

Expressão do Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
(TRPA1) e Perfil Imunológico de Pacientes com Disfunção
Temporomandibular

Adriana Quinzeiro e Silva Mouchrek

Adriana Quinzeiro e Silva Mouchrek

Expressão do Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1) e Perfil Imunológico de Pacientes com Disfunção Temporomandibular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia Integrada

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabeth Soares Fernandes
Co-Orientador: Prof^o. Dr. Lídio Lima Neto

São Luís
2016

Nome: Adriana Quinzeiro e Silva Mouchrek

Título: Expressão do Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 (TRPA1) e perfil imunológico de pacientes com disfunção temporomandibular.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Elizabeth Soares Fernandes

Instituição: Universidade CEUMA

Assinatura: _____

Prof^o. Dr: Etevaldo Matos Maia Filho

Instituição: Universidade CEUMA

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Luciana Salles Branco de Almeida

Instituição: Universidade Federal do Maranhão

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu filho Enzo Elias, razão de tudo que faço e a força que me incentiva a prosseguir nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença constante na minha vida e da minha família.

À minha família que esteve sempre ao meu lado ao longo desta jornada.

Ao meu marido José Carlos, pelo incentivo e compreensão pelas horas roubadas do seu convívio.

À minha Orientadora, Prof^a Dr^a Elizabeth Soares Fernandes, pelo apoio incondicional, além do suporte técnico e científico que proporcionou meu crescimento dentro da odontologia.

Ao meu Co-Orientador, Lídio Lima Neto que também participou de maneira fundamental na construção desta dissertação.

À Universidade CEUMA, pela oportunidade inestimável para meu crescimento científico.

Ao Programa de Mestrado em Odontologia, na pessoa do Prof. Dr. Matheus Coelho Bandéca, pelo constante apoio e dedicação para que todos nós, alunos, pudéssemos evoluir constantemente.

A todos os Professores Doutores do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade CEUMA, pelas constantes demonstrações de atenção em nossa caminhada neste Curso.

Ao Domingos Magno, do laboratório de Imunologia da Universidade Ceuma, pelo apoio e pela disponibilidade durante este trabalho.

À Srta. Erymônica Camara, pelo cuidado e carinho no trato com todos os alunos deste curso.

Aos colegas de Mestrado, Débora Mariz, Salma Ivana, Giovana Gritti, Ricardo Coringa, Sâmara Lima, Mônica Barros pela convivência engrandecedora e pelos laços de amizade que nos unem. Também, pelo auxílio e confiança nas nossas tarefas do Mestrado e pelo ensino recebido de cada um.

EPÍGRAFE

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu. ”

Érico Veríssimo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Expressão do TRPA1 em leucócitos circulantes de pacientes com DTM.	38
Figura 2 - Perfil de células CD14+ circulantes em pacientes com DTM.	39
Figura 3 - Níveis salivares de citocinas em pacientes com DTM	40

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	15
<i>Pacientes</i>	15
<i>Coleta e preparo de amostras para quantificação de mediadores inflamatórios</i>	16
<i>Análise de subpopulações de leucócitos periféricos</i>	16
<i>Níveis de citocinas</i>	17
<i>Expressão de TRPA1 em leucócitos do sangue periférico</i>	18
<i>Análise de dados</i>	18
RESULTADOS	19
<i>A expressão do TRPA1 em leucócitos periféricos varia de acordo com a severidade da DTM</i>	19
<i>Aumento na ativação de CD14+ em leucócitos de sangue periférico em pacientes com DTM</i>	19
<i>Pacientes com DTM moderada/severa apresentam número reduzido de células CD4+CD25+CD127^{low} e aumento no número de células CD19+CD69+</i>	20
<i>Os níveis de citocinas diferem conforme severidade de DTM</i>	20
DISCUSSÃO	21
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	42

CAPÍTULO 1

EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 E PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES COM DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

RESUMO

Histórico: As disfunções temporomandibulares (DTMs) afetam os músculos mastigatórios e/ou as articulações podendo acarretar limitação funcional e dor, comprometendo a qualidade de vida do paciente. Estudos recentes em animais têm sugerido a participação do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) na percepção e transmissão de estímulos dolorosos na artrite reumatoide, osteoartrite e dor orofacial. **Objetivos:** Este estudo analisou o perfil imunológico de pacientes com disfunção temporomandibular, bem como a expressão do TRPA1 em leucócitos circulantes. **Métodos:** Foram avaliados os níveis de TRPA1 em leucócitos do sangue periférico e os níveis de seu agonista endógeno (4- HNE) em amostras de saliva e plasma obtidos de pacientes com Disfunção temporomandibular, com diferentes níveis de gravidade (homens e mulheres com 29 anos em média, sistemicamente saudáveis)(N=26), utilizando-se ensaios de imunoabsorção enzimática. Alterações em subpopulações de leucócitos e produção de citocinas foram avaliados por citometria de fluxo. As amostras obtidas dos indivíduos saudáveis foram utilizadas como controle (N=11). **Resultados:** Os dados obtidos indicam que pacientes com DTM leve apresentam maior expressão de TRPA1 em leucócitos circulantes do que pacientes saudáveis. Os leucócitos CD14⁺ obtidos deste mesmo grupo de pacientes apresentaram expressão aumentada de HLA-DR, indicando ativação de monócitos circulantes em comparação a indivíduos saudáveis. Já os pacientes com DTM leve apresentaram aumento marcante nos níveis salivares de TNF α e IL-17 em relação ao grupo controle. Por sua vez, pacientes com DTM moderada/severa apresentaram redução da população circulante de linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) e aumento da ativação de linfócitos B (CD19⁺CD69⁺). **Conclusão:** Este conjunto de dados demonstra que dependendo do grau de severidade da DTM, pacientes apresentam perfil imunológico distinto. Estes dados sugerem ainda, que a expressão de TRPA1 em leucócitos circulantes está relacionada à ativação de monócitos CD14⁺, e a níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com DTM leve, mas não moderada/severa. Neste sentido, é possível que os diferentes perfis encontrados em pacientes com diferentes graus de severidade de DTM, possam afetar a responsividade do paciente à terapia, em diferentes estágios da doença.

Palavras-chave: Disfunção temporomandibular. TRPA1. Leucócitos. Citocinas.

INTRODUÇÃO

A disfunção temporomandibular (DTM) é definida como uma condição patológica que se origina da desarmonia da estrutura e função dos componentes fundamentais do sistema estomatognático (Okeson, 1998). Caracteriza-se por um conjunto de sinais e sintomas que podem incluir ruídos articulares, dor nos músculos da mastigação, limitação dos movimentos mandibulares, dores faciais, dores de cabeça e na articulação temporomandibular (ATM) (Wang et al., 2015).

As DTMs podem ser divididas em distúrbios musculares e distúrbios articulares. Os distúrbios musculares afetam os músculos da mastigação e incluem dor miofacial e trismo. Enquanto que os distúrbios articulares ou intra-articulares englobam os problemas que ocorrem dentro da cápsula, tais como alterações da forma das superfícies articulares por problemas de remodelação das estruturas ou condições adquiridas e deslocamento do disco articular ou seja, malformações e desgastes que comprometem a articulação (Okeson, 1998; Madland et al., 2000; Bonjardim et al., 2009). Ressalta-se que os distúrbios articulares nas DTMs atingem cerca de 8% a 10% da população, sendo os de menor prevalência.

O tratamento da DTM geralmente envolve uma combinação de terapias para redução da dor incluindo tratamento farmacológico, fonoaudiológico, fisioterápico, além de tratamento cirúrgico. Defende-se que o tratamento da DTM deve ser

diferenciado de paciente para paciente, uma vez que esta patologia depende diretamente de fatores estruturais, funcionais e psicológicos inerentes a cada paciente (Mello et al., 2012).

O estudo de diferentes doenças com acometimento articular como artrite reumatoide, osteoartrite e DTM, têm levado à identificação de diferentes mecanismos associados ao desencadeamento e progressão destas patologias; o que vem auxiliando o desenvolvimento de novas terapias para tratá-las. Na clínica, o manejo farmacológico da DTM inclui o emprego de diferentes fármacos combinados ou não, como anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais, relaxantes musculares, opióides, ansiolíticos e antidepressivos (Mello et al., 2012).

Na DTM, a inflamação é uma resposta biológica normal à lesão tecidual que ativa uma resposta imunológica. A liberação de mediadores inflamatórios ativa as células neuronais e não neuronais, incluindo células residentes e células imunes que infiltram tecidos e articulações acometidas (Bautista et al., 2013). Apesar de não existir consenso acerca dos fatores precipitantes das doenças articulares, sabe-se que a intensa interação entre as células inflamatórias e sensoriais, promove o microambiente necessário para o desgaste articular presente na DTM. Durante a inflamação articular, células circulantes (mononucleares e polimorfonucleares) são recrutadas para a articulação, e uma vez neste local, elas liberam mediadores inflamatórios incluindo citocinas como TNF α e IL-1 β (Goeldner,

2011) produtos de estresse oxidativo como H₂O₂ e 4-HNE (Vencovsky et al., 2003; Tymofiyeva et al., 2007; Keeble et al., 2009; Brain, 2011; Chen et al., 2011; Fernandes et al., 2012; Fernandes et al., 2013; Seta et al., 2013), anticorpos (IgA, IgM, IgG e IgE (Solberg et al., 2010; Daha et al., 2011; Vely et al., 2011; Svard et al., 2013) dentre outros, que contribuem ativamente para a destruição tecidual na articulação, incluindo deterioração de cartilagem, perda óssea, acúmulo de líquido sinovial (edema), recrutamento de novas células inflamatórias, e sensibilização de neurônios; no caso da dor orofacial, os trigeminais (Diogenes et al., 2007; Tymofiyeva et al., 2007; Keeble et al., 2009; Rai e Kaur, 2013).

Neste contexto, um papel relevante tem sido atribuído ao receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) expresso em células neuronais e não neuronais, na transmissão nervosa associada à dor articular e inflamação envolvida em patologias como a artrite reumatoide e osteoartrite (Tymofiyeva et al., 2007; Daha et al., 2011; Fernandes et al., 2011; Huang et al., 2012). Ainda, a expressão deste receptor em neurônios do gânglio trigeminal, tem sido implicada na dor orofacial (Diogenes et al., 2007). Entretanto, a maior parte destas evidências têm sido obtidos de estudos pré-clínicos, sendo escassos estudos da relevância deste receptor na doença articular humana, e mais escassos ainda, aqueles que investigam DTM. Estudos demonstraram que pacientes com DTM moderada/severa, mas não aqueles com DTM leve, apresentam

níveis salivares aumentados de 4-HNE, um agonista endógeno do TRPA1; em comparação com indivíduos saudáveis (Klug, 2014).

O presente trabalho comparou o perfil imunológico de pacientes com DTM leve e moderada/severa, com o de indivíduos saudáveis; além da expressão do TRPA1 em leucócitos periféricos. Foi encontrado que a expressão do TRPA1 difere de acordo com a severidade da DTM, e que esta diferença está associada com os diferentes perfis imunológicos encontrados entre os grupos. Sugere-se que os diferentes perfis imunológicos e de expressão de TRPA1 encontrados em pacientes com diferentes graus de severidade de DTM, podem afetar a responsividade do paciente à terapia.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

Amostras de sangue periférico e saliva foram coletadas de indivíduos saudáveis ($n=6$) e pacientes com disfunção temporomandibular diagnosticada com diferentes níveis de severidade ($n=12$), diagnosticados anteriormente conforme análise radiográfica e aplicação de questionário (*Research Diagnostic Criteria/Temporomandibular Dysfunction - RDC/TMD- Eixo I*); e descritos epidemiologicamente conforme estudo realizado por Klug (2014). Conforme delimitação do estudo em questão, foram excluídos indivíduos saudáveis menores de 18 anos, gestantes, pacientes com dentição mista e decídua, pacientes com poliartrite,

com histórico recente de infecções e/ou tenham utilizado drogas anti-inflamatórias, durante pelo menos 15 dias. E como critérios de inclusão, os pacientes com DTM (desordem articular) com alterações leves, moderadas e severas e pacientes saudáveis. O grupo experimental foi composto por 23(vinte e três) mulheres e 3 (três) homens e o grupo controle por 7(sete) homens e 4 (quatro) mulheres, com uma média de idade de 29 anos para ambos os grupos (tabela 3). Destes, 12 foram selecionados para a análise de perfil imunológico e de expressão de TRPA1.

A avaliação clínica foi realizada por um investigador com experiência prática no campo da disfunção temporomandibular e na aplicação do RDC/TMD. Baseado na avaliação clínica e radiográfica, a disfunção temporomandibular foi classificada como leve, moderada ou severa, com alterações articulares (tabela 2). Só participaram deste estudo os pacientes que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 5). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade CEUMA, sob o número 264.629 de 29 de abril de 2013 (Anexo 2). A pesquisa, portanto, tratou-se de um estudo experimental por ensaio clínico transversal.

Coleta e preparo de amostras para quantificação de mediadores inflamatórios

As amostras de sangue periférico (5 ml) foram coletadas por punção venosa, em tubos *vacuntainer* contendo heparina; e o plasma foi obtido por centrifugação (15 min, 2.000 rpm). O *pellet* obtido foi processado para quantificação da expressão de TRPA1.

As amostras de saliva foram coletadas, após higienização bucal, em um tubo falcon de 15 mm de diâmetro que foi inserido na boca do paciente por cinco minutos, e a saliva produzida de forma espontânea foi coletada. As amostras de saliva foram então centrifugadas (10 min, 1,500 rpm) e o sobrenadante foi coletado. As amostras de plasma e saliva foram então armazenadas em freezer à 70°C.

Análise de subpopulações de leucócitos periféricos

Para análise de citometria de fluxo, amostras de sangue periférico (5 ml) coletadas em tubos *vacuntainer* heparinizados foram processadas para lise de hemácias em tampão de lise (*Cell Lysis Buffer*, BD Pharmingen, Brasil). Foram preparadas então, suspensões de células e as mesmas foram coradas com azul de Trypan (Sigma-Aldrich, Brasil) e contadas em câmara de Neubauer, para análise de células viáveis. As células viáveis (5×10^6) foram em seguida lavadas, ressuspensas em tampão de citometria de fluxo ((2% FCS (Invitrogen, Brasil) em PBS (Sigma-Aldrich, Brasil)), e incubadas com anticorpos monoclonais diretamente conjugados (BD Biosciences or eBiosciences, Brasil): anti-CD4 PE-Cy5 (clone RPA-

T4), anti-CD14 FITC (clone 61D3), anti-CD19 FITC (clone HIB19), anti-CD25 PE (clone BC96), anti-CD69 (clone FN50), anti-CD127 FITC (clone eBioRDR5), anti-HLA-DR PE-Cy5 (clone LN3). Para diferenciar células T regulatórias (Tregs) de células T CD4⁺ ativadas, as populações de células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} foram consideradas Tregs e as CD4⁺CD25⁺CD127^{high} consideradas como T CD4⁺ ativadas. Os eventos (número de células) foram adquiridos em BD Accuri C6 (BD Biosciences-Immunocytometry Systems) e analisados no software FlowJo (Tree Star Inc.). Ainda, as populações diferenciais (células polimorfonucleares, monócitos e linfócitos totais) foram identificados baseado em tamanho e granulosidade por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como (%) e como número de células ($\times 10^3$), com exceção da expressão de HLA-DR, a qual foi expressa como mediana de fluorescência.

Níveis de citocinas

Os níveis plasmáticos e salivares de TNF α , IFN γ , IL-4, IL-6, IL-2, IL-10, and IL-17 foram avaliados por citometria de fluxo com o kit *Cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit* (BD Biosciences, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A análise dos dados obtidos foi realizada em BD Accuri C6 (BD Biosciences-Immunocytometry Systems). Os resultados foram calculados no software *CBA FCAP Array* (BD Biosciences, Brazil) e expressos como picogramas por mililitro (pg/ml).

Expressão de TRPA1 em leucócitos do sangue periférico

Analisou-se a expressão de TRPA1 em leucócitos do sangue periférico. Para isto, o pellet resultante da separação do plasma foi submetido à lise de hemácias conforme descrito para citometria de fluxo, e os leucócitos totais foram separados por centrifugação (30 min, 2,000 rpm). Os leucócitos (*pellet*) foram ressuspensos em PBS gelado e sonicadas 4 vezes. O lisado celular foi centrifugado (10 min, 2,000 rpm, 4°C) para remoção de *debris* e o sobrenadante foi coletado e mantido em freezer -70°C para análise futura. No dia do ensaio, as amostras foram descongeladas e analisadas através de kit comercial de elisa, de acordo com as instruções do fabricante (Cloud-Clone Corp, TX, EUA). Os resultados foram expressos como nanogramas de TRPA1 por miligrama de proteína em cada amostra (mg de proteína).

Análise de dados

Os resultados encontram-se representados como média \pm desvio padrão (SE). Os dados obtidos foram avaliados quanto à distribuição normal através do teste Shapiro-Wilks. As comparações estatísticas dos dados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de 1-via, seguida de teste de Bonferroni para comparações múltiplas, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EUA). Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS

A expressão do TRPA1 em leucócitos periféricos varia de acordo com a severidade da DTM

A expressão de TRPA1 em leucócitos circulantes foi avaliada em indivíduos sadios e pacientes com DTM. A Fig. 1 demonstra que leucócitos circulantes de pacientes com DTM leve apresentam níveis aumentados de TRPA1 (1,8 vezes; $p < 0,05$) quando comparados com indivíduos sadios. Por outro lado, indivíduos sadios e pacientes com DTM moderada/severa apresentam níveis semelhantes desta proteína nos leucócitos circulantes.

Aumento na ativação de CD14+ em leucócitos de sangue periférico em pacientes com DTM

O marcador CD14⁺ é altamente expresso em monócitos e portanto, largamente utilizado como marcador para estas células (Seta et al., 2013). A Fig. 2a demonstra o número de leucócitos CD14⁺ circulantes em indivíduos sadios e pacientes com DTM. Como observado, pacientes com DTM apresentam significativamente ($p < 0,05$) menos leucócitos CD14⁺ independente da severidade da doença, quando comparados com indivíduos sadios. Pacientes com DTM leve e moderada/severa apresentaram uma redução de $47,2 \pm 6,4\%$ e $57,4 \pm 9,6\%$ no número de células

CD14⁺, respectivamente, em relação ao grupo controle. A expressão de HLA-DR, utilizado como marcador de ativação de células CD14⁺, demonstrou-se elevada em pacientes com DTM leve (1,7 vezes; $p < 0,05$), mas não em pacientes com DTM moderada/severa em comparação com amostras obtidas de indivíduos sadios (Fig. 2b).

Pacientes com DTM moderada/severa apresentam número reduzido de células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} e aumento no número de células CD19⁺CD69⁺

Não foram observadas diferenças no número de células CD4⁺, entre os grupos avaliados. Similarmente, os grupos analisados apresentaram números semelhantes de células CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{high} e CD19⁺. Entretanto, observou-se uma redução marcante ($51,6 \pm 8,7$; $p < 0,05$) no número de células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} em amostras obtidas de pacientes com DTM moderada/severa quando comparadas às obtidas de indivíduos sadios. Ainda, pacientes com DTM moderada/severa apresentaram aumento significativo no número de células CD19⁺CD69⁺ (1,7 vezes; $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. Por outro lado, pacientes com DTM leve exibiram números similares de células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} e CD19⁺CD69⁺ aos observados em indivíduos sadios (Tabela 1).

Os níveis de citocinas diferem conforme severidade de DTM

Os níveis de citocinas foram avaliados em amostras de plasma e saliva obtidas de indivíduos saudáveis e pacientes com DTM leve e DTM moderada/severa. Os resultados da Fig. 3 demonstram os níveis salivares de TNF α e IL-17, respectivamente. Ambas as citocinas apresentaram-se elevadas significativamente ($p < 0,05$) em pacientes com DTM leve em comparação aos níveis salivares detectados em indivíduos saudáveis. Este aumento foi de 14,7 e 54,9 vezes, para TNF α (Fig. 3a) e IL-17 (Fig. 3b), respectivamente. Nenhuma das amostras de saliva analisadas apresentou níveis detectáveis de IFN γ , IL-4, IL-6, IL-2 e IL-10. Da mesma forma, nenhuma das citocinas foi detectada em amostras de plasma de nenhum dos grupos avaliados.

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou um aumento dos níveis de TRPA1 em pacientes com DTM leve e não em pacientes com DTM moderada-severa, em relação ao grupo controle. Este receptor é expresso em terminais nervosos (Kosmaczewska, 2014), conhecido por mediar uma série de processos inflamatórios e dolorosos (Fernandes et al., 2013; Kosmaczewska, 2014). Estudos que venham a identificar a participação deste receptor no estabelecimento e progressão da DTM são de extrema relevância. Recentemente, foi sugerido que o TRPA1 está envolvido nos processos algícos articulares, sensibilidade local e atividade reflexa

da musculatura da mastigação (Viatte et al., 2015), no entanto, sua real relevância para a progressão da DTM ainda permanece por ser elucidada. Na maioria das espécies, O TRPA1 funciona principalmente como um sensor químico, expresso em tecidos neuronais e não neuronais e a compreensão do potencial farmacológico e possibilidades de modulação deste receptor oferece perspectivas importantes para o tratamento de diversas doenças que apresentam um quadro de dor, como as doenças articulares e neste caso a dor orofacial (Honey et al., 2012).

Avaliou-se o perfil imunológico de pacientes com diferentes graus de severidade de DTM em relação aos indivíduos saudáveis. Observou-se que os pacientes com DTM leve e moderada/severa apresentam número de monócitos CD14⁺ reduzidos em relação aos pacientes saudáveis. Entretanto, monócitos CD14⁺ obtidos de pacientes com DTM leve apresentaram maior expressão de HLA-DR, sugerindo maior ativação destas células neste grupo de pacientes em comparação à indivíduos saudáveis e pacientes com DTM moderada/severa. A expressão de HLA-DR está associada à apresentação de antígenos e subsequente ativação de linfócitos. Ainda, este marcador está associado à proliferação celular e produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a uma ativação do sistema imune. Evidências sugerem que células que expressam altos níveis de HLA-DR em sua superfície estão ativamente envolvidas em doenças de imunorregulação

desordenada, incluindo a DTM. De fato, em pacientes com DTM, o *locus* de HLA-DR, está associado com maior susceptibilidade à doença, com a gravidade radiológica e com a responsividade ao tratamento (Viatte et al., 2015).

De forma interessante, a expressão de TRPA1 em leucócitos circulantes demonstrou padrão semelhante à ativação de células CD14⁺; i.e., apenas pacientes com DTM leve apresentaram aumento significativo na expressão de TRPA1 em células do sangue periférico. Estes dados sugerem a expressão de TRPA1 em células imunes do sangue periférico de pacientes com DTM ocorra de forma predominante em monócitos.

A expressão funcional de TRPA1 em monócitos humanos foi recentemente demonstrada por Billeter et al., (2015). O mesmo estudo sugeriu que a expressão de TRPA1 em monócitos é capaz de modular a produção de citocinas como TNF α e IL-10 durante a inflamação. Em um estudo recente, Bell et al. (2014) demonstraram que linfócitos circulantes obtidos de indivíduos com menor sensibilidade aos estímulos dolorosos apresentam maior expressão de TRPA1 e baixa metilação deste gene do que indivíduos com níveis menores de dor.

Embora o presente estudo não tenha observado diferenças que permitam sugerir a relevância da expressão do TRPA1 em linfócitos para a severidade da DTM, ressalta-se que

avaliou-se somente a expressão deste receptor em células circulantes.

Assim, não se pode descartar a hipótese de que linfócitos presentes na articulação temporomandibular de pacientes com DTM apresentem aumento na expressão de TRPA1 em comparação com indivíduos saudáveis. Ainda, é possível que pacientes com DTM moderada/severa apresentem maior número de células CD14⁺ ativadas na articulação e que isto também esteja relacionado a aumento da expressão de TRPA1 nestas células.

Investigou-se também, o perfil de linfócitos em pacientes com DTM e indivíduos saudáveis. Apenas pacientes com DTM moderada/severa apresentaram diferenças significativas nas populações de linfócitos quando comparados aos indivíduos saudáveis. Pacientes com DTM moderada/severa apresentaram redução no número de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) e aumento significativo no número de linfócitos B ativados, indicado pelo número de células CD19⁺CD69⁺. As células T regulatórias são um subconjunto de células T as quais estão envolvidas na tolerância imunológica periférica, suprimindo as células T auto-reativas. Estudos em pacientes com doença articular, como pacientes com artrite reumatoide, têm apresentado resultados conflitantes em relação ao número de células T regulatórias.

Embora exista consenso de que o número de células T regulatória esteja aumentado na articulação de pacientes com

doença articular em relação a indivíduos saudáveis e que isto está associado com piora na severidade da inflamação articular; diferentes resultados têm sido obtidos quando avaliando-se a população destas células no sangue periférico de pacientes com doença articular. De fato, estudos têm relatado aumento, redução e até mesmo nenhuma alteração nestas células quando comparado a indivíduos saudáveis. Estas discrepâncias podem estar relacionadas aos diferentes marcadores utilizados para o estudo destas células em pacientes, como por exemplo CD25, CD127, FoxP3 (Alunno et al., 2015).

Embora alterações no número de células T regulatórias estejam diretamente relacionadas ao número de células T efetoras (Nie et al., 2013; Wang et al., 2015), o presente trabalho demonstrou que pacientes com DTM apresentam número similares de células CD4⁺ e CD4⁺CD25⁺CD127^{high} circulantes (células T efetoras) às de indivíduos saudáveis. Um estudo com marcadores de ativação em células T CD4⁺ de pacientes artríticos, demonstraram que estas células apresentam maior grau de ativação e proliferação em comparação com pacientes com a doença em estágio avançados, e que isto pode ser explicado pelo fato das células TCD4⁺ sofrerem esgotamento conforme a doença progride, resultado de uma perda na capacidade proliferativa destas células (Kosmaczewska, 2014). Não se pode descartar, entretanto, a existência de possíveis

diferenças entre indivíduos saudáveis e pacientes com DTM ao nível articular, que poderiam estar ocorrendo no presente estudo.

A ativação de células CD14⁺ e linfócitos CD4⁺ está diretamente associada à produção de mediadores inflamatórios como citocinas e produtos de estresse oxidativo. Aqui, demonstrou-se que embora não tenham sido possíveis a detecção de citocinas plasmáticas, observou-se um aumento significativo nos níveis salivares de TNF α e IL-17. TNF α é uma citocina pró-inflamatória extremamente relevante à progressão da doença articular (Blache, 2011; Elshabrawy, 2015) regulando as alterações inflamatórias e nociceptivas relacionadas à patologia (Blache, 2011; Elshabrawy, 2015).

Estudos realizados em pacientes com doença articular demonstram ainda que embora não existam relatos de que a IL-17 seja relevante para a DTM, estudos em humanos indicam que a IL-17 encontra-se aumentada normalmente em pacientes com estágios avançados de doença articular, tanto a nível salivar quanto plasmático (Svard et al., 2013), podendo esta citocina assim como o TNF α , ser produzida tanto por células CD4⁺ quanto CD14⁺ (Seta et al., 2013).

Aqui, apresentou-se pela primeira vez, que pacientes com DTM leve apresentam níveis salivares aumentados de TNF α e IL-17, sem que estas citocinas pudessem ser detectadas em amostras de plasma. Por outro lado, ambas as citocinas são comumente

detectadas em níveis substanciais em pacientes com artrite reumatóide (Wang et al., 2015). A ausência de detecção destas citocinas no plasma em pacientes com DTM pode estar relacionada ao fato de que neste caso ocorre um processo inflamatório mais localizado do que em pacientes com artrite reumatoide, aonde diferentes articulações estão acometidas ao mesmo tempo (Diogenes et al., 2007).

De forma interessante, somente pacientes com DTM leve apresentaram níveis aumentados destas citocinas, o que pode estar relacionado ao nível de ativação de células CD14⁺ ativadas e à expressão de receptor TRPA1 nestas células. Sugere-se então que em pacientes com DTM leve, os monócitos sejam os principais produtores de tais mediadores. Por outro lado, em um estudo realizado por Klug (2014), a análise de amostras de saliva demonstrou que pacientes com DTM moderada/severa apresentam níveis elevados de 4-HNE (agonista endógeno do TRPA1) quando comparados ao grupo controle e pacientes com DTM leve. Esses dados sugerem um perfil imunológico e inflamatório distinto para diferentes estágios de evolução da DTM.

Ainda, detectou-se aumento no número de linfócitos B circulantes ativados (CD19⁺CD69⁺) em pacientes com DTM moderada/severa. A participação de linfócitos B na doença articular vem sendo extensamente estudada. De fato, este grupo de células é ativado conforme a doença articular progride e após sofrer ativação,

é responsável pela produção de diferentes anticorpos auto-reativos que contribuem de forma essencial para a destruição articular (McGaraughty et al., 2010). A quantificação de anticorpos autoreativos como o fator reumatoide (RF) e anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP), vêm sendo utilizados clinicamente como indicadores de doença articular ativa (Mota, 2011; Venables e Maini, 2012; Brasil, 2013; Adlowitz, 2015).

Os resultados do presente trabalho, ao relacionarem as células imunes circulantes e a expressão de TRPA1, demonstraram que os neurônios nociceptores apresentam muitas vezes as mesmas vias de reconhecimento de “perigo” que as células do sistema imune e normalmente em resposta a este “perigo”, o sistema nervoso periférico, comunica-se diretamente com as células do sistema imune, formando um mecanismo de proteção integrado. A rede de inervação densa de fibras sensoriais e autonômicas em tecidos periféricos permite a rápida modulação neurogênica local e ativação do sistema imune. Além disso, os neurônios periféricos também parecem estar envolvidos na disfunção imune encontrada na DTM (Choy, 2012).

Sendo assim, entender como este sistema imune pode modular ou pode ser modulado por receptores como TRPA1 encontrado nestes neurônios, pode ser de muita contribuição no entendimento e no tratamento de doenças como a disfunção

temporomandibular, uma vez que a análise da expressão deste receptor pode auxiliar na busca pelo diagnóstico da doença.

Por fim, os dados do presente trabalho mostraram que, dependendo da gravidade da disfunção da ATM, os pacientes podem apresentar um perfil imunológico distinto. Os pacientes com DTM leve apresentaram também, maior ativação de células CD14 +, com um aumento da expressão de TRPA1 nestas células e os níveis salivares mais elevados de TNF α e IL-17 circulantes. Além disso, os pacientes com disfunção moderada / severa apresentaram níveis salivares superiores de 4-HNE, com níveis inferiores de células Tregs circulantes e aumento da ativação de células circulantes CD19+. Estas alterações podem refletir na capacidade de resposta ao tratamento da doença, em seus diferentes estágios.

Agradecimentos

Agradecemos apoio financeiro da CAPES, FAPEMA e do CNPq, para realização de parte desta pesquisa. Também, ao Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos (FAHESA/ITPAC), por ceder suas dependências para realização dos exames clínicos e controle dos pacientes participantes deste estudo.

Author contributions

R. J. Klug, M. A. G. Grisotto, V. Monteiro-Neto, M. N. Muscará, J. B. Calixto e E. S. Fernandes contribuíram para a

concepção, design, aquisição de dados, análise e interpretação, elaboração e crítica na revisão do manuscrito; A. Q. S. Mouchrek, S. J. F. Mendes, B. L. R. da Silva, I. C. de Paiva, A. P. S. F. Lamha e L. S. Branco de Almeida contribuíram para aquisição e análise de dados e crítica na revisão do manuscrito. Todos os autores deram a aprovação final e concordam em serem responsáveis por todos os aspectos do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Adlowitz, D. G. (2015). Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *J Thorac Dis* **7**,471-477.
- Alunno, A., Manetti, M., Caterbi, S., Ibbá-Manneschi, L., Bistoni, O., Bartoloni, E., Valentini, V., Terenzi, R., Gerli, R. (2015). Altered Immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory t cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications. *Mediators Inflamm* **2015**,1-12.
- Bautista, D. M., Pellegrino, M., Tsunozaki, M. (2013). TRPA1: a gatekeeper for inflammation. *Annu Rev Physiol* **75**, 181-200.
- Bell, J. T., Loomis, A. K., Butcher, L. M., Gao, F., Zhang, B., Hyde, C. L., Sun, J., Wu, H., Ward, K., Harris, J., Scollen, S., Davies, M. N., Schalkwyk, L. C., Mill, J., MuTHER Consortium, Williams, F. M., Li, N., Deloukas, P., Beck, S., McMahon, S. B., Wang, J., John, S L., Spector, T. D. (2014). Differential methylation of the TRPA1 promoter in pain sensitivity. *Nat Commun* **5**,2978.
- Billeter, A. D., Norman, G., Walker, S., Lawson, C., Gardner, S. A., Harshini, S., Galandiuk, S., Hiram, C. P. (2015). TRPA1 mediates the effects of hypothermia on the monocyte inflammatory response. 10th Annual Academic Surgical Congress; 3-5 February, 2015; Las Vegas, Nevada, United States.
- Blache, C. (2011). Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4+CD25^{hi} regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. *Rheumatology*, **50**,1814-1822.

- Bonjardim, L. R., Silva, A. P., Gameiro, G. H., Tambeli, C. H., Veiga, M. C. F. A. (2009). Nociceptive behaviour induced by mustar oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and central opioid analgesic. *Pharmac Biochem Behaviour* **91**,321-326.
- Brain,S. D. (2011). TRPV1 and TRPA1 channels in inflammatory pain: elucidating mechanisms. *Ann New York Acad Sci* **1245**,36-37.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2013). *Portaria nº 710*, de 27 de junho de 2013. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. Brasília: Ministério da Saúde.
- Chen, J., Joshi, S. K., DiDomenico, S., Perner, R. J., Mikusa, J. P., Gauvin D. M., Segreti, J. A., Han, P., Zhang, X. F., Niforatos, W., Bianchi, B. R., Backer, S. J., Zhong, C., Simler, G. H., MacDonald, H. A., Schimidt, R. G., MacGarauthy, S. P., Chu, K. L., Faltynek, C. R., Kort, M. E., Reilly, R. M., Kym, P. R. (2011). Seletive blockade of TRPA1 channel attenuates pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain* **152**,1165-1172.
- Choy, E. (2012). Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **51**,v3-v11.
- Daha, N. A., Banda, N. K., Roos, A., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Daha, M. R., Trow, R. A. (2011). Complement activation by (auto-) antibodies. *Mol Immunobiol* **48**, 1656-1665.

- Diogenes, A., Akopian, A. N., Hargreaves, K. M. (2007). NGF up-regulates TRPA1: Implications for orofacial pain. *J Dent Res* **86**,550-555.
- Elshabrawy, H. A. (2015). The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis* **18**,433-448.
- Fernandes, E. S., Awal, S., Karadaghi, R., Brain, S. D. (2013). TRP receptors in arthritis, gaining knowledge for translation from experimental models. *Open Pain J* **6**, 50-61.
- Fernandes, E. S., Fernandes, M. A., Keeble, J. E. (2012). The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol* **166**, 510-521.
- Fernandes, E. S., Russell, F. A., Spina, D., Mcdougall, J. J., Graepel, R., Gentry, C., Staniland, A. A., Mountford, D. M., Keeble, J. E., Malcangio, M., Bevan, S., Brain, S. D. (2011). A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. *Arthritis Rheum* **63**, 819-829.
- Goeldner, T. L. (2011). Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies with extra-articular manifestations, gender, and tabagism in rheumatoid arthritis patients from southern Brazil. *Clin Rheumatol* **30**,975-980.
- Honey, O. B., Scarfe, W. C., Hilgers, M. J., Klueber, K., Silveira, A. M., Haskell, A. S., Farman, A. G. (2007). Accuracy of cone beam computed tomography imaging of the temporomandibular joint:

- comparison with panoramic radiology and linear tomography. *Am J Orthod Dentofac Orthoped* **132**, 429-438.
- Huang, D., Li, S., Dhaka, A., Story, G. M., Cao, Y. Q. (2012). Expression of transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Molec Pain* **8**,1-19.
- Keeble, J. E., Bodkin, J. V., Liang, L., Wadorski, R., Davies, M., Fernandes, E. S., Coelho, C. F., Russel, F., Graepel, R., Muscara, N. M., Malcangio, M., Brain, S. D. (2009). Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain* **141**, 135-142.
- Klug, R. J. (2014). *Serum and salivary levels of 4-HNE, IG A and Cortisol in patients with temporomandibular joint disorders: a clinical study.* (São Luís: CEUMA University).
- Kosmaczewska, A. (2014). Alterations in Both the Activatory and Inhibitory Potential of Peripheral Blood CD4+ T Cells in Rheumatoid Arthritis Patients Correlate with Disease Progression. *Pathol Oncol Res* **20** 235-243.
- Madland, G.,Feinman, C., Newman, S. (2000). Factors associated with anxiety and depression in facial arthromyalgia. *Pain* **84**,225-232.
- McGarughty, S., Chu, K. L., Perner, R. J., Didomenico, S., Kort, M. E., Kym, P. R. (2010).TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Mol Pain* **6**, 14.

- Mello, C. E. B., Oliveira, J. L. G., Jesus, A. C. F., Maia, M. L. M., Santana, J. C. V., Andrade, L. S. O., Quintans, J. S. S., Quintans Júnior, L. J., Conti, P. C. R., Bonjardim, L. R. (2012). Temporomandibular disorders in headache patients. *Med Oral Patol Oral Ciru Bucal* **17**e,1042-e1046.
- Moran, M. M., McAlexander, M. A., Bíró, T., Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 601-620.
- Mota, L. M. H. (2011). Autoantibodies in early rheumatoid arthritis: Brasilia cohort: results of a three-year serial analysis. *Rev Bras Reumatol* **51**,564-571.
- Nie, H., Zheng, Y., Li, R., Guo, T. B., He, D., Fang, L., Liu, X., Xiao, L., Chen, X., Wan, B., Chin, Y. E, Zhang, J. Z.(2013). Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat Med* **19**, 322-328.
- Okeson, J. P. (1998). *Management of temporomandibular disorders and occlusion*.(St. Louis: Mosby).
- Paoliello-Paschoalato, A. B. (2015). Fc γ and complement receptors and complement proteins in neutrophil activation in rheumatoid arthritis: contribution to pathogenesis and progression and modulation by natural products. *Evid Based Complement Alternat Med* **2015**,429878.
- Rai, B., Kaur, J. (2013). Association between stress, sleep quality and temporomandibular joint dysfunction: simulated mars mission. *Oman Med J* **28**,216-219.

- Seta, N., Okazaki, Y., Miyazaki, H., Kato, T., Kuwana, M. (2013). Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 is required for the transformation of circulating monocytes into multipotential cells. *PloS One* **8**,e74246.
- Solberg Nes, L., Carlson, C. R., Crofford, L. J., Leeuw, R., Segerstrom, S. C. (2010). Self-regulatory deficits in fibromyalgia and temporomandibular disorders. *Pain* **151**, 37-44.
- Svard, A., Kastbom, A., Sommarin, Y., Skogh, T. (2013). Salivary IgA antibodies to citrullinated peptides (CCP) in rheumatoid arthritis. *Immunobiol* **218**,232-237.
- Tymofiyeva, O., Proff, P., Richter, E. J., Jakob, P., Fanghänel, J., Gedrange, T., Rottner, K. (2007). Correlation of MRT imaging with real-timeaxiography of TMJ cliks. *Ann Anatomy* **189**, 356-361.
- Vely, A. N., Look, J. O., Carlson, C., Lenton, P. A, Kang, W., Holcroft, C. A., Friction, J. R. (2011). The effect of catastrophizing and depression on chronic pain – a prospective cohort study of temporomandibular muscle and joint pain disorders. *Pain* **152**,2377-2383.
- Venables, P., Maini, R. (2012). *Clinical features of rheumatoid arthritis*. (Waltham: UpToDate). Available <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-rheumatoid-arthritis> (accessed 10 set 2015).
- Vencovsky, J., Machacek, S., Sedova, L., Kafkova, J., Gatterová, J., Pesakova, V., Ruszikova, S. (2003). Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **62**, 427-430.

Viatte, S., Plant, D., Han, B., Fu, B., Yarwood, A., Thomson, W., Symmons, D. P., Worthington, J., Young, A., Hyrich, K. L., Morgan, A. W. 8., Wilson, A. G., Isaacs, J. D., Raychaudhuri, S., & Barton A. (2015). Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response, *JAMA* **313**, 1645-1656.

Wang, T., Li, J., Jin, Z., Wu, F., Li, Y., Wang, X., Zhou, H., Zhou, Q. (2015). Dynamic frequency of blood CD4+CD25+ Regulatory T Cells in rats with collagen-induced arthritis. *Korean J Physiol Pharmacol* **19**,83-88.

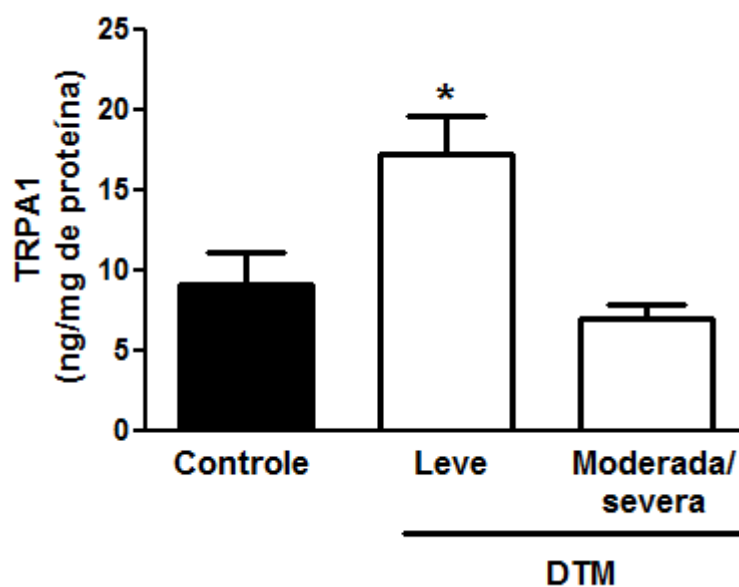


Figura 1 Expressão do TRPA1 em leucócitos circulantes de pacientes com DTM. Os níveis de expressão protéica de TRPA1 foram quantificados em leucócitos circulantes obtidos de pacientes com DTM leve (n=6) e DTM moderada/severa (n=6). Amostras obtidas de indivíduos saudáveis foram utilizadas como controle. Os dados são expressos em média \pm SEM. *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

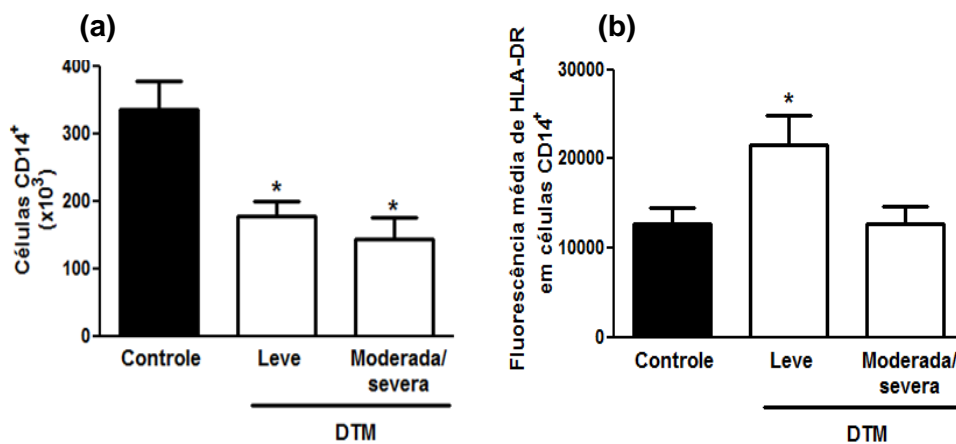


Figura 2 Perfil de células CD14⁺ circulantes em pacientes com DTM. (a) Número e (b) ativação de leucócitos CD14⁺ circulantes obtidos de pacientes com DTM leve (n=6) e DTM moderada/severa (n=6). Amostras obtidas de indivíduos saudáveis foram utilizadas como controle. Os dados são expressos em média ± SEM. *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

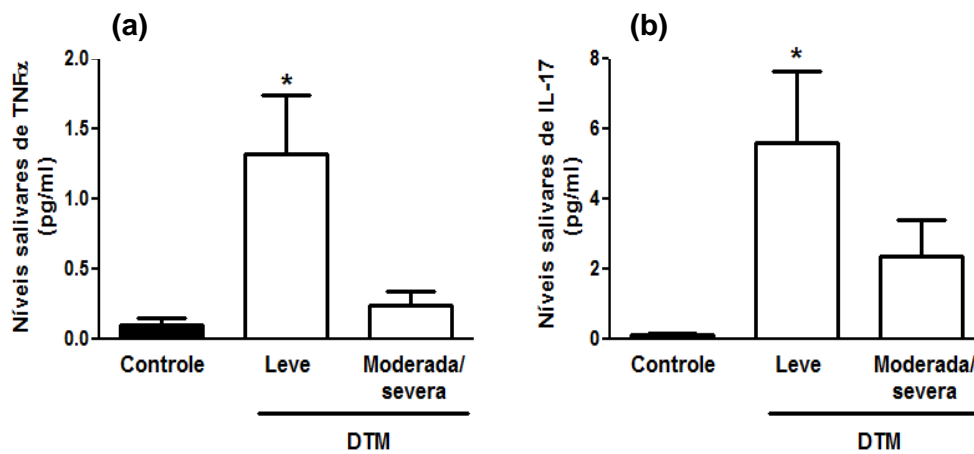


Figura 3 Níveis salivares de citocinas em pacientes com DTM. Níveis de (a) TNF α e (b) IL-17 em amostras de saliva obtidas de pacientes com DTM leve (n=6) e DTM moderada/severa (n=6). Amostras obtidas de indivíduos sadios foram utilizadas como controle. Os dados são expressos em média \pm SEM. *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

Tabela 1 Perfil de ativação no sangue periférico de linfócitos T e B em pacientes com Disfunção Temporomandibular

População Celular (x10³)	Pacientes Sadios	Pacientes com DTM leve	Pacientes com DTM moderada severa
CD4⁺	1282.0±257.6	1649.0±233.2	1523.0±160.8
CD4⁺CD69⁺	94.4 ± 13.5	110.3 ± 18.3	88.5 ± 16.4
CD4⁺CD25⁺CD127^{high}	159.3 ± 33.0	244.5 ± 42.0	207.5 ± 25.2
CD4⁺CD25⁺CD127^{low}	152.9 ± 33.6	115.5± 14.2	74.0 ± 13.3 *
CD19⁺	291.4 ± 46.6	264.9 ± 53.7	287.3 ± 28.7
CD19⁺CD69⁺	19.5 ± 3.0	24.1± 3.6	33.4 ± 4.6 *

Células CD4⁺CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{high}, CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, CD19⁺e CD19⁺CD69⁺ foram isoladas a partir de amostras de sangue periférico obtidas de pacientes com Disfunção temporomandibular leve (n= 6) e moderada/severa (n = 6) em comparação com indivíduos sadios. Os dados são expressos em média ± SEM. *p < 0,05 comparado com o grupo controle.

Tabela 2. Classificação das DTM de acordo com o grau de severidade apresentado, de acordo com o estudo de Klug (2014):

	<i>DTM LEVE</i>	<i>DTM MODERADA</i>	<i>DTM SEVERA</i>
<i>Dor muscular</i>	+	-/+	+
<i>Abertura bucal máxima diminuída</i>	-	-/+	++
<i>Abertura bucal passiva diminuída e com dor</i>	-	+	++
<i>Estalidos na ATM</i>	-/+	+	-/+
<i>Crepitação na ATM</i>	-	-	+ / ++
<i>Dor a palpação da ATM</i>	-	+	++
<i>Dificuldade mastigatória</i>	-	+	++
<i>Dificuldade na mobilidade mandibular</i>	-	+	++

Simbologia: (-) situação ausente; (-/+) situação que pode estar presente ou ausente, não sendo determinante para a classificação; (+) situação presente; (++) situação presente e marcadamente alterada, sendo importante para a determinação da classificação.

Tabela 3. Distribuição de frequência nos grupos de pacientes controle e com DTM, de acordo com estudo de Klug (2014):

	Grupo Experimental	%	Grupo Controle	%
Homens	3	11,54	7	63,64
Mulheres	23	88,46	4	36,36
Idade – média (± DP)	28,41 (±9,48)	-	29,81 (±8,4)	

Frequência relativa de distribuição amostral referente ao sexo e idade dos grupos de pacientes controles e com DTM

ANEXOS

1. Metodologia Detalhada

1.1 Pacientes

Amostras de sangue periférico e saliva foram coletadas de indivíduos sadios ($n=11$) e pacientes com disfunção temporomandibular diagnosticada com diferentes níveis de severidade ($n=26$). Os critérios de exclusão adotados foram idade menor do que 18 anos (devido a características do *Research Diagnostic Criteria/Temporomandibular Dysfunction - RDC/TMD*; o qual se demonstra confiável quando avaliado em populações adultas) e gravidez, pacientes com dentição mista e decídua, pacientes com poliartrite, e histórico recente de infecções e/ou tenham utilizado drogas anti-inflamatórias. A severidade da doença foi confirmada através de análise radiográfica, além de avaliação pelo questionário RDC/TMD. A avaliação clínica foi realizada por um investigador com anos de experiência prática no campo da disfunção temporo-mandibular e com experiência na aplicação do RDC/TMD. Baseado na avaliação clínica, a disfunção temporomandibular foi classificada como leve, moderada ou severa. O intervalo de movimento das articulações temporomandibulares foi avaliado em todos os grupos experimentais como indicativo de função articular. Três medidas foram registradas para cada indivíduo (abertura bucal passiva com e sem dor, e abertura bucal máxima) e os resultados

foram expressos como intervalo de movimento em milímetros (mm). Todas as amostras foram obtidas com consentimento do paciente, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo1) de acordo com aprovação pelo Comitê de Ética em Humanos da Universidade CEUMA sob o número 264.629 de 29 de abril de 2013 (Anexo 2).

2.2 Coleta e preparo de amostras para quantificação de mediadores inflamatórios

As amostras de sangue periférico (5 ml) foram coletadas por punção venosa, em tubos *vacutainer* contendo heparina; e o plasma foi obtido por centrifugação (15 min, 2.000 rpm). O *pellet* obtido foi processado para quantificação da expressão de TRPA1, em metodologia em seção posterior.

As amostras de saliva foram coletadas por 5 min. Para isto, após higienização bucal, um tubo falcon (foto 1) de 15 mm de diâmetro foi inserido na boca do paciente, e a saliva produzida de forma espontânea foi coletada. As amostras de saliva foram então centrifugadas (10 min, 1,500 rpm) e o sobrenadante foi coletado. As amostras de plasma e saliva foram então armazenadas para em freezer-70°C para análise posterior.

Foto 1 - Tubo Falcon para coleta de saliva



1.3 Citometria de fluxo

Para análise de citometria de fluxo, amostras de sangue periférico (5 ml) coletadas em tubos *vacuntainer* heparinizados foram processadas para lise de hemácias em tampão de lise (*Cell Lysis Buffer*, BD Pharmingen, Brasil). Foram preparadas então, suspensões de células e as mesmas foram coradas com azul de Trypan (Sigma-Aldrich, Brasil) e contadas em câmara de Neubauer, para análise de células viáveis. As células viáveis (5×10^6) foram em seguida lavadas, ressuspensas em tampão de citometria de fluxo ((2% FCS (Invitrogen, Brasil) em PBS (Sigma-Aldrich, Brasil)), e

incubadas com anticorpos monoclonais diretamente conjugados (BD Biosciences or eBiosciences, Brasil): anti-CD4 PE-Cy5 (clone RPA-T4), anti-CD14 FITC (clone 61D3), anti-CD19 FITC (clone HIB19), anti-CD25 PE (clone BC96), anti-CD69 (clone FN50), anti-CD127 FITC (clone eBioRDR5), anti-HLA-DR PE-Cy5 (clone LN3). Para diferenciar células T regulatórias (Tregs) de células T CD4⁺ ativadas, as populações de células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} foram consideradas Tregs e as CD4⁺CD25⁺CD127^{high} consideradas como T CD4⁺ ativadas. Os eventos (número de células) foram adquiridos em BD Accuri C6 (BD Biosciences-Immunocytometry Systems) e analisados no software FlowJo (Tree Star Inc.). Ainda, as populações diferenciais (células polimorfonucleares, monócitos e linfócitos totais) foram identificados baseado em tamanho e granulosidade por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como (%) e como número de células ($\times 10^3$), com exceção da expressão de HLA-DR, a qual foi expressa como mediana de fluorescência.

1.4 Níveis de citocinas

Os níveis plasmáticos e salivares de TNF α , IFN γ , IL-4, IL-6, IL-2, IL-10, and IL-17 foram avaliados por citometria de fluxo com o kit *Cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit* (BD Biosciences, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante (foto 2). A análise dos dados obtidos foi realizada em BD Accuri C6

(BD Biosciences-Immunocytometry Systems). Os resultados foram calculados no software *CBA FCAP Array* (BD Biosciences, Brazil) e expressos como picogramas por mililitro (pg/ml).

Foto 2 – Dosagem de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA)



1.5 Expressão de TRPA1 leucócitos do sangue periférico

Analisou-se a expressão de TRPA1 em leucócitos do sangue periférico. Para isto, o pellet resultante da separação do plasma foi submetido à lise de hemácias conforme descrito para citometria de fluxo, e os leucócitos totais foram separados por centrifugação (30 min, 2,000 rpm). Os leucócitos (*pellet*) foram ressuspensos em PBS gelado e sonicadas 4 vezes. O lisado celular foi centrifugado (10 min, 2,000 rpm, 4°C) para remoção de *debris* e o sobrenadante foi coletado e mantido em freezer -70°C para análise futura. No dia do ensaio, as amostras foram descongeladas e analisadas através de kit comercial de elisa (fotos 3 e 4), de acordo

com as instruções do fabricante (Cloud-Clone Corp, TX, EUA). Os resultados foram expressos como nanogramas de TRPA1 por miligrama de proteína em cada amostra (ng/ml).

Foto 3 – Placas para leitura no Elisa

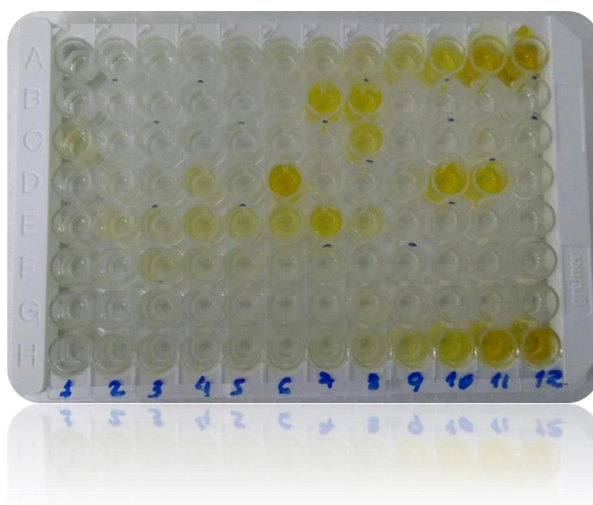


Foto 4 – Leitor do Elisa



1.6 Análise de dados

Os resultados encontram-se representados como média \pm desvio padrão (SE). As comparações estatísticas dos dados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de 1-via, seguida de teste de Bonferroni, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EUA). Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significantes.

2. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Da Universidade Ceuma



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlação da Severidade da Disfunção Temporomandibular com a Expressão do Receptor TRPA1 e seu Agonista 4-HNE

Pesquisador: Elizabeth Fernandes

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 10919213.1.1001.5084

Instituição Proponente: Centro Universitário do Maranhão - Uniceuma

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 264.629

Data da Relatoria: 29/04/2013

Apresentação do Projeto:

trata-se de pesquisa experimental a realizar-se na Universidade de Araguaína-TO, a ser apresentada como dissertação de mestrado do programa de pós-graduação em Odontologia desta IES.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão do receptor TRPA1 e seu agonista endógeno 4-HNE no plasma e saliva de pacientes com disfunção temporomandibular.

Objetivo Secundário:

Analisar os achados das Ressonâncias Nucleares Magnéticas (RNM) no tocante às alterações articulares e discais da articulação temporomandibular;

Correlacionar os achados de RNM com a classificação obtida no RDC/TMD;

Estabelecer uma correlação entre a expressão do receptor TRPA1 e seu agonista endógeno 4-HNE

Endereço: DOS CASTANHEIROS
Bairro: JARDIM RENASCENÇA CEP: 65.075-120
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3214-4285 Fax: (98)3214-4212 E-mail: cep@ceuma.br



Continuação do Parecer: 204.829

no

plasma e saliva com a severidade da dor em pacientes com disfunção temporomandibular;
Avaliar estatisticamente e clinicamente a significância dos resultados obtidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios foram descritos detalhadamente no projeto e constam do primeiro parecer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

a pesquisa é bem delimitada, foram feitas as alterações sugeridas por este CEP; sendo melhor definidos os pontos questionados do orçamento do referido projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi modificado conforme solicitação deste CEP.

Recomendações:

apresentar resultados parciais a este CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO LUIS, 07 de Maio de 2013

Assinador por:
Eduardo Durans Figuerêdo
(Coordenador)

Endereço: DOS CASTANHEIROS
Bairro: JARDIM RENASCENÇA CEP: 65.075-120
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3214-4285 Fax: (98)3214-4212 E-mail: cep@ceuma.br

3. Certificado de Tradução do Artigo



UNIVERSIDADE CEUMA
POST-GRADUATION PROGRAMME
MSc IN DENTISTRY

I, Prof. Dr. Elizabeth Soares Fernandes, certify thereby, that this manuscript had its grammar revised before it was submitted for consideration in the viva of Adriana Q.S. Mouchrek, student of the MSc Programme in Dentistry of the Universidade CEUMA (UNICEUMA).

Sincerely yours,

4. Artigo em Inglês

Salivary 4-HNE levels and TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes vary with the severity of temporomandibular joint dysfunction

Running title: 4-HNE and TRPA1 in temporomandibular joint dysfunction

R.J. Klug¹, A.Q.S. Mouchrek¹, G.F. Passos², S.J.F. Mendes¹, B.L.R. da Silva¹, I.C. de Paiva¹, A.P.S.F. Lamha¹, L.S.B. de Almeida³, V. Monteiro-Neto¹, M.N. Muscará⁴, M.A.G. Grisotto¹, J.B. Calixto⁵, E.S. Fernandes^{1,6}

¹Programa de Pós-graduação, Universidade CEUMA, São Luís,

²Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ³Universidade Federal do Maranhão, São Luís,

⁴Universidade de São Paulo, São Paulo,

⁵Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos - CIENP, Florianópolis,

Brazil; ⁶Vascular Biology and Inflammation Section, Cardiovascular Division, King's College London, London, UK.

Corresponding author: Elizabeth S. Fernandes, Rua Josué Montello, nº 1, Bairro Renascença II, São Luís, MA, Brazil, 65075-120. Phone: +55-98-32144252, elizabeth.soares@ceuma.br; elizabeth.fernandes@kcl.ac.uk

Category: Original article

Funding sources: This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA). B.L.R. da Silva is an MSc student and S.J.F.M. is a PhD student receiving grants from FAPEMA and CAPES, respectively.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

What's already known about this topic? And what does this study add?

- TRPA1 channels mediate joint pain in arthritis. They are also implicated in orofacial pain which has been linked to their expression on trigeminal ganglion neurons. Whilst most of the data obtained is from animal models, little is known of TRPA1 role in human disease.
- We found that TRPA1 expression on leukocytes and the levels of its endogenous agonist 4-HNE vary with temporomandibular-joint dysfunction's severity. These changes may reflect on treatment responsiveness at different stages of disease.

Abstract

Background: The transient receptor potential Ankyrin 1 channel (TRPA1) mediates joint pain in arthritis. It is also implicated in orofacial pain and this has been linked to its expression on trigeminal ganglion neurons. Whilst most of the data obtained on this channel are from animal models, little is known of TRPA1 role in human disease. **Methods:** We investigated the expression levels of TRPA1 on peripheral blood leukocytes as well as the levels of its endogenous agonist 4-HNE in saliva and plasma samples obtained from patients with diagnosed temporomandibular joint (TMJ) dysfunction with different levels of disease severity ($n=26$) by using enzyme-linked immunosorbent assays. Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations and cytokine production were evaluated by flow cytometry and cytometric bead array, respectively. Samples obtained from healthy subjects were used as controls ($n=11$). **Results:** Increased levels of 4-HNE were detected in saliva samples from patients with moderate/severe TMJ dysfunction whilst TRPA1 expression levels on peripheral blood leukocytes was augmented in patients with mild disease ($p<0.05$). These changes were accompanied by increased activation of CD14⁺ circulating cells ($p<0.05$) and increased levels of TNF α and IL-17 in saliva samples from patients with mild TMJ dysfunction ($p<0.05$). Also, a decrease on the number of circulating T regulatory cells (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) was observed in patients with moderate/severe TMJ dysfunction

($p < 0.05$). **Conclusions:** Overall, we found that TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes and the salivary levels of its endogenous agonist 4-HNE vary with disease severity. These changes may reflect on treatment responsiveness at different stages of disease.

Introduction

Temporomandibular joint (TMJ) dysfunction is characterized by pain in the TMJ and surrounding tissues, functional limitation of the mandible or clicking in the TMJ during movement (Buescher, 2007; Roda et al., 2007). Approximately 10% of the world's adult population show at least one sign of TMJ dysfunction and one third of them present with at least one symptom of disease (for review see: Roda et al., 2007). TMJ dysfunction can become chronic and sometimes debilitating with 5% of adults with TMJ dysfunction requiring treatment (Roda et al., 2007). Although its etiology is not completely understood, ongoing synovitis and cartilage destruction are well known underlying mechanisms of TMJ dysfunction, which has been associated with stress, anxiety, abnormal occlusion, parafunctional habits such as bruxism, and abnormalities of the intra-articular disk (Roda et al., 2007; Wang et al., 2015). Treatment of TMJ dysfunction includes non-surgical options such as physical therapy, occlusal splints, pharmacological approaches (non-steroidal and steroidal therapy, muscle relaxants, benzodiazepines, anxiolytics, tricyclic antidepressants) and arthrocentesis; with the most severe cases requiring surgical intervention (Chang and Israel, 2005; Buescher, 2007; Wang et al., 2015). Although existing therapy may alleviate pain, it does not halt joint damage and bone loss.

Inflammatory pain is a hallmark of joint dysfunction and many inflammatory pathways have been described to play a role in disease

progression. Transient receptor potential (TRP) channels, a family of non-selective cation channels are expressed on sensory neurons innervating the joints and also on non-neuronal cells such as immune cells (lymphocytes and monocytes/macrophages), synoviocytes and blood vessels (for review see: Fernandes et al., 2012; 2013); are now known to mediate inflammation and pain transmission in a variety of conditions including in joint disease (Fernandes et al., 2012; 2013). Evidence has shown that transient receptor potential ankyrin 1 channel (TRPA1) mediates joint pain in arthritis (Fernandes et al., 2011; see for review: Fernandes et al., 2013). More recently, TRPA1 has also been implicated in orofacial pain and this has been linked to its expression on trigeminal ganglion neurons (Kim et al., 2010; Honda et al., 2014; Urata et al., 2015). Compelling information on TRPA1 role in inflammatory pain transmission and maintenance has lead to clinical trials of TRPA1 antagonists for the treatment of chronic pain including arthritis (see for review: Fernandes et al., 2013; Preti et al., 2015). However, most of the data obtained on this channel are from animal models, and little is known of TRPA1 role in human disease. In 2014, Bell and collaborators have suggested that individuals with lower pain thresholds presented with decreased expression of TRPA1 in peripheral tissues such as skin. This finding has been recently supported by Sukenaga et al. (2016) who showed that patients with chronic neuropathic pain also present a decrease in TRPA1 expression on peripheral blood cells, suggesting those to be

reliable markers of pain in humans. These were the first indications that TRPA1 expression may be linked to pain severity; however, this has not been evaluated in joint disease.

Herein, we investigated the expression levels of TRPA1 on peripheral blood leukocytes as well as the levels of its endogenous agonist 4-HNE in saliva and plasma samples obtained from patients with diagnosed TMJ dysfunction with different levels of disease severity. We also investigated the immunological changes in peripheral blood cells and cytokine and IgA release in these individuals. We found that TRPA1 expression and 4-HNE levels vary with disease severity and suggest these changes may reflect on treatment responsiveness at different stages of disease.

Material and Methods

Patients

Peripheral blood and saliva samples were taken from healthy subjects ($n = 11$) and from patients with diagnosed temporomandibular joint (TMJ) dysfunction with different levels of disease severity ($n = 26$). Criteria for exclusion were age under 18 (due to the characteristics of the Research Diagnostic Criteria/Temporomandibular Dysfunction -RDC/TMD; the reliability of which has been tested on adult populations) and presence of pregnancy, deciduous and mixed dentition, polyarthritis, and recent history of infectious disease and/or use of anti-inflammatory drugs.

Disease severity was confirmed by radiographic analysis in addition to evaluation of patients by the RDC/TMD. Clinical assessment was made by a trained investigator (R.J.K.), an examiner with years of experience in the field of TMJ dysfunction management with experience with RDC/TMD. Based on clinical assessment, TMJ dysfunction was then classified as mild, moderate or severe. The range of movement of the temporomandibular joint was evaluated in all groups as indicative of loss of joint function. Three different measurements were taken from each patient (passive mouth opening with and without pain, and maximum opening of the mouth) and results are expressed as range of movement in millimetres (mm). All samples and measurements were obtained from subjects with written consent. The study was reviewed and approved by the local Research Ethics Committee (264.629) and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki 1975, as revised in 2008.

Sample preparation for inflammatory mediator and IgA measurements

Peripheral blood samples were collected and the plasma was separated by centrifugation (15 min, 2,000 rpm). Saliva samples were collected over 5 min. For this, a 15 mm diameter probe was placed in to the subject's mouth and the spontaneously produced saliva was collected in a 15 ml tube. Saliva samples were then centrifuged for removal of debris (10 min, 1,500 rpm) and the

supernatant was collected. Both plasma and saliva samples were then kept at -70°C for further analysis.

Flow cytometry analysis

For flow cytometry analysis, peripheral blood samples were collected and red blood cells were lysed with Cell Lysis Buffer (BD Pharmingen, Brazil). Single-cell suspensions were prepared and cells were then stained with Trypan blue (Sigma-Aldrich, Brazil) and assessed for viability in a haemocytometer. Cells (5×10^6) were washed, resuspended in flow cytometry buffer ((2% foetal calf serum (Invitrogen, Brazil) in phosphate buffered saline-PBS (Sigma-Aldrich, Brazil)), and stained with directly conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences or eBiosciences, Brazil): anti-CD4 PE-Cy5 (clone RPA-T4), anti-CD14 FITC (clone 61D3), anti-CD19 FITC (clone HIB19), anti-CD25 PE (clone BC96), anti-CD69 (clone FN50), anti-CD127 FITC (clone eBioRDR5), anti-HLA-DR PE-Cy5 (clone LN3). In order to discriminate regulatory T cells (Tregs) from activated CD4⁺ T cells, gates were placed on CD4⁺CD25⁺CD127^{low} and CD4⁺CD25⁺CD127^{high} cell populations, respectively. Events were acquired on a BD Accuri C6 (BD Biosciences-Immunocytometry Systems) and analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc.). Additionally, differential cell populations (PMNs, monocytes and total lymphocytes) were identified by size and granularity through flow

cytometry. Results are expressed as well as number of cells ($\times 10^3$), except for HLA-DR, expressed as mean fluorescence.

Plasma Cytokine Levels

The plasma levels of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-4, IL-6, IL-2, IL-10, and IL-17 were evaluated by using a cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit (BD Biosciences, Brazil) according to manufacturer's instructions. Analysis was performed on a BD Accuri C6 (BD Biosciences-Immunocytometry Systems). Results were calculated in CBA FCAP Array software (BD Biosciences, Brazil) as pg/ml.

4-HNE and IgA detection

Plasma and salivary 4-HNE were evaluated by using a commercial OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA Kit (Cell Biolabs, CA, USA). Plasma and salivary IgA levels were detected by using a human IgA ELISA Kit purchased from Bethyl Laboratories, Inc. (TX, USA). Both assays were performed according to the manufacturer's instructions.

TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes

For analysis of human TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes, samples were prepared and assayed in a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit, according to the manufacturer's instructions (Cloud-Clone Corp, TX, USA). Briefly,

peripheral blood samples underwent red blood cell lysis as previously described for flow cytometry analysis, and total leukocytes were separated by centrifugation (30 min, 2,000 rpm). Leukocytes were then resuspended in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and ultrasonicated for 4 times. Cell lysates were then centrifuged (10 min, 2,000 rpm, 4°C) to remove cell debris and kept at -70°C for further analysis. On the day of the experiments, samples were defrosted and assayed according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as nanograms of TRPA1 per milligram of protein in each sample (ng/ml).

Data Analysis

The results are presented as the mean \pm standard error (SE). Statistical comparisons of the data were performed by ANOVA followed by Bonferroni using GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA). *P* values < 0.05 were considered as significant.

Results

Patients with moderate/severe TMJ dysfunction present with temporomandibular joint bone loss and impairment of joint function

Healthy subjects (*n*=11) and patients with TMJ dysfunction (*n*=26) assessed were of both genders. Patients were diagnosed for TMJ dysfunction and disease was then classified according with severity, as mild (57.7%; *n*=15), moderate (34.6%; *n*=9) and severe (7.7%;

$n=2$). Women represented 63.6% ($n=4$) of the healthy subject and 88.5% ($n=23$) of the TMJ dysfunction groups. The average age for both groups was of 29 years old.

Figure 1 shows the representative cross-sectional longitudinal views from panoramic radiographs taken from healthy subjects and from patients with mild, moderate and severe TMJ dysfunction. As depicted, healthy subjects present normal condyle (control subjects; Figure 1A). Condylar alterations were detected in all TMJ dysfunction patients with patients presenting with flat condyle (mild TMJ dysfunction; Figure 1B), condylar cortical bone loss (moderate TMJ dysfunction, Figure 1C) and flat condyle with cortical bone loss (severe TMJ dysfunction, Figure 1D).

Healthy subjects and TMJ dysfunction patients exhibited similar ranges of temporomandibular movement when evaluated for passive mouth opening with and without pain (Figure 1E). However, patients with moderate/severe but not mild TMJ dysfunction presented with impairment of joint function denoted by reduction ($19.1 \pm 6.4\%$) of the range of temporomandibular movement during maximum opening of the mouth in comparison with healthy subjects ($p < 0.05$; Figure 1E).

4-HNE levels and TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes vary with the severity of TMJ dysfunction

The levels of 4-HNE, an inflammatory mediator known to act as an endogenous agonist for TRPA1 receptors (Trevisani et al., 2007;

Andersson et al., 2008), were investigated in plasma and saliva samples obtained from healthy subjects and patients with TMJ dysfunction. The salivary but not plasma levels of 4-HNE were raised (1.6-fold increase; $p < 0.05$) in patients with moderate/severe TMJ dysfunction in comparison with the levels detected in samples obtained from healthy subject (Figure 2A and B). On the other hand, the salivary levels of 4-HNE in samples obtained from patients with mild TMJ dysfunction were similar to those of healthy subjects (Figure 2B). No differences were observed in the levels of plasma 4-HNE between any of the groups evaluated (Figure 2A).

The expression of TRPA1 on peripheral blood leukocytes was analysed in healthy subjects and patients with TMJ dysfunction. As shown in Figure 2C, patients with mild TMJ dysfunction express higher levels of TRPA1 on their leukocytes in comparison with leukocyte samples of healthy subjects (1.8-fold increase; $p < 0.05$). However, patients with moderate/severe TMJ dysfunction exhibit similar TRPA1 expression levels to those of healthy subjects (Figure 2C).

Patients with moderate/severe TMJ dysfunction display lower numbers of peripheral blood leukocytes

Total and differential peripheral blood leukocyte numbers were analysed in samples obtained from healthy subjects and patients with TMJ dysfunction. Patients with moderate/severe TMJ dysfunction present with lower numbers (30.8 ± 7.4 ; $p < 0.05$) of circulating

leukocytes in comparison with samples obtained from healthy subjects (Figure 3A). On the other hand, reduced numbers of PMNs were found in patients with both mild and moderate/severe TMJ dysfunction (35.3 ± 7.4 and 50.1 ± 9.1 , respectively; Figure 3B; $p < 0.05$). A similar reduction was observed in the numbers of monocytes in patients with both mild and moderate/severe TMJ dysfunction (39.4 ± 3.5 and 52.9 ± 4.5 , respectively; Figure 3C; $p < 0.05$). Presence of TMJ dysfunction did not alter the numbers of total circulating lymphocytes, with healthy subjects and TMJ dysfunction patients exhibiting similar amounts of these cells (Figure 3D).

Increased activation of CD14⁺ peripheral blood leukocytes is detected in patients with mild TMJ dysfunction

CD14⁺ is highly expressed on monocytes and therefore, is commonly used as a marker for these cells (Stansfield and Ingram, 2015). Figure 3E shows the numbers of CD14⁺ peripheral blood leukocytes in healthy subjects and patients with TMJ dysfunction. As depicted, patients with TMJ dysfunction possess lower numbers of CD14⁺ circulating leukocytes independent of the severity of disease when compared with healthy subject samples (reduced by 47.2 ± 6.4 and 57.4 ± 9.6 % in mild and moderate/severe TMJ dysfunction groups, respectively; $p < 0.05$). Expression of HLA-DR, used as an activation marker of CD14⁺, was increased in mild (1.7-fold increase; $p < 0.05$)

but not moderate/severe peripheral blood CD14⁺ leukocytes in comparison to samples obtained from healthy subjects (Figure 3F).

Patients with moderate/severe TMJ dysfunction present with diminished numbers of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} and increased activation of CD19⁺CD69⁺ peripheral blood leukocytes

The profile of subpopulations of lymphocytes was investigated in samples obtained from healthy subjects and patients with TMJ dysfunction. No differences were observed in any of the evaluated groups in respect with their CD4⁺ population (Table 1). Similarly, all groups evaluated displayed similar numbers of CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{high} and CD19⁺ leukocytes (Table 1). However, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} leukocytes were markedly diminished (51.6 ± 8.7 ; $p < 0.05$) in patients with moderate/severe but not mild TMJ dysfunction in comparison with those of healthy subjects (Table 1). Evaluation of CD19⁺CD69⁺ population demonstrated that patients with moderate/severe TMJ dysfunction display higher number of these cells (1.7-fold increase; $p < 0.05$) in comparison with healthy subjects (Table 1). On the contrary, samples obtained from mild TMJ patients exhibited similar numbers of CD19⁺CD69⁺ leukocytes to those of healthy patients (Table 1).

Cytokine but not IgA production varies with the severity of TMJ dysfunction

We evaluated the levels of cytokine and IgA production in both plasma and saliva samples obtained from healthy subjects and patients with TMJ dysfunction. The data depicted on Figure 4A and B show the levels of TNF α and IL-17, respectively, in saliva samples. The levels of both cytokines were markedly raised ($p < 0.05$) in mild TMJ dysfunction patients in comparison with samples obtained from healthy subjects, with a 14.7-fold increase and 54.9-fold increase observed for TNF α and IL-17, respectively. The production of IFN γ , IL-4, IL-6, IL-2 and IL-10 was not detected in saliva samples of any of the evaluated groups. Similarly, no detectable levels were observed for any of the evaluated cytokines in plasma samples of any of the studied groups.

The plasma and salivary levels of IgA were also evaluated. No differences in plasma and salivary IgA levels were observed between groups of individuals (Figure 4C e D).

Discussion

As other joint diseases, TMJ dysfunction is characterized by inflammatory pain associated with osteoarthritis with some patients presenting polyarthritis (Buescher, 2007; Wang et al., 2015). Several studies have attempted to investigate biomarkers and the pathophysiology of TMJ disease and have been essential to determine the inflammatory pathways involved in this dysfunction and further improve diagnosis and treatment. Also, mechanistic

studies when performed, have approached the differences in the inflammatory profile between acute and chronic disease, but have not evaluated those according with disease severity.

For the best of our knowledge we present novel evidence on that, patients with TMJ dysfunction present with a different immune profile depending on the severity of disease. In agreement with the literature, the majority of patients with TMJ dysfunction were women and their age corresponded to that commonly affected by disease (Roda et al., 2007). As expected, patients with moderate/severe TMJ dysfunction exhibited joint impairment denoted by reduced range of movement at maximum opening of the mouth, which was accompanied by joint bone loss and/flat condyle.

Although many “triggers” have been suggested in TMJ dysfunction including defects in collagen synthesis, chronic trauma and overload, acute trauma, amongst others; it is consensus that TMJ pathophysiology involves leukocyte recruitment and activation, production of inflammatory mediators and immunoglobulins which culminates in cartilage damage and bone resorption (Chang and Israel, 2005). Additional mechanisms involved in joint inflammatory pain have been pointed. Activation of TRPA1, a non-selective cation channel expressed on sensory neurons innervating the joint in addition to non-neuronal cells including blood vessels, synoviocytes and inflammatory cells (monocytes/macrophages and lymphocytes), has been recently linked to joint disease. Different pre-clinical studies

conducted in rodents suggested that TRPA1 expressed at both central and peripheral sites are key mediators in joint dysfunction during inflammation, contributing to the establishment and maintenance of inflammatory pain (Fernandes et al., 2011; see for review: Fernandes et al., 2013). Additional reports have also shown that TRPA1 is implicated in orofacial pain and this has been linked to its expression on trigeminal ganglion neurons (Kim et al., 2010; Honda et al., 2014; Urata et al., 2015). Whilst rodent models of joint inflammatory pain have allowed dissection of mechanisms of disease in which TRPA1 may play a role, translational research has proven to be difficult. Overall, most of the data obtained on TMJ dysfunction mechanisms so far, are from post-mortem analysis or *in vivo* arthrocentesis of patients.

In 2014, Bell and collaborators suggested that individuals with lower pain thresholds presented with decreased expression of TRPA1 in peripheral tissues such as skin. The recent suggestion of peripheral blood cells as reliable markers of pain in humans has uncovered a novel perspective for studying joint disease which may accelerate the knowledge on human joint disease. Indeed, by analysing peripheral blood samples from patients with chronic neuropathic pain, Sukenaga et al. (2016) showed their leukocytes express lower levels of TRPA1 mRNA. Here, we show for the first time that TRPA1 protein expression levels vary with TMJ dysfunction severity. Although it was not possible to evaluate intra-articular changes, interestingly, patients

with mild but not moderate/severe TMJ dysfunction exhibited increased TRPA1 protein expression on peripheral blood leukocytes in comparison with healthy subjects. These are the first indications that TRPA1 expression may be linked to pain severity. TRPA1 can be activated by different endogenous agonists produced as a result of inflammation such as reactive oxygen species, lipid peroxidation products and prostacyclins (Trevisani et al., 2007; Andersson et al., 2008; see for review: Fernandes et al., 2012). 4-HNE is a lipid peroxidation product released in joint injury including in osteoarthritis (Grigolo et al., 2003), rheumatoid arthritis (Yin et al., 2015) and TMJ dysfunction (Cai et al., 2006). In fact, this inflammatory mediator is known to be involved in further inflammatory mediator release and to cause synoviocyte apoptosis when produced during articular inflammation (Yin et al., 2015). 4-HNE is lipophilic compound and thus, it may be highly diffusible across tissues. Herein, 4-HNE levels were increased in saliva samples of patients with moderate/severe but not mild TMJ dysfunction in comparison with healthy subjects, whilst no differences were seen in its circulating levels. This set of data indicates that both salivary 4-HNE and TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes may be useful markers of TMJ dysfunction severity.

We next examined the immunological profile of the circulating leukocyte population of TMJ dysfunction patients and healthy subjects. We found that TMJ dysfunction patients present diminished

numbers of polymorphonuclear cells and monocytes when compared with healthy subjects; whilst all evaluated groups exhibited similar numbers of lymphocytes. Evaluation of cell subpopulations demonstrated that both the mild and moderate/severe TMJ dysfunction groups present with diminished numbers of CD14⁺ in comparison with healthy controls. However, analysis of HLA-DR expression showed that CD14⁺ cells are highly activated only in patients with mild disease in comparison with healthy subjects. CD14⁺ is normally used as a marker of monocytes (Stansfield and Ingram, 2015), thus, our data suggest an increased activation of monocytes in mild TMJ dysfunction patients. Interestingly, TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes seems to correlate with the activation of CD14⁺ cells. It is possible though, that TRPA1 is expressed on activated monocytes/macrophages during TMJ dysfunction. In fact, recent evidence showed that TRPA1 is functionally expressed on human monocytes (Billeter et al., 2015).

Analysis of lymphocyte subpopulations showed that all evaluated groups present similar profiles in regards of CD4⁺ (Thelper lymphocytes), CD19⁺ (B lymphocytes), and activated CD4⁺CD69⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127^{high} cells. On the other hand, we found that patients with moderate/severe TMJ dysfunction present with lower numbers of Tregs (CD4⁺CD25⁺CD127^{high}) and increased activation of B lymphocytes (CD19⁺CD69⁺). These data suggest that depending on the severity of TMJ dysfunction, different cell populations become

activated and therefore, analysis of the peripheral blood leukocytes may be useful in diagnosing disease progression.

We next evaluated whether changes in peripheral blood leukocyte population may impact the production of cytokines, classically produced by monocytes/macrophages and T lymphocytes; and IgA, produced by activated B cells.

None of the evaluated cytokines were detected in plasma samples of any of the groups tested. However, our data show that patients with mild but not moderate/severe TMJ dysfunction, release high levels of TNF α and IL-17 in their saliva. TNF α is one of the most important cytokines produced during joint inflammation (see for review: Manara and Sinigaglia, 2015). Indeed, its role in amplifying joint inflammation and sensitizing sensory neurons is well recognized in rheumatoid arthritis and osteoarthritis (Schaible, 2014; Manara and Sinigaglia, 2015). However, there are few studies linking TNF α production and TMJ dysfunction. In an earlier report, Fu and collaborators (1995) found that TNF α was elevated in the synovial fluid of 5 of 11 patients with TMJ disk displacement and 9 of 11 patients with degenerative TMJ. More recently, it was demonstrated that TMJ dysfunction patients presented higher levels of this cytokine in the synovial fluid in comparison with healthy individuals (Kim et al., 2012). As TNF α , IL-17 can cause both inflammation and bone destruction (Roeleveld and Koenders, 2014; Wojdasiewicz et al., 2014), and its production was recently linked to pain severity in joint disease (Liu et al., 2015).

Likewise, few studies have addressed the role of IL-17 in TMJ dysfunction. It is known that IL-17 can be detected in synovial fluid samples of patients with TMJ dysfunction (Kaneyama et al., 2004). Also, *in vitro* stimulation of synovial fibroblasts obtained from patients with TMJ dysfunction with IL-17 triggers further cytokine and chemokine production (Hattori et al., 2015). Whilst the majority of the data obtained in human disease are from analysis of synovial fluid, we show for the first time that both TNF α and IL-17 can be detected in saliva samples of patients with TMJ dysfunction; and that their production varies with disease severity as higher levels were observed in patients with mild disease.

IgA is produced during inflammation by CD19⁺ activated cells. Evidence has shown that higher levels of IgA are detected in the synovial fluid of patients with TMJ dysfunction in comparison with healthy subjects (Chang and Israel, 2005). Herein, we show that while increased activation of CD19⁺ cells was observed in patients with moderate/severe disease, no differences in the levels of plasma and salivary IgA were seen between the evaluated groups. Although IgA differences were not detected, it is possible that the production of other immunoglobulins such as IgG and IgM may be altered with disease severity.

Collectively, our data show that depending on the severity of TMJ dysfunction, patients may exhibit a distinct immunological profile. We show that patients with mild disease display higher activation of

circulating CD14⁺ cells, which is accompanied by increased expression of TRPA1 on these cells and higher salivary levels of TNF α and IL-17. Also, patients with moderate/severe TMJ dysfunction present with higher salivary levels of 4-HNE, which is accompanied by lower numbers of circulating Tregs and increased activation of circulating CD19⁺ cells. These changes may reflect on treatment responsiveness at different stages of disease.

Author contributions

R.J. Klug, M.A.G. Grisotto, V. Monteiro-Neto, M.N. Muscará, J.B. Calixto and E.S. Fernandes contributed to conception, design, data acquisition, analysis, and interpretation, drafted and critically revised the manuscript; A.Q.S. Mouchrek, S.J.F. Mendes, B.L.R. da Silva, I.C. de Paiva, A.P.S.F. Lamha and L.S.B. de Almeida contributed to data acquisition and analysis and critically revised the manuscript. All authors gave final approval and agree to be accountable for all aspects of the work.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA). B.L.R. da Silva is an MSc student and S.J.F.M. is a PhD student receiving grants from FAPEMA and CAPES, respectively.

References

Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci*. 2008; 28(10):2485-94.

Bell JT, Loomis AK, Butcher LM, Gao F, Zhang B, Hyde CL, Sun J, Wu H, Ward K, Harris J, Scollen S, Davies MN, Schalkwyk LC, Mill J; MuTHER Consortium, Williams FM, Li N, Deloukas P, Beck S, McMahon SB, Wang J, John SL, Spector TD. Differential methylation of the TRPA1 promoter in pain sensitivity. *Nat Commun*. 2014; 5:2978.

Billeter AT, Galbraith N, Walker S, Lawson C, Gardner SA, Sarojini H, Galandiuk S, Polk HC Jr. TRPA1 mediates the effects of hypothermia on the monocyte inflammatory response. *Surgery*. 2015 Sep;158(3):646-54.

Buescher JJ. Temporomandibular joint disorders. *Am Fam Physician*. 2007 Nov 15;76(10):1477-82.

Cai HX, Luo JM, Long X, Li XD, Cheng Y. Free-radical oxidation and superoxide dismutase activity in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*. 2006; 20(1):53-8.

Chang H, Israel H. Analysis of inflammatory mediators in temporomandibular joint synovial fluid lavage samples of symptomatic patients and asymptomatic controls. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005 ; 63(6):761-5.

Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 2012;166(2):510-21

Fernandes, E.S., Awal, S., Karadaghi, R., Brain, S.D. TRP Receptors in Arthritis, Gaining Knowledge for Translation from Experimental Models. *The Open Pain Journal*, 2013, v. 6, p. 50-61.

Fernandes, E.S., Russell, F.A., Spina, D., McDougall, J.J., Graepel, R., Gentry, C., Staniland, A.A., Mountford, D.M., Keeble, J.E., Malcangio, M., Bevan, S., Brain, S.D. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2011, 63: 819-829.

Fu K, Ma X, Zhang Z, Chen W. Tumor necrosis factor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 53(4):424-6.

Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Facchini A. Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2003; 30(2):345-7.

Hattori T, Ogura N, Akutsu M, Kawashima M, Watanabe S, Ito K, Kondoh T. Gene Expression Profiling of IL-17A-Treated Synovial Fibroblasts from the Human Temporomandibular Joint. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:436067.

Honda K, Shinoda M, Furukawa A, Kita K, Noma N, Iwata K. TRPA1 contributes to capsaicin-induced facial cold hyperalgesia in rats. *Eur J Oral Sci.* 2014; 122(6):391-6.

Kaneyama K, Segami N, Sato J, Nishimura M, Yoshimura H. Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous changes in the temporomandibular joint disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 42(3):246-50.

Kim YK, Kim SG, Kim BS, Lee JY, Yun PY, Bae JH, Oh JS, Ahn JM, Kim JS, Lee SY. Analysis of the cytokine profiles of the synovial fluid in a normal temporomandibular joint: preliminary study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012; 40(8):e337-41. .

Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK, Bae YC. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol.* 2010; 518(5):687-98.

Liu Y, Peng H, Meng Z, Wei M. Correlation of IL-17 Level in Synovia and Severity of Knee Osteoarthritis. *Med Sci Monit.* 2015 Jun 15;21:1732-6.

Manara M, Sinigaglia L. Bone and TNF in rheumatoid arthritis: clinical implications. *RMD Open.* 2015 Aug 15;1(Suppl 1):e000065.

Poveda Roda R1, Bagan JV, Díaz Fernández JM, Hernández Bazán S, Jiménez Soriano Y. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: classification, epidemiology and risk factors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12(4):E292-8.

Preti D, Saponaro G, Szallasi A. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists. *Pharm Pat Anal.* 2015; 4(2):75-94.

Roeleveld DM, Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine.* 2015; 74(1):101-7.

Schaible HG. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(5):470

Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Transl Med.* 2015 ;4:5.

Sukenaga N, Ikeda-Miyagawa Y, Tanada D, Tunetoh T, Nakano S, Inui T, Satoh K, Okutani H, Noguchi K, Hirose M. Correlation Between DNA Methylation of TRPA1 and Chronic Pain States in Human Whole Blood Cells. *Pain Med.* 2016. doi: 10.1093/pm/pnv088.

Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andrè E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13519-24.

Urata K, Shinoda M, Honda K, Lee J, Maruno M, Ito R, Gionhaku N, Iwata K. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. *J Dent Res.* 2015; 94(3):446-54.

Wang XD, Zhang JN, Gan YH, Zhou YH. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ osteoarthritis. *J Dent Res*. 2015; 94(5):666-73.

Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:561459.

Yin G, Wang Y, Cen XM, Yang M, Liang Y, Xie QB. Lipid peroxidation-mediated inflammation promotes cell apoptosis through activation of NF- κ B pathway in rheumatoid arthritis synovial cells. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:460310.

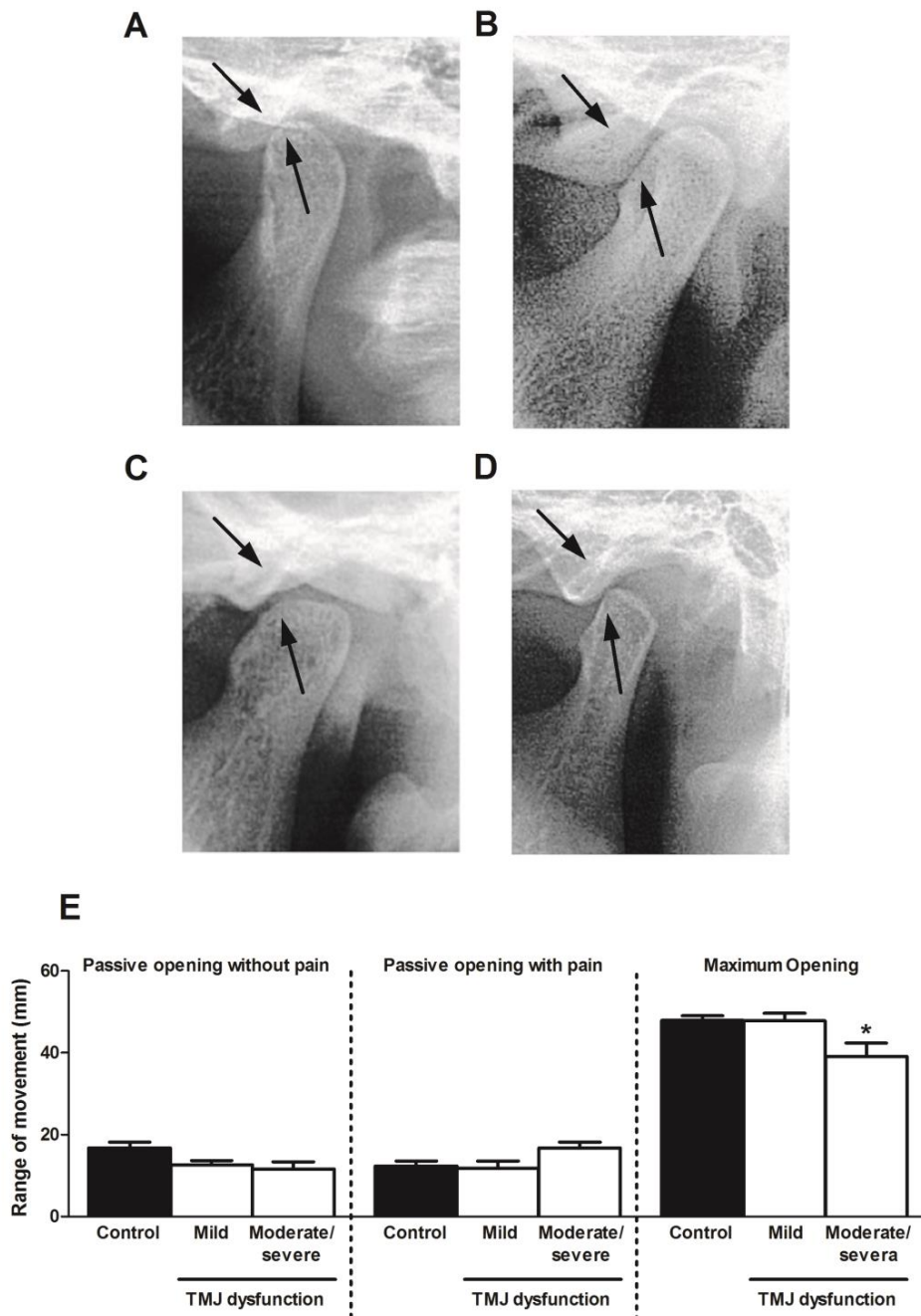


Figure 1. Articular erosion and range of temporomandibular joint movement in patients with TMJ dysfunction with different degrees of severity. Representative cross-sectional longitudinal views from panoramic radiographs; arrows show (A) normal condyle

(control subjects), (B) flat condyle (mild TMJ), (C) condylar cortical bone loss (moderate TMJ) and (D) flat condyle with cortical bone loss (severe TMJ). (E) Range of movement in millimetres (mm) during passive mouth opening with and without pain, and maximum opening in patients with mild ($n=15$), or moderate/severe ($n=8$) TMJ dysfunction. Healthy subjects were used as controls ($n=11$). Data are expressed as mean \pm SEM. $*P < 0.05$ compared with control group.

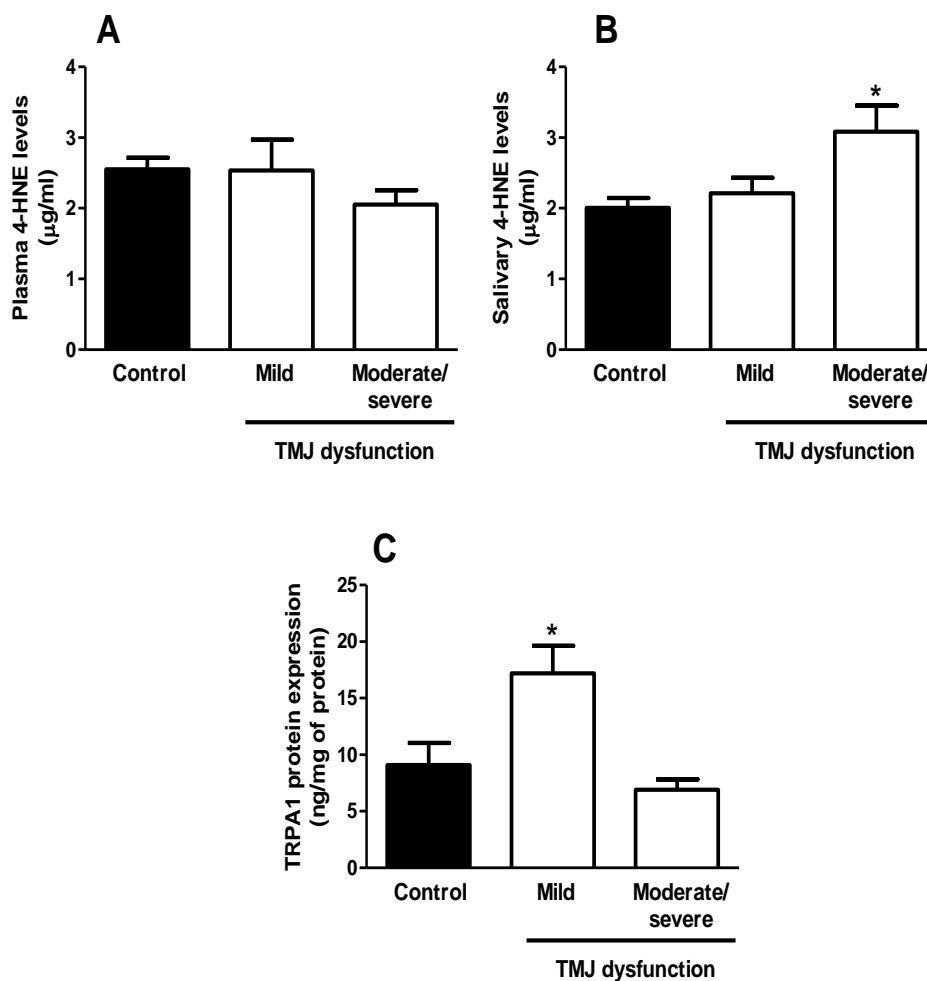


Figure 2. 4-HNE and TRPA1 levels in patients with TMJ dysfunction. Plasma (A) and salivary (B) levels of 4-HNE were quantified. TRPA1 protein expression levels (C) on peripheral leukocytes. Samples were obtained from patients with mild ($n=6$), or moderate/severe ($n=6$) TMJ dysfunction. Healthy subjects were used as controls ($n=6$). Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with control group.

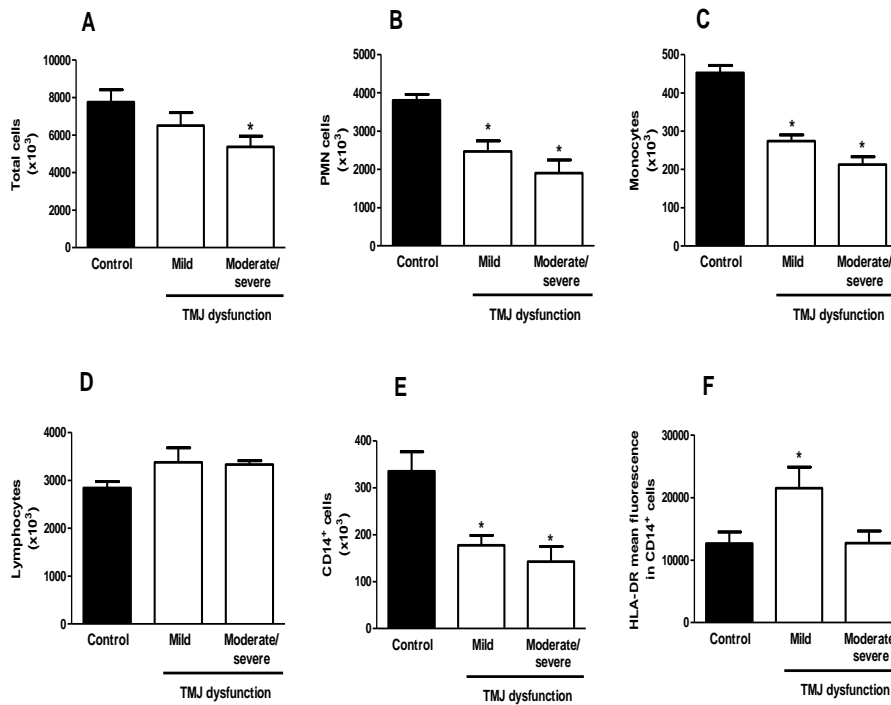


Figure 3. Total and differential leukocyte counts and profile of CD14⁺ population in peripheral blood samples of patients with TMJ dysfunction. Total leukocytes (A), polymorphonuclear cell (PMN) (B), monocyte (C) and lymphocyte (D) population in peripheral blood samples obtained from patients with mild ($n=6$) and moderate/severe ($n=6$) TMJ dysfunction. CD14⁺ cells (E), HLA-DR expression on CD14⁺ cells (F) isolated from peripheral blood samples obtained from patients with mild ($n=6$) and moderate/severe ($n=6$) TMJ dysfunction. Healthy subjects were used as controls ($n=6$). Differential cell populations were identified by size and granularity through flow cytometry. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with control group.

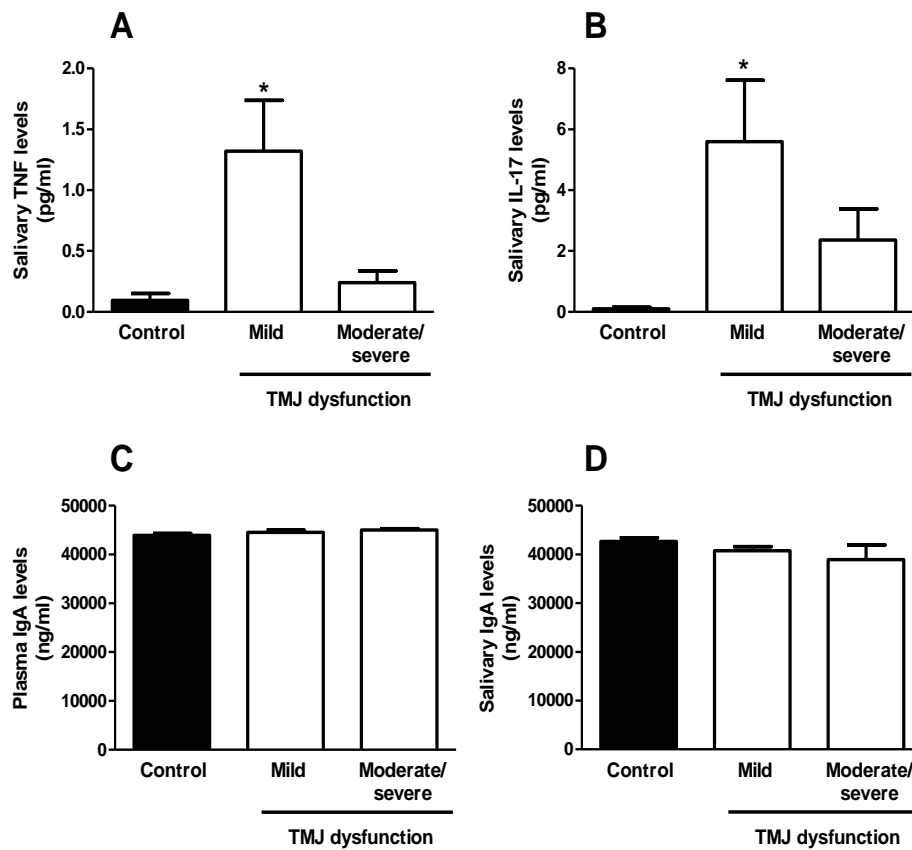


Figure 4. Cytokine and IgA production in saliva and plasma samples obtained from patients with TMJ dysfunction. Salivary TNF α (A), IL-17 (B) and IgA (D) levels in samples obtained from from patients with mild ($n=6$) and moderate/severe ($n=6$) TMJ dysfunction. Plasma (C) and salivary (D) IgA levels in samples obtained from from patients with mild ($n=6$) and moderate/severe ($n=6$) TMJ dysfunction. Healthy subjects were used as controls ($n=6$). Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with control group.

Table 1

Cell population (x10³)	Healthy subjetcs	Mild TMJ dysfunction	Moderate/severe TMJ dysfunction
CD4⁺	1282.0±257.6	1649.0 ± 233.2	1523.0 ± 160.8
CD4⁺CD69⁺	94.4 ± 13.5	110.3 ± 18.3	88.5 ± 16.4
CD4⁺CD25⁺CD127^{high}	159.3 ± 33.0	244.5 ± 42.0	207.5 ± 25.2
CD4⁺CD25⁺CD127^{low}	152.9 ± 33.6	115.5± 14.2	74.0 ± 13.3 *
CD19⁺	291.4 ± 46.6	264.9 ± 53.7	287.3 ± 28.7
CD19⁺CD69⁺	19.5 ± 3.0	24.1± 3.6	33.4 ± 4.6 *

Activation profile of peripheral blood T helper and B lymphocytes in patients with TMJ dysfunction. CD4⁺, CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{high}, CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, CD19⁺ and CD19⁺CD69⁺ cells were isolated from peripheral blood samples obtained from patients with mild (*n*=6) and moderate/severe (*n*=6) TMJ dysfunction. Healthy subjects were used as controls (*n*=6). Data are expressed as mean ± SEM. **P* < 0.05 compared with control group.

5. Normas da Revista *European Journal of Pain* para publicação



European Journal of Pain

© European Pain Federation - EFIC ®



Editor-in-Chief: Luis Garcia-Larrea, Lyon, France

Impact Factor: 2.928

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 10/30
0(Anesthesiology); 64/192 (Clinical Neurology); 119/252
(Neurosciences)

Online ISSN: 1532-2149

Associated Title(s): [European Journal of Pain Supplements](#)

Author Guidelines

We would like to inform our authors that we now detect plagiarism easily. The journal to which you are submitting your manuscript employs the CrossCheck plagiarism screening system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works

Ethical policy and guidelines

European Journal of Pain encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the [International Committee of Medical Journal Editors](#).



European Journal of Pain will not consider papers that have been accepted for publication or published elsewhere. Copies of existing

manuscripts with potentially overlapping or duplicative material should be submitted together with the manuscript, so that the Editors can judge suitability for publication. The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds.

[Please read the Ethical Policies of European Journal of Pain](#)

Quick Links

[Aims and Scope](#)

[Submission Checklist](#)

[Online Submission](#) [required]

[CONSORT checklist](#) [required for RCTs in patients]

[PRISMA checklist](#) [required for systematic reviews/meta-analyses]

[Open Access payment form](#) [optional]

[Contact the Editorial Office](#)

Author Guidelines

Instructions for Authors

[Overview](#)

[Article types and content](#)

[Original articles](#)

[Review articles](#)

[Short communications](#)

[Commentaries](#)

[Letters to the editor](#)

[Randomized Controlled \(Clinical\) Trials](#)

[Qualitative studies](#)

[Open label studies](#)

[Translation of questionnaires](#)

[Studies on health economics](#)

[Case reports](#)

[Audits](#)

[Submission of manuscripts](#)

[Preparation of manuscripts](#)

[Manuscript structure and word count](#)

[Title page](#)

[Abstract](#)

[Acknowledgements](#)

[Author contributions](#)

[References](#)

[Figures](#)

[Tables](#)

[Supplementary material to be published online-only](#)

[Units & abbreviations](#)

[Drug names](#)

[Additional information on acceptance](#)

Declarations

Further editorial notes and policies

Faculty of 1000

Changes of authorship

1. OVERVIEW

Table of content of the European Journal of Pain:

1. Editorials and Commentaries
2. Position Papers and Guidelines
3. Reviews
4. Neurobiology
5. Neurology
6. Experimental Pharmacology
7. Clinical Pharmacology
8. Psychology
9. Behavioural Therapy
10. Epidemiology
11. Cancer Pain
12. Acute Pain
13. Clinical Trials
14. Letters
15. Bookshelf

Prior to submission, please ensure that your manuscript is in accordance with the author guidelines below.

Articles must be submitted online via the *European Journal of Pain* (EJP) Editorial Manager Site - <http://www.editorialmanager.com/eurjpain> (see Section 3).

Any queries regarding the scope of the journal, the preparation of manuscripts or the submission of manuscripts may be sent to the Editorial Office at ejp@meditos.de

2. ARTICLE TYPES AND CONTENT

EJP invites the following types of submission:

Original Articles

Original Articles are the journal's primary mode of communication. For purposes of presentation only, accepted Original Articles are divided into the following sections:

Neurobiology
Neurology
Experimental Pharmacology
Clinical Pharmacology
Psychology
Behavioural Therapy
Epidemiology
Cancer Pain

Acute Pain Clinical Trials

Original articles must include a structured abstract and **bulleted statements** in answer to the following questions: 'what's already known about this topic?' and 'what does this study add?' (see Section 4).

Review Articles

The journal aims to publish concise, topical, high-quality Review Articles of recent advances in laboratory or clinical research. Review Articles may be solicited by the Editor-in-Chief or may be submitted by authors. Any topic will be considered, but priority will be given to those addressing a major current problem and those with up-to-date literature reviews. All Review Articles are subject to peer-review.

Review articles must include a structured abstract. For the narrative abstract, the paragraph 'database' is required, information about "data treatment" can be left out. Review articles must include bulleted statements in answer to the following questions 'database?' and 'what does this review add?' (see Section 4).

Submission of a completed [PRISMA checklist](#) is required for all systematic reviews/meta-analyses.

Short Communications

Short Communications typically describe completed laboratory or clinical work. The guidelines for the preparation of Short Communications are the same as those for Original Articles, as far as applicable. The abstract is limited to 250 words and the body of the article should not exceed three printed pages. Full length articles are preferred and Short Communications will only be accepted if they are of broad interest. Generally, no pilot studies or preliminary results will be accepted.

Commentaries

Commentaries may provide opinion on published findings or on topics pertinent to the community of pain practitioners and researchers. Commentaries are typically commissioned by the Editors. However, suggestions for such articles are welcomed and should be directed to the Editorial Office. A commentary on a paper accepted or already published by *EJP* must cite the primary article.

Letters to the Editor

Letters to the Editor may be in response to issues arising from recently published articles, or as an exception, short, free-standing pieces expressing an opinion. Letters to the Editor should be formatted in one continuous section and should not exceed one printed page (800 words and 10 references). All letters are subject to peer-review.

Letters in response to a previously published article must cite the original article. At the Editors' discretion, a letter may be sent to authors of the original paper for comment, and both letter and reply may be published together.

Randomized Controlled (Clinical) Trials

Manuscripts reporting randomised controlled trials [RCTs] must follow the **CONSORT** statement. RCTs will not be considered by *EJP* without submission of a completed **CONSORT checklist**. In addition, authors should consider describing the outcome measures following the IMMPACT recommendations (Dworkin et al., *Pain* 2005:113;9–19). For clinical trials the Clinical Study Registration Numbers has to be given. Please add this information at the end of your manuscript, before the reference list.

Qualitative Studies

While *EJP* has a strong focus on quantitative research, qualitative studies are also published. However, qualitative reports will only be considered for publication if they address research questions which are new or have not been extensively addressed in the empirical-quantitative literature. The findings must provide new insights.

Open Label Studies

Open label studies are occasionally considered if the topic is particularly interesting and a controlled study was impracticable.

Translations of Questionnaires

Translations of questionnaires into another language will not be considered for publication except if the study provides information and insights that go beyond the issue of translation and are of interest for international readers. Such data include for example comprehensive validity analyses including factorial validity, divergent and convergent validity or findings with regard to the clinical usefulness of a particular questionnaire.

Studies on Health Economics

Generally this journal does not publish papers on economical aspects of particular forms of pain treatments.

Case reports

Single case reports are very rarely published, series of case reports might be published if they are of broad interest.

Audits

Audits are not published in the European Journal of Pain.

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

All submissions should be made online at the *EJP* Editorial Manager site -<http://www.editorialmanager.com/eurjpain>. New users will be

required to register and create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Centre.

4. PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts must be written in English.

Manuscript text must be saved in Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf). Please do not submit text in PDF format (.pdf).

Due to space restrictions and a better readability papers generally should not exceed ten typeset pages (780 words/page, 32 references/page, including figures and tables). *EJP* can publish additional material as "supporting material" with a special link guiding from the manuscript to this material. Authors are encouraged to take advantage of the online-only publication option.

Suggestions for the cover inset are invited. The illustration may be from a manuscript accepted for publication in the European Journal of Pain.

Manuscript Structure and Word Count

1) Manuscript

- Title page (see further details below)
- Abstract (should not exceed 250 words, see further details below)

- Text

- o Introduction (no subheadings, should not exceed 500 words)

- o Methods (or Literature Search Methods for Review Articles)

- o Results

- o Discussion and conclusions (should not exceed 1500 words)

- Acknowledgements
- Author contributions (see Section 6)
- References (limited to 80 for original manuscripts)
- Legends for illustrations and tables

2) Tables (to be uploaded as separate files)

3) Figures (to be uploaded as separate files)

4) Supporting material (additional material that will be published online-only, to be uploaded separately, see further details below)

Title Page

The title page should give:

1) The title of the article. Titles should be short and should not contain acronyms

2) A running head not exceeding 50 characters

3) The authors' names (initial(s) of first name(s) and last name of each author)

4) The names of the institutions at which the research was conducted, clearly linked to respective authors

5) The name, address, telephone and fax numbers, and e-mail

address of the author responsible for correspondence

6) The category for which the manuscript is being submitted (original article, review, short communication)

7) A statement of all funding sources that supported the work

8) Any conflicts of interest disclosures (see Section 6).

9) Answer to the following question (not exceeding 40 words): 'what does this study add?'. For reviews: ' what does this review add?'.

Abstract

The abstract should not exceed 250 words and should describe the background, the aims, the methods, the results and the conclusions reached. It should contain only standard abbreviations and no references. For Original Manuscripts the following subheadings are required:

- Background
- Methods
- Results
- Conclusions

For Reviews the following subheadings are required:

- Background and Objective
- Databases and Data Treatment
- Results
- Conclusions

Acknowledgements

The acknowledgements section should specify acknowledgement of technical help, but no sources of financial and material support. These should be given in the "Funding Sources" on the Title page.

Author Contributions

Authors are required to include a statement of responsibility at the end of their manuscript's text that specifies the contribution of every author (see Section 6). Please state that all authors discussed the results and commented on the manuscript.

References

If you use, e.g., Reference Manager, please note that *EJP* has adapted its reference style to the reference style of the journal *Eur J Neuroscience*. If you use, e.g., EndNote, please note that *EJP* uses the same reference style as the journal *Neuron*.

In the text: references should be cited in parentheses at the appropriate point in the text by author(s) and year in chronological order, e.g., (Mustola, 1996; Baer, 1997; Mustola and Baer, 1998; Mustola et al., 1999). If two or more references with the same first author and year are cited, use lower-case letters a, b, etc., after the year both in the text and in the reference list.

In the reference list: references to cited materials should be listed in alphabetical order at the end of the article. Please use Index Medicus

abbreviations for journal titles. Include all authors. Do not use “et al.” in the reference list.

Example for an article in a periodical:

De Peuter, S., Van Diest, I., Vansteenwegen, D. (2011). Understanding fear of pain in chronic pain: Interoceptive fear conditioning as a novel approach. *Eur J Pain* **15**,889–894.

Example for a chapter in a book:

Janes, R., Saarto, T. (2010). Oncologic therapy in cancer pain. In *Evidence-Based Chronic Pain Management*, C. Stannard, E. Kalso, J. Ballantyne, eds. (Oxford: Wiley-Blackwell) pp. 311–326.

Example for a book:

Van Zundert, J., Patijn, J., Hartrick, C. (2011). *Evidence-based Interventional Pain Practice*(Oxford: Wiley-Blackwell).

Citing and listing of Web references:

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references should be listed separately (e.g., after the reference list) under the heading "Web references".

Personal communications, manuscripts in preparation and other unpublished data should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text in parentheses.

Figures

All colour illustrations will be published free of charge.

All figures must be uploaded as separate files. Figure legends should be listed **on a separate page** in numerical order and should contain brief but comprehensible explanations.

Figures should be referred to in the text in numerical sequence as follows: Fig. 1, Figs 2–4. The place at which a figure is to be inserted in the printed text should be indicated clearly on a manuscript. Where a figure has more than one panel, each panel should be labeled in the top left-hand corner using lower case letters in parentheses i.e. '(a)', '(b)' etc., and a brief description of each panel given in the figure legend.

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce previously published figures or tables. When an individual is identifiable in a photograph written consent must be obtained. This permission must include the right to publish in electronic media.

Print publication requires high quality, EPS (lineart) or TIFF/PDF (halftone/photographs) files are preferable (though GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission). MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files

should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones: >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Detailed instructions for electronic artwork preparation may be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Tables

Tables should be referred to in the text in numerical sequence as follows: Table 1, Table 2. Each table, with an appropriate brief legend, comprehensible without reference to the text, should be typed on a separate page. For footnotes, use superscripts 'a', 'b', 'c', etc., not asterisks or other symbols.

Supporting Information

EJP encourages the submission of underlying data sets, appendices, additional figures or tables, movie files, animations, etc. as online supporting information. Supporting information should be uploaded during manuscript submission (see Section 3). Supporting information should be important ancillary information that is relevant to the parent article but which is not included in the typeset PDF but can be accessed via a link from this PDF.

To submit any material to be published as supporting material please choose the item "supporting information when uploading the files of tables or figures.

Please use the following terms:

- for tables: "tableS1", "tableS2" etc.
- for figures: "figureS1", "figureS2" etc. The figure legends should be included in the figure's file.
- for parts of the manuscript's text: "methodsS1", "resultsS1", "discussionS1" or "AppendixS1" (please note that it is not possible to publish additional material for the introduction)
- please indicate and cite clearly in your manuscript the supporting information using the terms given above.

Units & Abbreviations

Measurements of length, height and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, litre). Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressures in millimetres of mercury or kPa with the alternative units in parentheses. All other measurements including laboratory measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI).

Abbreviations should be limited and defined after the first use of the term.

Drug Names

Generic names of drugs should be used where possible. When quoting from specific materials on proprietary drugs, authors must state in parentheses the name and address of the manufacturer.

5. ADDITIONAL INFORMATION ON ACCEPTANCE

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For Authors Signing the Copyright Transfer Agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For Authors Choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit:

<http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Proofs

Page proofs will be sent electronically to the corresponding author and should be returned within 3 days of receipt to the Production Editor. Significant textual alterations are unacceptable at proof stage without the written approval of the Editor, and they are likely to result in the delay of publication.

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a secure web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. In the absence of the corresponding author, please arrange for a colleague to access the e-mail to retrieve the proofs.

Please note that you have final responsibility for what is stated in the proofs of your manuscript. However, the proofs are checked thoroughly by the *EJP* editorial team and if we do not receive corrections after several automated reminders to the email address supplied for the corresponding author then we will assume that we have your approval for publication.

Early View

EJP is covered by the publisher's Early View service. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made subsequent to Early View publication. Early View articles can be cited and tracked by DOI.

Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made

publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

6. DECLARATIONS

Original Publication

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. The author must supply a full statement to the Editor-in-Chief about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work.

Conflicts of Interest

Authors are responsible for disclosing all financial and personal relationships between themselves and others that might be perceived by others as biasing their work. To prevent ambiguity, authors must state explicitly whether potential conflicts do or do not exist.

Ethics

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Do not use patients' names, initials or hospital numbers, especially in illustrative material. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on, the care and use of laboratory animals was followed. A statement describing explicitly the ethical background to the studies being reported should be included in all manuscripts in the Methods section. Ethics committee or institutional review board approval should be stated.

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Identifying details should be omitted if they are not essential but patient data should never be altered or falsified in an attempt to attain anonymity. Complete anonymity is difficult to achieve and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity.

Authorship

All persons designated as authors should qualify for authorship and all those who qualify should be listed. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. One or more authors should take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception

to published article. Authorship credit should be based only on 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published. Conditions 1, 2 and 3 must all be met. Acquisition of funding, the collection of data or general supervision of the research group, by themselves, do not justify authorship. All others who contributed to the work who are not authors should be named in the Acknowledgements section.

Committee on Publication Ethics (COPE)

As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE), adherence to these submission criteria is considered essential for publication in *EJP*; mandatory fields are included in the online submission process to ensure this. If, at a later stage in the submission process or even after publication, a manuscript or authors are found to have disregarded these criteria, it is the duty of the Editor-in-Chief to report this to COPE. COPE may recommend that action be taken, including but not exclusive to, informing the authors' professional regulatory body and/or institution of such a dereliction.

The website for COPE may be accessed at: <http://www.publicationethics.org.uk>

7. FURTHER EDITORIAL NOTES & POLICIES

Faculty of 1000

An overly extensive overlap of a submitted paper with a publication in the database of the "Faculty of 1000" might lead to rejection of the paper.

Changes of Authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts.

Before the accepted manuscript is published online: requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Editorial Manager or the Production Editor by the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Editorial Manager or the Production Editor to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) the Editorial Manager or Production Editor will inform the Editors of any such requests and (2) publication of the

accepted manuscript online will be suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published online: any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

5. Outros Anexos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**CEUMA Universidade
Pró-Reitoria
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Mestrado em Odontologia
Área de Concentração – Odontologia Integrada**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Comitê de Ética em pesquisa do CEUMA Universidade

Endereço: Rua Josué Montello, nº 01 – Renascença II – CEP: 65075-120 – São
Luis/MA

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

TÍTULO - RELAÇÃO ENTRE AS ALTERAÇÕES DAS CÉLULAS IMUNES CIRCULANTES E A EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO ANQUIRINA 1 (TRPA1)

Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa que se destina a avaliar a expressão do receptor bioquímico TRPA1, que é um importante elemento de mediação da dor, principalmente nas de origem inflamatória. Este estudo é importante por que vai determinar se é possível estabelecer o grau de severidade da disfunção da articulação temporomandibular (ATM) através da pesquisa de TRPA1, através do exame de sangue e saliva, e encaminhar para tratamento.

O estudo será feito da seguinte maneira: os pacientes serão selecionados de acordo com a gravidade da disfunção da articulação temporomandibular que apresentarem. Será realizada coleta de sangue e saliva dos participantes clínica odontológica da FAHESA/ITPAC para análise dos níveis de TRPA1.

Existe um pequeno incômodo no momento da coleta do exame, pela picada da agulha e pelo fato de ficarem por cerca de 5 a 10 minutos com o aparato de coleta de saliva. O risco de infecção é desprezível, pois a coleta de sangue será realizada por profissionais habilitados e com materiais descartáveis do laboratório responsável (Analisys). Você contará com a assistência do pesquisador se necessário, em todas as etapas de sua participação no estudo.

Os benefícios que você deverá esperar com a sua participação, mesmo que indiretamente serão: a determinação de um possível método de pesquisa da severidade das disfunções de ATM, que é um importante prognóstico da doença, e também o tratamento da presente disfunção, através do Grupo de Estudo de Disfunção de ATM da FAHESA/ITPAC.

Sempre que você desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, você poderá recusar a continuar participando do estudo e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que para isto sofra qualquer penalidade ou prejuízo, ou seja sem qualquer prejuízo da continuidade do seu tratamento no supracitado Grupo.

Será garantido o sigilo quanto a sua identificação e das informações obtidas pela sua participação, exceto aos responsáveis pelo estudo, e a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Você será indenizada por qualquer despesa que venha a ter com sua participação nesse estudo e, também, por todos os danos que venha a sofrer pela mesma razão, sendo que, para essas despesas estão garantidos os recursos.

Pesquisador responsável
Prof^a. Dr^a. Elizabeth Soares
Fernandes
Contato: (98) 3214-4124/4217

Pesquisador responsável
Rufino José Klug
Contato (63) 92278488

São Luis, ____/____/____

Assinatura do sujeito ou responsável
CPF: _____

**RESEARCH DIAGNOSTIC CRITERIA FOR
TEMPOROMANDIBULAR DISORDERS: Axis I (Critérios para
Diagnóstico em Pesquisa para Desordens
Temporomandibulares – Eixo I)**

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Data de Nascimento: _____

Data do Exame: _____ Peso: _____ Altura: _____

1) Você apresenta algum destes sintomas?

Estalo	SIM	NÃO
Ranger de dentes	SIM	NÃO
Mordida desconfortável	SIM	NÃO
Barulho no ouvido	SIM	NÃO
Rangido diurno	SIM	NÃO
Rangido noturno	SIM	NÃO
Rigidez matinal da articulação	SIM	NÃO

2) Você já teve dor na face, nas têmporas, nos maxilares, na frente do ouvido ou no ouvido no mês passado?

NÃO (0)

SIM (1)

3a) Você já teve algum travamento articular de forma que impediu de abrir a boca durante todo o trajeto?

NÃO (0)

SIM (1)

SE SUA RESPOSTA FOI SIM:

3b) Esta limitação de abertura foi severa a ponto de interferir na sua capacidade de mastigar?

NÃO (0)

SIM (1)

4) Você apresenta ou já apresentou ou apresenta dor em qualquer articulação que não seja as articulações perto dos seus ouvidos (ATM)?

NÃO (0)

SIM (1)

SE SUA RESPOSTA FOI SIM:

4b) É uma dor persistente que você vem tendo há pelo menos um ano?

NÃO (0)

SIM (1)

EXAME FÍSICO

1) Você tem dor do lado direito, lado esquerdo ou ambos os lados em sua face?

Em nenhum dos lados (0)	Do lado direito (1)	Do lado esquerdo (2)	Em ambos os lados (3)
-------------------------	---------------------	----------------------	-----------------------

2) Você poderia apontar as áreas onde você sente dor?

LADO DIREITO		LADO ESQUERDO	
Nenhuma	0	Nenhuma	0
Articulação	1	Articulação	1
Músculos	2	Músculos	2
Ambos	3	Ambos	3

Obs.: o examinador apalpa a área caso não esteja claro se a dor é muscular ou articular

3) Padrão de abertura:

Sem desvio	0
Desvio lateral direito (sem correção)	1
Desvio lateral direito (com correção – “S”)	2
Desvio lateral esquerdo (sem correção)	3
Desvio lateral esquerdo (com correção – “S”)	4
Outro: _____	5

4) Extensão de movimento vertical: (incisivos utilizados 11 e 21 até antagonista)

- a. Abertura passiva sem dor _____ mm
- b. Abertura máxima passiva _____ mm
- c. Abertura máxima ativa _____ mm
- d. Trespasse vertical incisal _____ mm

TABELA PARA OS ITENS “b” e “c” SOMENTE

DOR MUSCULAR				DOR ARTICULAR			
Nenhu ma	Direit a	Esquer da	Amb os	Nenhu ma	Direit a	Esquer da	Amb os
0	1	2	3	0	1	2	3

5) Ruídos articulares – palpação

a. Abertura

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

Medida do estalido na abertura _____ mm

b. fechamento

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

Medida do estalido no fechamento _____ mm

c. estalido recíproco eliminado na abertura protrusiva?

	Direito	Esquerdo
Sim	0	0
Não	1	1
Não Apresenta	8	8

6) Excursões:

- a. desvio lateral direito: _____ mm
- b. desvio lateral esquerdo: _____ mm
- c. protrusão: _____ mm

TABELA PARA OS ITENS “a”, “b” e “c”.

DOR MUSCULAR				DOR ARTICULAR			
Nenhu ma	Direit a	Esquer da	Amb os	Nenhu ma	Direit a	Esquer da	Amb os
0	1	2	3	0	1	2	3

d. desvio da linha média_ em mm.

Sim	0
Não	1
Não Apresenta	8

7) Ruídos articulares nas excursões:

Ruídos à Direta

	Nenhum	Estalido	Crepitação grosseira	Crepitação fina
Desvio lateral direito	0	1	2	3
Desvio lateral esquerdo	0	1	2	3
Protrusão	0	1	2	3

Ruídos à Esquerda

	Nenhum	Estalido	Crepitação grosseira	Crepitação fina
Desvio lateral direito	0	1	2	3
Desvio lateral esquerdo	0	1	2	3
Protrusão	0	1	2	3

INSTRUÇÕES – ITENS 8 a 10

8) Circule o número que corresponde à quantidade de dor que você sente. Nós gostaríamos que você fizesse uma classificação separada para os lados direito e esquerdo.

0	Sem dor / somente pressão
1	Dor leve

2	Dor moderada
3	Dor severa

MÚSCULO	DIREITO	ESQUERDO
Temporal (anterior)	0 1 2 3	0 1 2 3
Temporal (médio)	0 1 2 3	0 1 2 3
Temporal (posterior)	0 1 2 3	0 1 2 3
Masseter (origem)	0 1 2 3	0 1 2 3
Masseter (ventre)	0 1 2 3	0 1 2 3
Masseter (inserção)	0 1 2 3	0 1 2 3
Digástrico	0 1 2 3	0 1 2 3
Região submandibular	0 1 2 3	0 1 2 3
Frontal	0 1 2 3	0 1 2 3
Trapézio	0 1 2 3	0 1 2 3
Metade do trapézio	0 1 2 3	0 1 2 3

9) Dor articular com palpação

ATM	DIREITO	ESQUERDO
Polo lateral (por fora)	0 1 2 3	0 1 2 3
Ligamento posterior (dentro do ouvido)	0 1 2 3	0 1 2 3

10) Dor intra-oral muscular com palpação

MÚSCULO	DIREITO	ESQUERDO
Área do pterigoideo lateral	0 1 2 3	0 1 2 3
Tendão do temporal	0 1 2 3	0 1 2 3

RESUMO DE ACHADOS SUBJETIVOS DO PACIENTE – EIXO I – PARTE FÍSICA

DIAGNÓSTICO EIXO I

Grupo I – Desordem muscular (Circule somente uma resposta para o Grupo I)

- dor miofacial (Ia): H3, AS, 1, 8, 10
- dor miofacial com abertura limitada (Ib): Ia + 4a, 4c, 4d
- nenhum diagnóstico no grupo

Grupo II – Deslocamento discal (assinale somente uma resposta para cada articulação no grupo)

Condição articular	Itens	ATM D	ATM E
--------------------	-------	-------	-------

a)Deslocament de disco com redução (IIa)	AC, 5a, 5b, 7		
b)Deslocamento de disco sem redução, com limitação de abertura (IIb)	H14, AC, 6a, 6b, 6d, 4b, 4c, 4d, 5, 7, + IIa		
c)Deslocamento de disco sem redução sem limitação de abertura (IIc)	H14, 4b, 4c, 4d, 6 a, 6b, 6d, 7 + RNM		
d)Nenhum diagnóstico da articulação no grupo II			

Grupo III – Outras condições articulares (assinale somente uma resposta para cada articulação no grupo)

Condição articular	Itens	ATM D	ATM E
a)Artralgia (IIIa)	AC, 2, 9, 4b, 4c, 4d, 6a, 6b, 7		
b)Osteoartrite (IIIb)	IIIa+AC5,7+ Crepitação		
c)Osteoartrose (IIIc)	Sem IIIa + AC 5,7 + crepitação		
d)Nenhum diagnóstico da articulação no grupo II			