 pares de bases (DRD4-48bptr). Los polimorfismos genéticos relacionados con el metabolismo de la dopamina están relacionados con el estado emocional y con la percepción del dolor y, por tanto, pudieran estar asociados con la TTM.

BIBLIOGRAFIA

Al-Jundi MA, John MT, Setz JM, Szentpétery A, Kuss O.

Metanalysis of treatment need for temporomandibular disorders in adult nonpatients. *J Orofac Pain.* 2008. 22: 97-107.

Austin DG. Special considerations in orofacial pain and headache.

Dent Clin North Am. 1997. 41: 325-339.

Beckman KB; Ames BN: The Free Radical Theory of Aging Matures.

Am Physiol Soc. 1998. 78: 547-581.

Benjamin J, Osher Y, Kotler M, Gritsenko I, Nemanov L,

Belmaker RH, Ebstein RP. Association between tridimensional personality questionnaire (TPQ) traits and three functional polymorphisms: dopamine receptor D4 (DRD4), serotonin transporter promoter region (5-HTTLPR) and catechol O-methyltransferase (COMT). *Mol Psychiatry.* 2000. 5: 96-100.

Benjamin M, Ralphs JR. Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev*

Cytol. 2004. 233: 1-45.

Benkovic SJ, Hammes-Schiffer S. A perspective on enzyme catalysis.

Science. 2003. 301: 1196-1202.

Blakely RL, Whitehead VM (eds). Folate and Pterins, vol. 3. New

York. Wiley. 1986

Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc.* 1995. 274: 1049-1057.

Burr ML. Antioxidants and cancer. *J Human Nutr Dietetics.* 1994. 7: 409-416.

Butler JM, Devaney JM, Marino MA, Vallone PM. Quality control of PCR primers used in multiplex STR amplification reactions. *Forensic Sci Int.* 2001. 119: 87-96.

Carvalho CM, Pena SD. Optimization of a multiplex minisequencing protocol for population studies and medical genetics. *Genet Mol Res.* 2005. 4: 115-125.

Carlsson GE. Epidemiology and treatment need for temporomandibular disorders. *J Orofac Pain.* 1999. 13: 232–237.

Cheng P, Ma XC, Xue Y, Li SL. Osteocalcin and estradiol insynovial fluid of the patients with temporomandibular disorders. *J Modern Stomatol.* 2001. 15: 187–190.

Clark GT, Tsukiyama Y, Baba K, Watanabe T. Sixty-eight years of experimental occlusal interference studies: what have we learned? *J Prosthet Dent.* 1999. 82:704-713.

Córdoba Porrás A, Blanco Vaca F, González Sastre F. Bases moleculares de hiperhomocisteinemia. *Química Clínica.* 1998. 17: 5-18.

Costen JB. A syndrome of ear and sinus symptoms dependent upon disturbed function of the temporomandibular joint. *Ann Otol.* 1934. 43: 1-15.

Culotta VC. Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Curr Top Cell Regul.* 2000. 36: 117-132.

De Boever JA (1979) Functional disturbances of the temporomandibular joint. En: Zarb GA, Carlsson GE (eds) The temporomandibular joint. Function and dysfunction. Munksgaard, Copenhagen, p 193-214.

De Boever JA, Carlsson GE, Klineberg IJ. Need for occlusal therapy and prosthodontic treatment in the management of temporomandibular disorders. Part I. Occlusal interferences and occlusal adjustment. *J Oral Rehabil.* 2000. 27: 367-379.

De Leeuw JR, Steenks MH, Ros WJ, Lobbezoo-Scholte AM, Bosman F, Winnubst JA. Multidimensional evaluation of craniomandibular dysfunction. I: Symptoms and correlates. *J Oral Rehabil.* 1994. 21: 501-514.

De Luca A, Rizzardi M, Buccino A, Alessandroni R, Salvioli GP, Filograsso N, Novelli G, Dallapiccola B. Association of dopamine D4 receptor (DRD4) exon III repeat polymorphism with temperament in 3-year-old infants. *Neurogenetics.* 2003. 4: 207-212.

De Marco P, Merello E, Calevo MG, Mascelli S, Raso A, Cama A, Capra V. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G/A polymorphism for neural tube defect risk. *J Hum Genet.* 2006. 51: 98-103.

Dhillon VS, Shahid M, Husain SA. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Mol Hum Reprod.* 2007. 13: 213-222.

Diatchenko L, Anderson AD, Slade GD, Fillingim RB, Shabalina SA, Higgins TJ, Sama S, Belfer I, Goldman D, Max MB, Weir BS, Maixner W. Three major haplotypes of the beta2 adrenergic receptor define psychological profile, blood pressure, and the risk for

development of a common musculoskeletal pain disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006. 141B: 449-462.

Downie WW, Leatham PA, Rhind VM, Wright V, Branco JA, Anderson JA. Studies with pain rating scales. *Ann Rheum Dis.* 1978. 37: 378-381.

Dworkin SF, LeResche L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, criteria. *J Craniomandib Disord Facial Oral Pain.* 1992. 6: 301-355.

Dworkin SF, LeResche LR, Von Korff M, Howard J, Truelove E, Sommers E. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. *J Am Dent Assoc.* 1990. 120: 273-281.

Egermark-Eriksson I, Carlsson GE, Magnusson T, Thilander B. A longitudinal study on malocclusion in relation to signs and symptoms of cranio-mandibular disorders in children and adolescents. *Eur J Orthod.* 1990. 12: 399-407.

Fernández Robles CR, Degnan M, Candiotti KA. Pain and genetics. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2012. 25: 444-449.

Ferrari R, Leonard MS. Whiplash and temporomandibular disorders: a critical review. *J Am Dent Assoc.* 1998. 129: 1739-1745.

Franco RF, Elion J, Lavinha J, Krishnamoorthy R, Tavella MH, Zago MA. Heterogeneous ethnic distribution of the 844ins68 in the cystathionine beta-synthase gene. *Hum Hered.* 1998. 48: 338-342.

Gallagher RM, Marbach JJ, Raphael KG, Dohrenwend BP, Cloitre M. Is major depression comorbid with temporomandibular pain and dysfunction syndrome? A pilot study. *Clin J Pain.* 1991. 7: 219-225.

Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, Chen XN, Duncan RG, Korenberg JR, Shane B. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *J Biol Chem.* 1993. 268: 11910-11916.

Gatchel RJ, Garofalo JP, Ellis E, Holt C. Major psychological disorders in acute and chronic TMD: an initial examination. *J Am Dent Assoc.* 1996. 127: 1365-1370, 1372, 1374.

Gelernter J, Cubells JF, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK. Population studies of polymorphisms of the serotonin transporter proteingene. *Am J Med Genet.* 1999. 88: 61– 66.

Gerber, A. Kiefergelenk und Zahnokklusion. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1971. 26: 119-141.

Gingnell M, Comasco E, Orelund L, Fredrikson M, Sundström-Poromaa I. Neuroticism-related personality traits are related to symptom severity in patients with premenstrual dysphoric disorder and to the serotonin transporter gene-linked polymorphism 5-HTTLPR. *Arch Womens Ment Health.* 2010. 13: 417-423.

Goulet JP, Lavigne GJ, Lund JP. Jaw pain prevalence among French-speaking Canadians in Québec and related symptoms of temporomandibular disorders. *J Dent Res.* 1995. 74: 1738-1744.

Halpern LR, Levine M, Dodson TB. Sexual dimorphism and temporomandibular disorders (TMD). *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007. 19: 267-277.

Haskin CL, Milam SB, Cameron IL. Pathogenesis of degenerative joint disease in the human temporomandibular joint. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995. 6: 248-277.

Hayden MJ, Nguyen TM, Waterman A, Chalmers KJ. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics.* 2008. 9: 80-82.

Hedenberg-Magnusson B, Ernberg M, Kopp S. Presence of orofacial pain and temporomandibular disorder in fibromyalgia. A study by questionnaire. *Swed Dent J.* 1999. 23: 185-192.

Heiberg A, Heloe B, Heiberg AN, Heloe LA, Magnus P, Berg K and Nance WE. Myofascial pain dysfunction (MPD) syndrome in twins. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1980. 8: 434-436.

Helenius LM, Hallikainen D, Helenius I, Meurman JH, Könönen M, Leirisalo-Repo M, Lindqvist C. Clinical and radiographic findings of the temporomandibular joint in patients with various rheumatic diseases. A case-control study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005. 99: 455-463.

Helkimo M. Studies on function and dysfunction of the masticatory system. II. Index for anamnestic and clinical dysfunction and occlusal state. *Swed Dent J.* 1974. 67: 101-121.

Henrikson T, Ekberg EC, Nilner M. Symptoms and signs of temporomandibular disorders in girls with normal occlusion and Class II malocclusion. *Acta Odontol Scand.* 1997. 55: 229-235.

Henry CH, Tull GT, Whittum-Hudson JA, Wolford LM. Analysis of estrogen binding sites of the posterior ligament of the human TMJ.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008. 105: 698-701.

Herbert V (ed). Development of human folate deficiency en folic acid metabolism in health and disease. New York:Wiley-Liss, 1990:195-210.

Herbig K, Chiang EP, Lee LR, Hills J, Shane B, Stover PJ. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. *J Biol Chem.* 2002. 277: 38381-38389.

Herken H, Erdal E, Mutlu N, Barlas O, Cataloluk O, Oz F, Güray E. Possible association of temporomandibular joint pain and dysfunction with a polymorphism in the serotonin transporter gene. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001. 120: 308-313.

Jay GD, Torres JR, Warman ML, Laderer MC, Breuer KS. The role of lubricin in the mechanical behavior of synovial fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104: 6194-6199.

Jensen MP, Miller L, Fisher LD. Assessment of pain during medical procedures: a comparison of three scales. *Clin J Pain.* 1998. 14: 343-349.

Jensen R, Rasmussen BK, Pedersen B, Lous I, Olesen J. Prevalence of oromandibular dysfunction in a general population. *J Orofac Pain.* 1993. 7: 175-182.

Johnson WG, Stenroos ES, Spsychala JR, Chatkupt S, Ming SX, BuyskeS. New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolatereductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? *Am J Med Genet.* 2004. 124A: 339-345.

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

Kang SC, Lee DG, Choi JH, Kim ST, Kim YK, Ahn HJ. Association between estrogen receptor polymorphism and pain susceptibility in female temporomandibular joint osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007.36: 391–394.

Kappock TJ, Ealick SE, StubbeJ. Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr Opin Chem Biol.* 2000. 4: 567-572.

Kawasaki T, Ushiyama T, Inoue K, Hukuda S. Effects of estrogen on interleukin-6 production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Rheumatol.* 2000. 18: 743–745.

Keersmaekers K, De Boever JA, Van Den Berghe L. Otagia in patients with temporomandibular joint disorders. *J Prosthet Dent.* 1996. 75: 72-76.

Kim BS, Kim YK, Yun PY, Lee E, Bae J. The effects of estrogen receptor α polymorphism on the prevalence of symptomatic temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010. 68: 2975-2979.

Kirveskari P, Le Bell Y, Salonen M, Forssell H, Grans L. Effect of elimination of occlusal interferences on signs and symptoms of craniomandibular disorder in young adults. *J Oral Rehabil.* 1989. 16: 21-26.

Koh H, Robinson PG. Occlusal adjustment for treating and preventing temporomandibular joint disorders. *J Oral Rehabil.* 2004. 31: 287-292.

Könönen M. Clinical signs of craniomandibular disorders patients with psoriatic arthritis. *Scand J Dent Res.* 1987. 95: 340-346.

Könönen M, Waltimo A, Nyström M. Does clicking in adolescence lead to painful temporomandibular joint locking? *The Lancet*. 1996. 347: 1080-1081.

Korszun A, Hinderstein B, Wong M. Comorbidity of depression with chronic facial pain and temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996. 82: 496-500.

Krogh-Poulsen W. Die Bewegungsanalyse .Autoreferat .*Dtsch Zahnärztl Z*. 1966. 21: 877-880.

Kuttila M, Kuttila S, Niemi PM, Alanen P, LeBell Y. Fluctuation of treatment need for temporomandibular disorders and age, gender, stress, and diagnostic subgroup. *Acta Odontol Scand*. 1997. 55: 350-355.

Kuttila M, Niemi PM, Kuttila S, Alanen P, LeBell Y. TMD treatment need in relation to age, gender, stress, and diagnostic subgroups. *J Orofacial Pain*. 1998. 12: 67-74.

Landi N, Manfredini D, Lombardi I, Casarosa E, Bosco M. 17-beta-estradiol and progesterone serum levels in temporomandibular disorder patients. *Minerva Stomatol*. 2004. 53: 651-660.

Laskin DM. Etiology of the pain-dysfunction syndrome. *J Am Dent Assoc.* 1969. 79: 147-153.

Laskin GC, Hylander W. TMD's: an evidence-based approach to diagnosis and treatment. Chicago: Quintessence, 2006

Lavigne GJ, Huynh N, Kato T, Okura K, Adachi K, Yao D, Sessle B. Genesis of sleep bruxism: motor and autonomic-cardiac interactions. *Arch Oral Biol.* 2007. 52: 381-384.

Lee DG, Kim TW, Kang SC, Kim ST. Estrogen receptor gene polymorphism and craniofacial morphology in female TMJ osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006. 35: 165–169.

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

Levitt SR, McKinney MW. Appropriate use of predictive values in clinical decision making and evaluating diagnostic tests for TMD. *J Orofac Pain.* 1994. 8: 298-308.

Libby P. Changing concepts in atherogenesis. *J Intern Med.* 2000. 247: 349-358.

Lima A, Azevedo R, Sousa H, Seabra V, Medeiros R. Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2013. 14: 1337-1351.

Lobbezoo F, Lavigne GJ. Do bruxism and temporomandibular disorders have a cause-and-effect relationship? *J Orofac Pain*. 1997. 11: 15-23.

Lobbezoo F, Naeije M. Etiology of bruxism: morphological, pathophysiological and psychological factors. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2000. 107: 275-280.

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

Mäder R, Deutsch H, Siebert GK, Gerbershagen HU, Grünh E, Behl M, Kübler W. Vitamin status of in patients with chronic cephalgia and dysfunction pain syndrome and effects of a vitamin supplementation. *Int J Vitam Nutr Res*. 1988. 58: 436-441.

Madland G, Feinmann C, Newman S. Factors associated with anxiety and depression in facial arthromyalgia. *Pain.* 2000. 84: 225-232.

Magnusson T, Egermark I, Carlsson GE. A longitudinal epidemiologic study of signs and symptoms of temporomandibular disorders from 15 to 35 years of age. *J Orofac Pain.* 2000. 14: 310-319.

Magnusson T, Egermarki I, Carlsson GE. A prospective investigation over two decades on signs and symptoms of temporomandibular disorders and associated variables. A final summary. *Acta Odontol Scand.* 2005. 63: 99–109.

Mallek H, Neff P, Nakamoto T. Interactions of nutrition and temporomandibular joint dysfunction. *Ear Nose Throat J.* 1984. 63: 499-504.

Marklund S, Wänman A. Incidence and prevalence of myofascial pain in the jaw-face region. A one-year prospective study on dental students. *Acta Odontol Scand.* 2008. 66: 113-121.

Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*. 1998. 24: 238-239.

Matsuka Y, Nagamatsu C, Itoh S, Tomonari T, Makki A, Minakuchi H, Maekawa K, Kanyama M, Kuboki T. Comparison of inter-twin concordance in symptoms of temporomandibular disorders: a preliminary investigation in an adolescent twin population. *Cranio*. 2007. 25: 23-29.

McCreary CP, Clark GT, Merrill RL, Flack V, Oakley ME. Psychological distress and diagnostic subgroups of temporomandibular disorder patients. *Pain*. 1991. 44: 29-34.

McGregor NR, Butt HL, Zerbis M, Klineberg IJ, Dunstan RH, Roberts TK. Assessment of pain (distribution and onset), Symptoms, SCL-90-R Inventory responses, and the association with infectious events in patients with chronic orofacial pain. *J Orofac Pain*. 1996. 10: 339-350.

McNamara JA Jr, Seligman DA, Okeson JP. Occlusion, Orthodontic treatment, and temporomandibular disorders: a review. *J Orofac Pain*. 1995. 9: 73-90.

McNeill C (1993) Temporomandibular disorders. Guidelines for classification, assessment, and management. Quintessence Publishing Co, Inc, Chigaco.

McNeill C. History and evolution of TMD concepts.*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 1997. 83: 51-60.

McNeill C, Danzig WM, Farrar WB, Gelb H, Lerman MD, Moffett BC, Pertes R, Solberg WK, Weinberg LA. Position paper of the American Academy of Craniomandibular Disorders.Craniomandibular (TMJ) disorders--the state of the art. *J Prosthet Dent.* 1980. 44: 434-437.

McNeill C, Mohl ND, Rugh JD, Tanaka TT. Temporomandibular disorders: diagnosis, management, education, and research. *J Am Dent Assoc.* 1990. 120: 253-257.

Mehra P, Wolford LM. Serum nutrient deficiencies in the patient with complex temporomandibular joint problems. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2008. 21: 243-247.

Melzack R. The McGill Pain Questionnaire: major properties and scoring methods. *Pain.* 1975. 1: 277-299.

Merida Velasco, JR, Rodríguez Vázquez JF, Collado J. Meckelian articular complex. *Eur Arch Biol.* 1990. 101: 447-453.

Michael WS, Brooke RI, Merskey H. Temporomandibular pain and dysfunction syndrome: The relationship of clinical and psychological data to outcome. *Journal of Behavioral Medicine.* 1986, Volume 9, Issue 1, pp 97-109.

Milam SB, Zardeneta G, Schmitz JP. Oxidative stress and degenerative temporomandibular joint disease: a proposed hypothesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998. 56: 214-223.

Mohl ND, Ohrbach R. The dilemma of scientific knowledge versus clinical management of temporomandibular disorders. *J Prosthet Dent.* 1992. 67: 113-120.

Mohlin B, Axelsson S, Paulin G, Pietilä T, Bondemark L, Brattström V, Hansen K, Holm AK. TMD in relation to malocclusion and orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2007. 77: 542-548.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986. 51: 263-273.

Murray H, Locker D, Mock D, Tenenbaum HC. Pain and the quality of life in patients referred to a craniofacial pain unit. *J Orofac Pain.* 1996. 10: 316-323.

Mutlu N, Erdal ME, Herken H, Oz G, Bayazit YA. T102C polymorphism of the 5-HT_{2A} receptor gene may be associated with temporomandibular dysfunction. *Oral Dis.* 2004. 10: 349-352.

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.

Narita M, Narita N. Genetic background of chronic fatigue syndrome. *Nihon Rinsho.* 2007. 65: 997-1002.

Navarro SL, Chang JL, Peterson S, Chen C, King IB, Schwarz Y, Li SS, Li L, Potter JD, Lampe JW. Modulation of human serum glutathione S-transferase A1/2 concentration by cruciferous vegetables in a controlled feeding study is influenced by GSTM1 and GSTT1 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009. 18: 2974–2978.

Ogus HD, Toiler PA. Common disorders of the temporo mandibular joint. Bristol, John Wright & Sons, 1981, p 49 45

Ohno S, Schmid T, Tanne Y, Kamiya T, Honda K, Ohno-Nakahara M, Swentko N, Desai TA, Tanne K, Knudson CB, Knudson W. Expression of superficial zone protein in mandibular condyle cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006. 14: 807–813.

Ojima K, Narita N, Narita M. Temporomandibular disorder is associated with serotonin transporter gene polymorphism in the Japanese population. *Biopsichosoc Med*. 2007. 1: 3.

Ojima K, Watanabe N, Narita N, Narita M. Temporomandibular disorder is associated with a serotonin transporter gene polymorphism in the Japanese population. *Biopsychosoc Med*. 2007. 10: 1-3.

Okeson JP. The effects of hard and soft occlusal splints on nocturnal bruxism. *J Am Dent Assoc*. 1987. 114: 788-791.

Okeson JP (1996) Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis and management. Quintessence Publishing Co, Inc, Chigaco.

Okeson JP. Current diagnostic classification schema and assessment of patients with temporomandibular disorders. Current terminology and classification schemes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997. 83: 61-64.

Okeson JP. Management of temporomandibular disorders and occlusion. 4th ed. St. Louis: Mosby, 1998.

Okeson JP, de Kanter RJ. Temporomandibular disorders in the medical practice. *J Fam Pract.* 1996. 43: 347-356.

Okumus M, Ceceli E, Tuncay F, Kocaoglu S, Palulu N, Yorgancioglu ZR. The relationship between serum trace elements, vitamin B12, folic acid and clinical parameters in patients with myofascial pain syndrome. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2010. 23: 187-191.

Olteanu H, Munson T, Banerjee R. Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry.* 2002, 41: 13378-13385.

Owen, AH. Orthodontic/orthopedic therapy for craniomandibular pain dysfunction. Part A. Anterior disk displacement, review of the literature. *Cranio.*1987. 5: 357-366.

Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, Peltonen L, Syvänen AC. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res.* 1997. 7: 606-614.

Perry HT, Xu Y, Forbes DP. The embryology of Temporomandibular join. *Cranio*. 1985. 3: 125-132.

Plesh O, Wolfe F, Lane N. The relationship between fibromyalgia and temporomandibular disorders: prevalence and symptom severity. *J Rheumatol*. 1996. 23: 1948-1952.

Plesh O, Noonan C, Buchwald DS, Goldberg J, Afari N. Temporomandibular disorder-type pain and migraine headache in women: a preliminary twin study. *J Orofac Pain*. 2012. 26: 91-98.

Price DD, McGrath, Rafii A, Buckingham B. The validation of visual analogue scale as ratio scale measures for chronic and experimental pain. *Pain*. 1983. 17: 45-56.

Price DD. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science*. 2000. 288: 1769-1772.

Ramfjord SP, Ash Jr. MM. 1971. Occlusion. 2nd Edn. Chap 11, p. 245-251. Saunders, Philadelphia.

Raphael KG, Marbach JJ, Gallagher RM, Dohrenwend BP. Myofascial TMD does not run in families. *Pain*. 1999. 80: 15-22.

Rayl EA, Moroson BA, Beardsley GP. The human purH gene product, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotideformyl-

transferase/IMP cyclohydrolase: cloning, sequencing, expression, purification, kinetic analysis, and domain mapping. *J Biol Chem.* 1996. 271: 2225-2233.

Ribeiro-Dasilva MC, Peres Line SR, Leme Godoy dos Santos MC, Arthuri MT, Hou W, Fillingim RB, Rizzatti Barbosa CM. Estrogen receptor-alpha polymorphisms and predisposition to TMJ disorder. *J Pain.* 2009. 10: 527-533.

Rollman GB, Gillespie JM. The role of psychosocial factors in temporomandibular disorders. *Curr Rev Pain.* 2000. 4: 71-81.

Ruffer MA. Studies in the palaeopathology of Egypt. Chicago: University of Chicago Press; 1921;

Schmidt A, Wu H, MacKenzie RE, Chen VJ, Bewly JR, Ray JE, Toth JE, Cygler M. Structures of three inhibitor complexes provide insight into the reaction mechanism of the human methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase. *Biochemistry.* 2000. 39: 6325-6335.

Schwartz LL. A temporomandibular joint pain-dysfunction syndrome. *J Chronic Dis.* 1956. 3: 284-293.

Schwartz L (1959) Disorders of the Temporomandibular Joint. W B Saunders, Philadelphia.

Seaman MI, Fisher JB, Chang F-M, Kidd KK. Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4). *Am J Med Genet.* 1999. 88: 705-709.

Seligman DA, Pullinger AG. The role of intercuspocclusal relationships in temporomandibular disorders: a review. *J Craniomandib Disord.* 1991. 5: 96-106.

Shane, B. (1995). Folate chemistry and metabolism. En:Folate in healthand disease. Bailey, L.B., ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York, EE.UU.pp: 1-22

Sharry JJ. Prostodoncia dental completa. Ed Toray. 1977 Barcelona.

Shen G, Darendeliler MA. The adaptive remodeling of condylar cartilage: a transition from chondrogenesis to osteogenesis. *J Dent Res.* 2005. 84: 691-699.

Shibukawa Y, Young B, Wu C, Yamada S, Long F, Pacifici M, Koyama E. Temporomandibular joint formation and condyle growth require Indian hedgehog signaling. *Dev Dyn.* 2007. 236: 426–434.

Slade GD, Nuttall N, Sanders AE, Steele JG, Allen PF, Lahti S.

Impacts of oral disorders in the United Kingdom and Australia. *Br Dent J.* 2005. 198: 489-493.

Slade GD, Diatchenko L, Bhalang K, Sigurdsson A, Fillingim RB,

Belfer I, Max MB, Goldman D, Maixner W. Influence of psychological factors on risk of temporomandibular disorders. *J Dent Res.* 2007. 86: 1120-1125.

Spruijt RJ, Wabeke KB. Psychological factors related to the prevalence of temporomandibular joint sounds. *J Oral Rehabil.* 1995. 22: 803-808.

Strange RC, Matharoo B, Faulder GC, Jones P, Cotton W, Elder

JB, Deakin M. The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the ST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 1991. 12: 25-28.

Suvinen TI, Reade PC, Hanes KR, Könönen M, Kempainen P.

Temporomandibular disorder subtypes according to self-reported physical and psychosocial variables in female patients: a re-evaluation. *J Oral Rehabil.* 2005. 32: 166-173.

Svensson P, Graven-Nielsen T. Craniofacial muscle pain: review of mechanisms and clinical manifestations. *J Orofac Pain.* 2001. 15: 117-145.

Svensson P, Jadidi F, Arima T, Baad-Hansen L, Sessle BJ. Relationships between craniofacial pain and bruxism. *J Oral Rehabil.* 2008. 35: 524-547.

Symons NB. A histochemical study of the secondary cartilage of the mandibular condyle in the rat. *Arch Oral Biol.* 1965. 10: 579-584.

Treister R, Pud D, Ebstein RP, Laiba E, Gershon E, Haddad M, Eisenberg E. Associations between polymorphisms in dopamine neurotransmitter pathway genes and pain response in healthy humans. *Pain.* 2009. 147: 187-193.

Verlaan M, TeMorsche RHM, Roelofs HMJ, Laheij RJF, Jansen JBMJ, Peters WHM, Drenth JP.H. Glutathione S-transferase mu null genotype affords protection against alcohol induced chronic pancreatitis. *Am J Med Genet.* 2003. 120A: 34-39.

Wang L, Lu J, An J, Shi Q, Spitz MR, Wei Q. Polymorphisms of cytosolic serine hydroxyl-methyltransferase and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Lung Cancer.* 2007. 57: 143-151.

Wang J, Chao Y, Wan Q, Zhu Z. The possible role of estrogen in the incidence of temporomandibular disorders. *Med Hypotheses*. 2008. 71: 564-567.

Wang YM, Chang Y, Chang YY, Cheng J, Li J, Wang T, Zhang QY, Liang DC, Sun B, Wang BM. Serotonin transporter gene promoter region polymorphisms and serotonin transporter expression in the colonic mucosa of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil*. 2012. 24: 560-565.

Wänman A. Longitudinal course of symptoms of craniomandibular disorders in men and women. A 10-year follow-up study of an epidemiologic sample. *Acta Odontol Scand*. 1996. 54: 337-342.

Wänman A, Agerberg G. Two-year longitudinal study of signs of mandibular dysfunction in adolescents. *Acta Odontol Scand*. 1986. 44: 333-342.

Wänman A, Agerberg G. Etiology of craniomandibular disorders: evaluation of some occlusal and psychosocial factors in 19-year-olds. *J Craniomandib Disord*. 1991. 5: 35-44.

Wänman A, Ogus G. Temporomandibular joint sounds in adolescents: a longitudinal study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990. 69: 2-9.

Warren MP, Fried JL. Temporomandibular disorders and hormones in women. *Cells Tissues Organs.* 2001. 169: 187–192.

Wenneberg B, Kopp S. Clinical findings in the stomatognathic system in ankylosing spondylitis. *Scand J Dent Res.* 1982. 90: 373-381.

Westling L. Temporomandibular joint dysfunction and systemic joint laxity. *Swed Dent J Suppl.* 1992. 81: 1-79.

Wiesinger B, Malker H, Englund E, Wänman A. Does a dose-response relation exist between spinal pain and temporomandibular disorders? *BMC Musculoskelet Disord.* 2009. 2: 10-28.

Wright AR, Gatchel RJ, Wildenstein L, Riggs R, Buschang P, Ellis E 3rd. Biopsychosocial differences between high-risk and low-risk patients with acute TMD-related pain. *J Am Dent Assoc.* 2004. 135: 474-483.

Yamaza T, Masuda KF, Atsuta I, Nishijima K, Kido MA, Tanaka T. Oxidative stress-induced DNA damage in the synovial cells of the temporomandibular joint in the rat. *J. Dent Res.* 2004. 83: 619-624.

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

PUBLICACIONES

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes, DRD4 and GSTM1 are related to temporomandibular disorder

Angel Aneiros-Guerrero¹, Ana M Lendinez¹, Arturo R Palomares¹, Beatriz Perez-Nevot², Lidia Aguado¹, Alvaro Mayor-Olea¹, Maximiliano Ruiz-Galdon^{1,2} and Armando Reyes-Engel^{1*}

Abstract

Background: Temporomandibular disorder (TMD) is a multifactorial syndrome related to a critical period of human life. TMD has been associated with psychological dysfunctions, oxidative state and sexual dimorphism with coincidental occurrence along the pubertal development. In this work we study the association between TMD and genetic polymorphisms of folate metabolism, neurotransmission, oxidative and hormonal metabolism. Folate metabolism, which depends on genes variations and diet, is directly involved in genetic and epigenetic variations that can influence the changes of last growing period of development in human and the appearance of the TMD.

Methods: A case-control study was designed to evaluate the impact of genetic polymorphisms above described on TMD. A total of 229 individuals (69% women) were included at the study; 86 were patients with TMD and 143 were healthy control subjects. Subjects underwent to a clinical examination following the guidelines by the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD). Genotyping of 20 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), divided in two groups, was performed by multiplex minisequencing preceded by multiplex PCR. Other seven genetic polymorphisms different from SNPs (deletions, insertions, tandem repeat, null genotype) were achieved by a multiplex-PCR. A chi-square test was performed to determine the differences in genotype and allelic frequencies between TMD patients and healthy subjects. To estimate TMD risk, in those polymorphisms that shown significant differences, odds ratio (OR) with a 95% of confidence interval were calculated.

Results: Six of the polymorphisms showed statistical associations with TMD. Four of them are related to enzymes of folates metabolism: Allele G of Serine Hydroxymethyltransferase 1 (SHMT1) rs1979277 (OR = 3.99; 95%CI 1.72, 9.25; p = 0.002), allele G of SHMT1 rs638416 (OR = 2.80; 95%CI 1.51, 5.21; p = 0.013), allele T of Methylentetrahydrofolate Dehydrogenase (MTHFD) rs2236225 (OR = 3.09; 95%CI 1.27, 7.50; p = 0.016) and allele A of Methionine Synthase Reductase (MTRR) rs1801394 (OR = 2.35; 95CI 1.10, 5.00; p = 0.037). An inflammatory oxidative stress enzyme, Glutathione S-Transferase Mu-1(GSTM1), null allele (OR = 2.21; 95%CI 1.24, 4.36; p = 0.030) and a neurotransmission receptor, Dopamine Receptor D4 (DRD4), long allele of 48 bp-repeat (OR = 3.62; 95%CI 0.76, 17.26; p = 0.161).

Conclusions: Some genetic polymorphisms related to folates metabolism, inflammatory oxidative stress, and neurotransmission responses to pain, has been significantly associated to TMD syndrome

* Correspondence: engel@uma.es

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Málaga, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Aneiros-Guerrero et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Temporomandibular joint disorder (TMD) is characterized by a set of symptoms related to the muscles and joints that reside between the mandibular condyle and the temporal bone. The most common symptoms are joint sounds, pain, and limited joint movement [1].

According to the NIDCR [2] (National Institute of Dental and Craniofacial Research), 5-12% of the population suffers or has suffered at some time from problems related to temporomandibular joint disorder (TMD) [3]. It is considered the most common cause of chronic pain in the orofacial region.

There are multiple factors that could cause or contribute to TMD disorder, including trauma, several types of arthritis, dental problems, autoimmune diseases, psychological and hormonal factors [4] and also commonly associated with other related symptoms in the head and neck [5].

Due to its etiological and symptomatic variety, it is assumed that a combination of factors related to environmental and/or nutritional stress could be an underlying cause of TMD [6-9]. As for genetic factors, studies of twins and familial segregation suggest that TMD is not a hereditary disease [10,11]. Nevertheless, individuals are not equally susceptible to TMD, and different genetic variants can increase the predisposition to a particular development of the disorder [12-22].

TMD is a problem that affects women two times more than men and its causes are not completely known. Certain hormones can increase inherent genetic vulnerability to TMD, which explains the larger predisposition of women of reproductive age [4,23]. The relationship between oestrogens and TMD has been studied previously [24,25]; specifically, the polymorphisms of the receptor gene *ER- α* , *Pvu II* (rs2234693) and *Xba I* (rs9340799), seem to be related to several forms of osteoarthritis, including TMD [17,19].

Folate metabolism can influence the final form of any growing tissue due not only to its participation in nucleic acid synthesis, but also to its known function in regulating DNA and protein methylation. Folate deficiency can cause central nervous system irritability, depression, weight loss, and anaemia. Nutritional deficiencies and, more specifically, abnormally low levels of vitamins B1, B6, B12, and/or folic acid are considered factors that perpetuate pain and myofascial dysfunction, and these deficiencies are frequent in cases of TMD mechanical stress [6].

Other mechanisms that have been related to TMD are factors related to psychopathological and pain perception, which can also be influenced by genetic variability. It has been described that the variants of a polymorphic region linked to gene *SLC6A4* of the serotonin transporter (5-HTT gene-linked polymorphic region, 5-HTTLPR

[22] could be related to pain perception and temporomandibular disorder [18]. The 44 bp insertion/deletion polymorphism of the *SLC6A4* gene has been extensively studied and frequently associated with the dopamine receptor gene *DRD4*; *DRD4* variants have been associated with several clinical cases related to behavior, psychopathologies, and pain [17,26,27].

The following objective was to study the implication of 27 polymorphisms located on 17 genes and their relation with TMD. It has been designed under the hypothesis of that TMD is a multifactorial syndrome related to a critical period of human life that have a genetic and epigenetic basis both associated to folate metabolism, oxidative stress, hormones and neurotransmission.

Methods

Study design

A case-control study was designed to evaluate the impact of gene polymorphisms above described on TMD. A total of 229 individuals (69% women) were included at the study; 86 were TMD patients and 143 were healthy control subjects. The sample size was calculated using the prevalence of TMD and allele and genotypes frequencies of the polymorphism selected based on their known frequency in our population.

Patient recruitment

Thirty five patients diagnosed with TMD who were admitted consecutively to private dental surgeries ('Clínica Rincon' and 'Clínica Dental Aneiros' in Malaga, Spain), during a period of 8 months were included in this study. In addition, 556 volunteer students from Malaga University (57% female and 43% male) were invited to participate in the study. They answered a questionnaire for TMD (Table 1) [28]. Ninety eight individuals responded affirmatively to four or more question of the questionnaire. So, they were invited to be clinically evaluated following the guidelines from The Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD) [29] by a dentist who had experience in TMD evaluation. Fourteen subjects were excluded because they could not come to the physical examination and 33 had not clinical signs of TMD. Case group was 86 patients (35 previously diagnosed and 51 diagnosed volunteers), 64 women (74%), mean age 19.4 ± 2.9 , and 22 men (26%) mean age 23.6 ± 4.1 . Exclusion criteria for TMD patients were clinical history of traumatic injuries on head and neck, cranial anomalies of known or unknown etiology, inflammatory chronic disease component, mental retardation, drug dependence, and somatic or neurological illnesses.

The control group was built from the volunteers who did not answer affirmatively to any question. All participants

Table 1 Questionnaire form for TMD

1. Do you have difficulty or pain, or both, when opening your mouth, as for instance, when yawning?
2. Does your jaw get stuck, locked, or go out?
3. Do you have difficulty or pain, or both, when chewing, talking, or using your jaws?
4. Are you aware of noises in the jaw joints?
5. Do you have pain in or about the ears, temples, or cheeks?
6. Does your bite feel uncomfortable or unusual?
7. Do you have frequent headaches?
8. Have you had a recent injury to your head, neck, or jaw?
9. Have you previously been treated for a jaw joint problem? If so, when?

From *J Am Dent Assoc* 1990, **120**: 253-254.

were healthy, without any signs or symptoms of TMD and age matched to the TMD group. In short, control group consisted in 143 subjects, 94 women (66%), mean age 19,6 ± 3.3, and 49 men (34%), mean age 22,3 ± 4.1.

All the participants signed an informed consent form, and their personal data were recorded by interviewers. The study protocol was approved by Ethics Committee of Malaga University and conformed to the Helsinki Declaration.

Samples and DNA isolation method

After obtaining informed consent, oral mucosa samples were collected from the 229 subjects. DNA isolation was performed using the salting out method, as described by Martinez et al. [30], applied to the oral mucosa.

Genotyping

Three platforms were designed to perform the genotyping. Two of them for 20 Single Nucleotide Polymorphisms (SNP1, SNP2) and the third one for other polymorphisms of 7 gene variants (deletions, insertions, tandem repeat, null genotype). Primers were designed using the primer analysis software *Oligo*, version 4.0 and synthesized commercially. The primers sequences are shown in table 2. To verify the validity and reliability of the techniques, the quality of each isolated polymorphism was checked in a simplex reaction.

SNPs

Genotyping of SNPs was performed by multiplex mini-sequencing preceded by multiplex PCR [31]. This technique consists of three steps:

1) Amplification of regions flanking the SNPs by multiplex PCR; PCR reactions were performed in a volume of 10 µL with 100 ng of genomic DNA, 1×Amplitaq Gold[®] Buffer (Applied Biosystems), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 1 unit of Amplitaq Gold[®] DNA Polymerase (Applied Biosystems) and Primer Mix (primer

concentrations ranged between 0,1-0,6 µM). Amplification was achieved in a 2720 Thermal Cycler[®] (Applied Biosystems) and consisted of 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles for 30 s at 94°C, 30 s at 58°C; 30 s at 72°C and a final extension for 7 min at 72°C. PCR products were checked in a 2% agarose gel, stained with SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen) which resulted in 100 to 400 bp sized bands. In order to eliminate the excess of primers and dNTPs, the PCR products were digested by an 'ExoCiAP' mix consisting of 2 units/10 µL PCR *E. coli* exonuclease I (Exo I, Takara[®]) and 5 units/10 µL PCR alkaline phosphatase (CiAP, Takara[®]) incubated at 37°C for 60 minutes. The enzymes were afterwards inactivated by heating at 80°C for 20 minutes

2) Multiplex mini-sequencing for each locus of the SNP multiplexes (SNP1, SNP2), a mini-sequencing primer with the 3'-end adjacent to the target SNP was designed (see Table 2) to anneal with the PCR product. A mini-sequencing reaction extends this primer, producing different products for each allele. We performed the reaction in a 11 µL volume with 4 µL purified PCR product and 6 µL of the mini-sequencing primers mix (2 pM/µL) and 1 µL of SNaPshot[®] multiplex kit (Applied Biosystems). The mini-sequencing conditions consisted of 40 cycles at 96°C-10 s; 50°C-7 s; 60°C-30 s. After that, we proceeded to purify the sample using 1 unit of *alkaline phosphatase* (Takara[®]) at 37°C for 1 hour and then at 80°C for 20 min.

3) Analysis of mini-sequencing products by capillary electrophoresis: We mixed 4 µL of the purified mini-sequencing products with 10 µL of HiDi[™] formamide and 0.2 µL of GeneScan-120 LIZ size standard (Applied Biosystems) and denatured at 95°C for 5 minutes. The fluorescently labeled products were resolved by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The DS02 matrix (Applied Biosystems) was used at full speed for 17 minutes with 8 seconds of injection. The resulting data were analyzed with GeneMapper[™] 4.0 Software (Applied Biosystems).

Other polymorphisms

To detect other polymorphisms different from SNPs (deletions, insertions, tandem repeat, null genotype), a multiplex PCR assay was performed under the following concentrations (in a volume of 10 µL): 100 ng of genomic DNA, 1× GoTaq[®] FlexiBuffer (Promega), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Primer Mix (primer concentrations ranged between 0,1-0,6 µM), Betaine 50 mM and 1 unit of GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega). The labeled primers are shown in table 2. Amplification was achieved in a 2720 Thermal Cycler[®] (Applied Biosystems) and consisted of 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles for 30 s at 94°C, 45 s at 58°C; 1 min at 72°C and a final extension for 7 min at 72°C. We mixed 4 µL of PCR

Table 2 Information of the polymorphisms included in the study

Name	Reference	SNP/F	Location	A1	A2	Forward Primers	Reverse Primers	Minisequencing Primers	Mult.
SHMT1	rs1979276	SNP	3'-UTR	A	G	CTGGAGGGGATAGTACCAG	GTCACAGTCCCTTTTGG	CCGGAGGACCCCCAC	SNP1
	rs1979277	SNP	EXON	A	G	CTGGAGGGGATAGTACCAG	GTCACAGTCCCTTTTGG	(T)31-GCCAGGAGAGGGAGCA	SNP1
	rs643333	SNP	5'-UTR	A	C	TGGAGCCACATTTGCTTAC	ATCAGAGCGGAGCCGAA	(T)24-ACCTGGACAGACTGACCC	SNP1
	rs638416	SNP	5'-UTR	C	G	TGGAGCCACATTTGCTTAC	ATCAGAGCGGAGCCGAA	(T)91-GCAGGGCTGTTTCTCC	SNP1
	rs32783	SNP	3'-UTR	C	G	CTGGAGGGGATAGTACCAG	GTCACAGTCCCTTTTGG	(T)115-GGGTCTCTCCGGGAG	SNP1
TYMS	rs2853542	SNP	5'-UTR	C	G	GTECCACACCCGTGGCTCC	GCCACAGGCATGGCCGGG	(T)84-GGGACGGAGGCCAGGC	SNP1
	rs34489327	F	3'-UTR	I	D	PET-CAAACTCGAGGGAGCTGAGT	CAGATAAGTGGCAGTACAGAA		F
	rs34743033	F	5'-UTR	2R	3R	VC-GTCCACACCCGTGGCTCC	GCCACAGGCATGGCCGGG		F
	rs9606756	SNP	EXON	A	G	GGAGAGGCCCTGGTAAAG	CCTCTGTCCTCCAGCCCTG	(T)64-GGCTGTCCATCTCTGTA	SNP1
TCN	rs1801198	SNP	EXON	C	G	GGGAAAGACCCCTGGAGC	GCTGGAAATCATGAGAGC	(T)58-CCGAGTCTCGCCCA	SNP2
	rs1801131	SNP	EXON	A	C	CTTTGGGAGCTGAGGACTACTAC	CACCTTTGTGACCATTCCTGGTTG	(T)71-AGGAGCTGACCCAGTGAAG	SNP2
MTHFR	rs1801133	SNP	EXON	C	T	GTTGCTCTTCACTCCCTCG	GACCGTCTCGGTGAGAGTG	GAAGGTGTCTCCGGGAG	SNP2
	rs5742905	SNP	EXON	C	T	GGTCTTGGGTTTCTCATCC	CCTCGTCTGGTTCAGCTCC	(T)42-GCCGCCCTCTCGAGATCA	SNP2
CBS	chs94ins68	F	INTR/EXON	S	L	6FAM-GTGTAAACGGGGGATATGG	GTGTCTGCTCCGCTCTGGTT		F
ABCB1	rs1045642	SNP	EXON	C	T	GCTGAGACATTCCTCTATGG	TAGGGGTGTGATTTGGTTGC	(T)34-GGCTGCACAGGAGAGAT	SNP2
	rs2372536	SNP	EXON	C	G	CCTAGATAGCTGTAAACAC	GTAATCCCAAAAGCAATC	(T)18-CCAGGCTCTCTCAACA	SNP1
BHMT	rs3733890	SNP	EXON	A	G	TGTGACTGCCACTTTGACC	ATGGGANTCTGGGAGATGG	ATCAGGTGAGCTTTCAGT	SNP1
DHFR	DHFR19pdel	F	INTRON	+	-	ACGGTGGGGGTGGCCGACTC	6FAM-AAAGGGGATCCAGTCCGG		F
	GSTM1del	F	EXON	+	-	PET-GACTCCCTGAAAGCTAAGGC	GTTGGGCTCAATATACGGTGG		F
MTHFD1	rs2286225	SNP	EXON	C	T	CCCATTGTGGAGCAGGATG	CATCCCAATCCCTCTGATG	(T)59-AACAGCTTGAGTGGGATC	SNP1
	rs12749581	SNP	EXON	A	G	GCATGACCACTTACTACACC	TCCAAAGCTTTTACACTCC	AATATGAGATATAGACAGG	SNP2
MTRR	rs1801394	SNP	EXON	A	G	TTCAGTTCACTGTACATGC	GTAACGGCTCAACCTATATCG	(T)51-ACCAGACTTCTCAACA	SNP1
RFC1	rs1051266	SNP	EXON	A	G	TTCGAGGACAGAGTGCACC	CCGGCTGAAGTCTTGTGCG	(T)40-CCGGTCTCGGCGGC	SNP1
ESR1	rs9340799	SNP	INTRON	A	G	AGGGTATATGGCAATGACG	CTGCACCAATATGTTACC	(T) ₁₀ -AGACCCTGAGTGGTCT	SNP2
	rs2234693	SNP	INTRON	C	T	AGGGTATATGGCAATGACG	CTGCACCAATATGTTACC	(T) ₂₀ -AGTTCCTAAATGTCCAGC	SNP2
DRD4	drd4-48bpI	F	EXON	S	L	NED-GCTGCTGCTACTGGGC	CCCGCCGGGTGATCTGG		F
SLC6A4	SLC6A45-HTTLPR	F	5-HTTLPR	S	L	VC-GGTTGCGCCCTCTGAGTCT	GTECCACTAGACGCCAGG		F

SNP = Single Nucleotide Polymorphism; F = Fragment or Repeat; A1 = Allele 1; Allele2: MULT = Multiple Reaction-SHMT1 = Swiss Hydroxymethyltransferase; TYMS = Thymidylate Synthetase; TCN = Transcobalamin II; MTHFR = 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase; CBS = Cystathionine Beta-Synthase; ABCB1 = ATP-binding Cassette B1; ATR = 5-Aminomidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside Formyltransferase/IMP Cyclohydrolase; BHMT = Betaine-Homocysteine Methyltransferase; DHFR = Dihydrofolate Reductase; MTHFD1 = Methylene-tetrahydrofolate Dehydrogenase 1; MTR = 5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine S-Methyltransferase; MTRR = Methionine Synthase Reductase; RFC1 = Reduced Folate Carrier 1; ESR1 = Estrogen Receptor 1; DRD4 = Dopamine Receptor 4; SLC6A4 = Solute Carrier Family 6.

products with 10 μ l of HiDi™ formamide and 0.2 μ l of GeneScan-600 LIZ size standard (Applied Biosystems) and denatured at 95°C for 5 minutes. The fluorescently labeled products were resolved by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The DS33 matrix (Applied Biosystems) was used at full speed for 45 minutes with 5 seconds of injection. The sizes of the alleles were analyzed with GeneMapper Ver. 4.0 (Applied Biosystems) software.

Statistics

All analyses were performed using Statistical Package for Social Sciences statistical software (SPSS v. 16.0 for Macintosh; SPSS Inc., Chicago, IL). To determine the differences in genotype and allelic frequency of each studied polymorphism between TMD patients and healthy subjects, a chi-square test was used. Any *p* value < 0.05 was considered as a statistical difference. In those polymorphisms that shown significant difference in genotype, the risk between subjects with TMD and healthy controls was evaluated by Cochran's-Haenzel odds ratios with a 95% confidence interval using sex as confounding factor.

Results

Genotyping was performed for the 229 individuals. The results are summarized in Table 3. Not all of the samples were valid for all genotypes, because of that, the number of individuals can vary from one polymorphism to another.

Serine Hidroximetil Transferase 1 gene (SHMT1)

This enzyme catalyzes the reversible conversion of serine to glycine, transferring methyl groups to tetrahydrofolate (THF), which is transformed into 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-CH₂-THF). During cellular proliferation, this is the predominant pathway for pyrimidine synthesis (see Figure 1).

From the four polymorphisms studied on the cytoplasmic SHMT1 in TMD patients, a significant increase was observed of the G allele of the polymorphism rs1979277 (Leu435Phe) when compared with controls (OR = 3.99; 95% CI 1.72, 9.25; *p* = 0.002). Regarding the polymorphism SHMT1 rs638416 of the promoter region (5'-UTR), a very significant increase was observed of the C allele and the CC genotype in TMD patients (OR = 2.80; 95% CI 1.51, 5.21; *p* = 0.013). Both polymorphisms are not linked [32], so their frequencies can be measured independently as a risk factor for TMD.

Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 gene (MTHFD1)

The MTHFD1 gene encodes a protein that has three distinct enzyme activities: 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, 5,10-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase, and 10-formyltetrahydrofolate-synthetase.

Each of these activities catalyzes one of three interconversion reactions of one-carbon derivatives of THF, which are substrates for the synthesis of methionine, thymidylate and purines. The trifunctional enzymatic activity is conferred by two larger domains: a terminal amino portion with dehydrogenase and cyclohydrolase activities and a larger domain with synthetase activity.

The transition from G to A (rs2236225) in the MTHFD1 gene that results in an alteration of ARG-653-GLN is clinically associated with susceptibility to neural tube defects (NTDs) sensitive to folates [33]. In our study, we found statistical differences in the alleles and genotypes frequencies between TMD patients and healthy controls. The T allele was more frequent in TMD patients (OR = 3.09; 95% CI 1.27, 7.50; *p* = 0.016).

Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) gene

This gene encodes mu-class glutathione S-transferase. Its function is the detoxification of electrophilic compounds, including carcinogens, drugs, toxins, and products of oxidative stress, by the conjugation with glutathione.

The GSTM1-null polymorphism is a deletion of the GSTM1 gene. The null variant of this gene has been associated with an increase of cancer and male infertility [34,35] possibly due to greater susceptibility to environmental toxins and carcinogens as well as an alteration in the toxicity and efficiency of certain substances.

Our study found a statistical increase (OR = 2.21; 95% CI 1.24, 4.36; *p* = 0.030) of the null variant in TMD patients compared to the control group.

Methionine Synthase Reductase (MTRR) gene

MTRR is responsible for the regeneration of Methionine Synthase (MTR) by reductive methylation using SAM as a methyl donor.

The substitution of A by G (rs1801394) in the encoding region is translated in Ile22Met. The G allele produces an enzyme with less affinity for the substrate [36]. A statistical increase of the A allele (OR = 2.35; 95% CI 1.10, 5.00; *p* = 0.037) was observed in the TMD group.

D4 receptor of Dopamine (DRD4) gene

DRD4-48bp is the 48-bp VNTR in exon 3 of the DRD4, which encodes the third intracellular receptor loop and presents between 2 to 11 repeats. According to the number of repetitions, we can characterize the polymorphism as the short allele S-DRD4 (2 to 5 repetitions) and the long allele L-DRD4 (6 or more repeats) [37]. It was observed statistical differences on genotype frequencies in both groups (*p* = 0.039), but no statistical increase (OR = 3.12; 95% IC 0.76, 17.26, *p* = 0.181) of the S-DRD4 allele was found in patient group. The LL

Table 3 Allele and genotypes frequencies in TMD and control groups

GENE	REFERENCE ALELE	PATIENTS						CONTROLS						ODDS RATIOS		
		G1	G2	G3	A1/A2	G1	G2	G3	A1/A2	X ² -genotype	Allele	OD	95%CI	P		
SHMT1	rs1979276	A/G	7 (0.10)	36 (0.49)	30 (0.41)	0.34/0.66	24 (0.20)	54 (0.45)	41 (0.34)	0.43/0.57						
	rs1979277	A/G	8 (0.11)	31 (0.44)	32 (0.45)	0.33/0.67	35 (0.34)	28 (0.27)	41 (0.39)	0.47/0.53	0.002	G	3.99	1.72-9.25	0.002	
	rs643333	A/C	3 (0.04)	32 (0.43)	39 (0.53)	0.26/0.74	10 (0.08)	47 (0.39)	64 (0.53)	0.28/0.72	ns					
	rs638416	C/G	19 (0.24)	39 (0.50)	20 (0.26)	0.49/0.51	12 (0.10)	50 (0.41)	60 (0.49)	0.30/0.70	0.001	C	2.80	1.51-5.21	0.013	
	rs3783	C/G	1 (0.01)	27 (0.36)	46 (0.62)	0.20/0.80	2 (0.02)	33 (0.28)	85 (0.71)	0.15/0.85	ns					
TYMS	rs2853542	C/G	55 (0.73)	20 (0.27)	0 (0.00)	0.87/0.13	96 (0.76)	30 (0.24)	0 (0.00)	0.88/0.12	ns					
	rs34489327	D/I	9 (0.13)	25 (0.35)	38 (0.53)	0.30/0.70	7 (0.08)	32 (0.34)	54 (0.58)	0.25/0.75	ns					
	rs34743033	2R/3R	12 (0.17)	36 (0.50)	24 (0.33)	0.42/0.58	10 (0.12)	55 (0.64)	21 (0.24)	0.44/0.56	ns					
	rs9606756	A/G	57 (0.75)	16 (0.21)	3 (0.04)	0.86/0.14	85 (0.73)	30 (0.26)	1 (0.01)	0.86/0.14	ns					
TCN	rs1801108	C/G	30 (0.38)	38 (0.49)	10 (0.13)	0.63/0.37	56 (0.46)	61 (0.50)	6 (0.05)	0.20/0.30	ns					
	rs1801131	A/C	44 (0.57)	25 (0.32)	8 (0.10)	0.73/0.27	64 (0.53)	47 (0.39)	10 (0.08)	0.27/0.28	ns					
MTHFR	rs1801133	C/T	27 (0.35)	37 (0.48)	13 (0.17)	0.59/0.41	43 (0.34)	62 (0.49)	22 (0.17)	0.58/0.42	ns					
	rs742905	C/T	0 (0.00)	12 (0.18)	54 (0.82)	0.09/0.91	2 (0.02)	27 (0.25)	81 (0.74)	0.14/0.86	ns					
CBS	rs844ms68	SL	59 (0.84)	11 (0.16)	0 (0.00)	0.92/0.08	68 (0.81)	14 (0.17)	2 (0.02)	0.89/0.11	ns					
	rs1045642	C/T	28 (0.36)	38 (0.49)	12 (0.15)	0.60/0.40	30 (0.24)	64 (0.51)	31 (0.25)	0.50/0.50	ns					
ATIC	rs2372536	C/G	23 (0.49)	18 (0.38)	6 (0.13)	0.68/0.32	44 (0.43)	42 (0.41)	17 (0.17)	0.63/0.37	ns					
	rs733890	A/G	11 (0.15)	29 (0.40)	32 (0.44)	0.35/0.65	17 (0.14)	54 (0.45)	49 (0.41)	0.37/0.63	ns					
DHFR	DHFR19del	+	22 (0.31)	31 (0.43)	19 (0.26)	0.52/0.48	29 (0.31)	48 (0.52)	16 (0.17)	0.57/0.43	ns					
	GSTM1del	-	17 (0.23)	56 (0.77)		0.62/0.38	39 (0.40)	58 (0.60)		0.20/0.30	0.015	null	2.21	1.24-4.36	0.030	
MTHFD1	rs232625	C/T	7 (0.09)	47 (0.63)	21 (0.28)	0.41/0.59	28 (0.24)	70 (0.60)	18 (0.16)	0.54/0.46	0.011	T	3.09	1.27-7.50	0.016	
	rs1805087	A/G	55 (0.71)	20 (0.26)	2 (0.03)	0.84/0.16	80 (0.63)	42 (0.33)	4 (0.03)	0.80/0.20	ns					
MTRR	rs1801394	A/G	28 (0.37)	37 (0.49)	11 (0.14)	0.61/0.39	29 (0.25)	54 (0.47)	33 (0.28)	0.48/0.52	0.046	A	2.35	1.10-5.00		
	rs1051266	A/G	15 (0.20)	42 (0.55)	19 (0.25)	0.47/0.53	28 (0.23)	59 (0.49)	33 (0.28)	0.48/0.52	ns					
ESR1	rs9340799	A/G	37 (0.48)	35 (0.45)	5 (0.06)	0.71	55 (0.43)	59 (0.46)	13 (0.10)	0.67/0.33	ns					
	rs2234693	C/T	13 (0.17)	44 (0.58)	21 (0.27)	0.45	32 (0.25)	60 (0.48)	34 (0.27)	0.49/0.51	ns					
DRD4	drd448bpnr	SL	50 (0.96)	2 (0.04)	0 (0.00)	0.98	69 (0.87)	7 (0.09)	3 (0.04)	0.92	0.039	L	3.12	0.76-17.2	0.161	
	SCL6M4	SL	20 (0.43)	16 (0.35)	10 (0.22)	0.61	31 (0.40)	32 (0.41)	15 (0.19)	0.60	ns					

ns = no statistical difference.

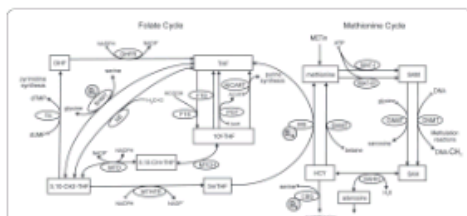


Figure 1 The Folate and methionine cycles. Abbreviations: 10F-THF: 10-formyltetrahydrofolate; 5,10-CH₂-THF: 5,10-methylenetetrahydrofolate; 5,10-CH-THF: 5,10-methyletetrahydrofolate; 5mTHF: 5-methyltetrahydrofolate; AICART: Aminoimidazolecarboxamide ribotide transformylase; ATIC: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/imp cyclohydrolase; BHMT: Betaine-homocysteine methyltransferase; CBS: Cystathionine beta-synthase; DHF: Dihydrofolate reductase; DNMT: S-adenosylmethionine dependent methyltransferases; DNMT1, DNA methyltransferase; FTD: 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase; FTS: 10-formyltetrahydrofolate synthase; GNMT: glycine N-methyltransferase; GST: Glutathione S-transferase; MAT: methionine adenosyltransferase; MTHFD1: 5,10-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase; MTHFR: 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; MTR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase; MTRR: Methionine synthase reductase; NE: nonenzymatic interconversion of THF; PGT: phosphoribosyl glycinamidetransformylase; SAH: S-adenosylhomocysteine; SAHh: S-adenosyl homocysteine hydrolase; SAM: S-adenosylmethionine; SHMT: Serine hydroxymethyltransferase; TCN2: Transcobalamin II; THF: tetrahydrofolate; TS: thymidylate synthase; TYMS: Thymidylate synthetase.

genotype was not found in any of the individuals with TMD.

Discussion

Temporomandibular disorder has been associated with psychological dysfunctions [38], and sexual dimorphism [24]. Its occurrence also appears to coincide with puberty [25]. Currently, controversy exists as to the importance of underlying genetic and environmental nutritional factors, such as vitamin intake [7]. The folate-methionine axis takes part in both factors. In this axis, there are several polymorphic variants of the enzymes involved that together with folate dietary intake determines the metabolism of the axis. Furthermore, the transfer of methyl groups to DNA and proteins is one of the limiting factors for the correct development of the proliferating tissues. Therefore the latter is key for the continuous tissue growth and epigenetic modifications.

This work studied the implication of 27 polymorphisms located on 17 genes and their relation with TMD. It has been designed under the hypothesis of that TMD is a multifactorial syndrome related to a critical period of human life that have a genetic and epigenetic basis [12-22]. The study of genes related to folate cycle is

directly involved in the two ways: the genetic, by gene polymorphisms, and epigenetic by the nutritional habits because of the folate intake. Deficit of folate intake is known as the most prevalent vitamin deficit in human. The majority of the genes studied were related to folate metabolism even though there were others related to oxidative metabolism and hormonal and neurotransmission receptors. Of the 17 genes studied of the folate cycle, 3 of them (SHMT, MTHFD, MTRR) showed significant associations with TMD. Significant changes in the allele and genotype frequencies between the TMD patients and controls were found.

SHMT catalyzes a reversible step of THF to 5,10-CH₂-THF, which is a key substrate to obtain 5-methyl-THF and synthesize thymidylate. On the other hand, MTHFD1 provides the 5,10-CH₂-THF substrate in addition to having a central role in the cycle due to its triple functionality. The 5-methyl-THF to methionine step is catalyzed by MTR in cooperation with TCN and MTRR, which are essential for the participation of vitamin B12 as a cofactor and the reactivation of MTR, respectively.

In our case, a higher significant frequency of the allele SHMT-rs1979277G was observed in TMD patients (0.67 vs 0.53). The Allele G has been related to higher levels of folates and homocysteine [39], this could mean that the enzyme activity is deviated to the THF and glycine synthesis versus to the serine and 5,10-CH₃-THF substrate of the MTHFR which provide 5-CH₂-THF needed to the methionine synthesis by mean of homocysteine. The increase of homocysteine, classified as an oxidant, could favour inflammatory process. However the effect of this polymorphism on enzyme activity is still controverted [39].

Statistical differences were also observed in allelic frequency of the C allele the SNP rs638416, in the promoter region of the SHMT gene. SHMT not only provides one-carbon units for thymidylate biosynthesis but also generates a pool of methylenetetrahydrofolate for SAM synthesis by means of serine synthesis. In addition, the SHMT gene has the capacity to sequester 5-methyl-THF and therefore inhibit the synthesis of methionine and SAM, which is the methyl donor for DNA and proteins [39]. Therefore, greater SHMT activity would produce higher 5-methyl-THF sequestration, which would reduce SAM synthesis. Cellular deficits of SAM could induce lesser methylation on the novo synthesized DNA on inflammatory tissues, which can take to higher gene expression levels, generating a positive feedback on inflammation and pain.

TMD patients and healthy controls had very significantly different genotypic frequencies of the SNP rs2236225 of the MTHFD gene. The triple functionality of the MTHFD enzyme and the central role it plays in the folate cycle make it one of the key points for the

balance of this metabolic route [24]. Therefore, it is not difficult to believe that any genetic alteration that affects its expression or activity would have consequences for methyl transfer and consequently on epigenesis.

The results of the present work show that the polymorphic variants SHMT-rs1979277, rs638416, and MTHFD1-rs2236225 found in the folate cycle were significantly associated with TMD. They coincided with a global decrease in the availability of methyl groups via a decrease of the substrate 5,10-CH₂-THF (SHMT and MTHFD1), while the SNP MTRR-rs1801394 did not follow the same pattern. The wild allele A, predominant in TMD, which means greater efficiency in the pathway of homocysteine to methionine, has the same final effect of the variants of SHMT and MTHFD, an increase of THF levels.

TMD have been associated to oxidative stress of the temporomandibular joint [40-44]. Regarding GTSM1, we found a significant number of individuals with TMD (OD = 2.21; 95%CI 1.24, 4.35; p = 0.030) with the null variant of the gene. It has been published that oxidative stress, which leads to the production of NO and peroxynitrite, is harmful to DNA in response to the excessive mechanical overload, which in turn promotes synovial hyperplasia in the temporomandibular joint [40]. This suggests that a reduced detoxification capacity would make us more susceptible to TMD.

Previous studies on associations of TMD with alpha ESR1 polymorphisms have shown different results. One of them find a predisposition to TMD associated to ESR1 polymorphism in women [15] others find a relation between pain [17] or craniofacial morphology [19] in TMD women with ESR1 polymorphism, however other recent report does not find this association[12]. In the present study there were no statistical differences in their individualized allelic and genotypic frequencies or in the distinct haplotype combinations. However, a study on the association between these polymorphisms and the predisposition to TMD has recently been published and deepens the characterization of the diplotypes using novel mathematic algorithms[15], which we will take into account in future studies.

In contrast to others authors [18,21], significant variations were not found in the frequencies of the 5-HTTLPR (serotonin-transporter-linked promoter region) polymorphism of the serotonin receptor gene SCL6A4. However, we found a significant variation in the 48-bp VNTR polymorphism of the DRD4 gene. This polymorphism has been associated with pain processes, such as fibromyalgia [35] and migraine [36].

Conclusions

In this study we have found new associations of polymorphic genes, related to folates, SHMT, MTHFD and MTR, oxidative stress GSTM1 and neurotransmission

DRD4, with TMD. Concluding that the emergence of TMD in the tissues involved in joint morphogenesis in the final phase of maturity may occur due to multiple factors. Among those factors, we have found genetic polymorphisms involving folate deficiency, psycho-physical stress and the oxidative metabolism in cellular proliferation during puberty. The novelty of the results obtained in this study should be confirmed and extended in subsequent work with larger populations.

Acknowledgements

This study was supported by the "Ministerio de Educación y Ciencia" (Spain), (SAF2008-03314) and "Programa Torres Quevedo" (PTQ-09-0100496) Grants

Author details

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Málaga, Spain. ²Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain.

Authors' contributions

AAG contributed to the acquisition, analysis and interpretation of data, and performed the drafting of the manuscript. AML and BPN carried out the molecular genetic analysis, interpretation of data and drafting the manuscript. ARP participated in the sequence alignment, design of the PCR multiplex's and drafted the manuscript. AMO performed statistical analysis and drafted the manuscript. LA contributed to the acquisition and interpretation of data. MRG participated in the design and coordination of the study and he helped to draft the manuscript. ARE conceived and designed the study, he oversaw the analysis, contributed to the interpretation of the results and preparation of the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 27 October 2010 Accepted: 26 May 2011

Published: 26 May 2011

References

1. The TMJ association. [<http://www.tmj.org>].
2. National Institute of Dental and Craniofacial Research. [<http://www.nidcr.nih.gov>].
3. National Institute of Dental and Craniofacial Research. [<http://www.nidcr.nih.gov/DataStatistics/FindDataByTopic/facialPain>].
4. Wang J, Chao Y, Wan Q, Zhu Z: The possible role of estrogen in the incidence of temporomandibular disorders. *Med Hypotheses* 2008, **71**:564-567.
5. Armijo Olivo S, Magee DJ, Parfitt M, Major P, Thie NM: The association between the cervical spine, the stomatognathic system and craniofacial pain: a critical review. *J Orofac Pain* 2006, **20**:271-287.
6. Mehra P, Wolford LM: Serum nutrient deficiencies in the patient with complex temporomandibular joint problems. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2008, **21**:243-247.
7. Mäler R, Deutsch H, Siebert GK, Gerbershagen HU, Grünh E, Behl M, Kübler W: Vitamin status of in patients with chronic cephalgia and dysfunction pain syndrome and effects of a vitamin supplementation. *Int J Vitam Nutr Res* 1988, **58**:436-441.
8. Johanson AK, Johanson A, Unell L, Norring C, Carlsson GE: Eating disorders and sign and symptoms of temporomandibular disorders: a matched case-control study. *Swed Dent J* 2010, **34**:139-147.
9. Slade GD, Diatchenko L, Ohrbach R, Maliner W: Orthodontic treatment, genetic factors and risk of temporomandibular disorder. *Sem Orthod* 2008, **14**:146-156.
10. Raphael KG, Marbach JJ, Gallagher BM, Dohrenwend BP: Myofascial TMD does not run in families. *Pain* 1999, **80**:15-22.
11. Helberg A, Heloe B, Helberg AN, Heloe LA, Magnus P, Berg K, Nance WE: Myofascial pain dysfunction (MPD) syndrome in twins. *Community Dent Oral Epidemiol* 1980, **8**:434-6.

12. Kim BS, Kim YK, Yun PY, Lee E, Bae J: The effects of estrogen receptor polymorphism on the prevalence of symptomatic temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg* 2010, **68**:2975-2979.
13. Nackle AG, Diatchenko L: Assessing potential functionality of catechol-O-methyltransferase polymorphisms associated with pain and temporomandibular joint disorders. *Methods Mol Biol* 2010, **617**:375-393.
14. Tchivileva IE, Lim PF, Smith SR, Slade GD, Diatchenko L, McLean SA, Maizner W: Effect of catechol-O-methyltransferase polymorphism on response to propanolol therapy in chronic musculoskeletal pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover pilot study. *Pharmacogenomics* 2010, **20**:239-248.
15. Ribeiro-Dasilva MC, Peres Line SR, Leme Godoy dos Santos MC, Arthur MT, Hou W, Filligim RB, Rizzatti Barbosa CM: Estrogen receptor-alpha polymorphism and predisposition to TMJ disorder. *J Pain* 2009, **10**:527-533.
16. Etöz OA, Ataçoglu H, Erdal ME: Association between tryptophan hydroxylase gen polymorphism and painful non-osses temporomandibular disorder. *Saudi Med J* 2008, **29**:1352-1354.
17. Kang SC, Lee DG, Choi JH, Kim ST, Kim YK, Ahn AH: Association between estrogen receptor polymorphism and pain susceptibility in female temporomandibular joint osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007, **36**:391-394.
18. Ojima K, Narita N, Narita M: Temporomandibular disorder is associated with serotonin transporter gene polymorphism in the Japanese population. *Biopsychosoc Med* 2007, **1**:3.
19. Lee DG, Kim TW, Kang SC, Kim ST: Estrogen receptor gen polymorphism and craniofacial morphology in female TMJ osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006, **35**:165-169.
20. 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**:349-352.
21. Herken H, Erdal E, Mutlu N, Barlas O, Cataloluk O, Oz F, GÜray E: Possible association of temporomandibular joint pain and dysfunction with a polymorphism in the serotonin transporter gene. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001, **120**:308-313.
22. Heits A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Hiederer P, Bengel D, Lesch KP: Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 1996, **66**:2621-2624.
23. Landi N, Manfredini D, Lombardi L, Casarosa E, Bosco M: 17-Beta-estradiol and progesterone serum levels in temporomandibular disorder patients. *Minerva Stomatol* 2004, **53**:651-60.
24. Halpern LR, Levine M, Dodson TB: Sexual dimorphism and temporomandibular disorders (TMD). *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2007, **19**:267-77.
25. Warren MP, Fried JL: Temporomandibular disorders and hormones in women. *Cells Tissue Organ* 2001, **169**:187-192.
26. Benjamin J, Osher Y, Kotler M, Gritsenko I, Nemanov I, Belmaker RH, Ebstein RP: Association between tridimensional personality questionnaire (TPQ) traits and three functional polymorphisms: dopamine receptor D4 (DRD4), serotonin transporter promoter region (5-HTTLPR) and catechol O-methyltransferase (COMT). *Mol Psychiatry* 2000, **5**:96-100.
27. Treister R, Pud D, Ebstein RP, Laiba E, Gershoni E, Haddad M, Eisenberg E: Associations between polymorphisms in dopamine neurotransmitter pathway genes and pain response in healthy humans. *Pain* 2009, **147**:187-93.
28. McNeill C, Mohl N, Rugh J, Tanaka T: Temporomandibular disorders: diagnosis management, education, and research. *J Am Dent Assoc* 1990, **120**:253-254.
29. Dworkin SF, LeResche I: Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: review, criteria, examinations and specifications, critique. *J Craniomandib Disord* 1992, **6**:301-55.
30. Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S: A protein salting-out method applied in genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques* 1998, **24**:238-239.
31. Carvalho CM, Pena SD: Optimization of a multiplex minisequencing protocol for population studies and medical genetics. *Genet Mol Res* 2005, **4**:115-125.
32. Wang L, Lu J, An J, Shi Q, Spitz MR, Wei Q: Polymorphisms of cytosolic serine hydroxymethyltransferase and risk of lung cancer: a case-control analysis. *Lung Cancer* 2007, **57**:143-51.
33. De Marco P, Merello E, Galevo MG, Mascelli S, Raso A, Cama A, Capra V: Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G/A polymorphism for neural tube defect risk. *J Hum Genet* 2006, **51**:98-103.
34. Strange RC, Matharoo B, Faulder GC, Jones P, Cotton W, Elder JB, Deakin M: The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the ST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1991, **12**:25-28.
35. Dhilon VS, Shahid H, Husain SA: Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Mol Hum Reprod* 2007, **13**:213-222.
36. Olteanu H, Munson T, Banerjee R: Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry* 2002, **41**:13378-13385.
37. De Luca A, Rizzardi M, Buccino A, Alessandrini R, Salvioli GP, Filogrosso N, Novelli G, Dallapiccola B: Association of dopamine D4 receptor (DRD4) exon III repeat polymorphism with temperament in 3-year-old infants. *Neurogenetics* 2003, **4**:207-212.
38. Wright AR, Gatchel RJ, Wildenstein L, Riggs R, Buschang P, Ellis E: Biopsychosocial differences between high-risk and low-risk patients with acute TMD-related pain. *J Am Dent Assoc* 2004, **135**:474-483.
39. Herbig K, Chiang EP, Lee LR, Hills J, Shane B, Stover DP: Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxymethionine and 5-adenosylmethionine biosyntheses. *J Biol Chem* 2002, **277**:38381-38389.
40. Yamada T, Masuda KF, Atsuta J, Nishijima K, Kido MA, Tanaka T: Oxidative stress-induced DNA damage in the synovial cells of the temporomandibular joint in the rat. *J Dent Res* 2004, **83**:619-624.
41. Sheets DW Jr, Okamoto T, Dijkgraaf LC, Milam SB, Schmitz JP, Zardeneta G: Free radical damage in facsimile synovium: correlation with adhesion formation in osteoarthritic TMJs. *J Prosthodont* 2006, **15**:9-19.
42. Lee MC, Kawai Y, Shoji H, Yoshino F, Miyazaki H, Kato H, Suga M, Kubota E: Evidence of reactive oxygen species generation in synovial fluid from patient with temporomandibular disease by electron spin resonance spectroscopy. *Redox Rep* 2004, **9**:331-336.
43. Torrida M, Ishimaru J, Murayama K, Kajimoto T, Kurachi M, Era S, Shibata T: Intra-articular oxidative state correlated with the pathogenesis of disorders of the temporomandibular joint. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004, **42**:405-409.
44. Milam SB, Zardeneta G, Schmitz JP: Oxidative stress and degenerative temporomandibular joint disease: a proposed hypothesis. *J Oral Maxillofac Surg* 1998, **56**:214-23.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/75/prepub>

doi:10.1186/1471-2350-12-75

Cite this article as: Aneiros-Guerrero et al.: Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes, DRD4 and GSTM1 are related to temporomandibular disorder. *BMC Medical Genetics* 2011 12:75.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

