



UNIVERSIDADE CEUMA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA
E EXTENSÃO
PÓS GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU*
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

RUFINO JOSÉ KLUG

**NÍVEIS SÉRICOS E SALIVARES DE 4-HNE, CORTISOL E IG A EM
PACIENTES COM DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR: UM
ENSAIO CLÍNICO**

São Luis

2014



**UNIVERSIDADE CEUMA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA
E EXTENSÃO
PÓS GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU*
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

RUFINO JOSÉ KLUG

**NÍVEIS SÉRICOS E SALIVARES DE 4-HNE, CORTISOL E IG A EM
PACIENTES COM DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR: UM
ENSAIO CLÍNICO**

Dissertação apresentada como quesito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração Odontologia Integrada, da Universidade CEUMA.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabeth Soares Fernandes

Co-Orientadores: Prof^a Dr^a Luciana Salles Branco de Almeida e Prof. Dr. Marcos André dos Santos da Silva.

São Luís

2014

RUFINO JOSÉ KLUG

**NÍVEIS SÉRICOS E SALIVARES DE 4-HNE, CORTISOL E IG A EM
PACIENTES COM DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR: UM
ENSAIO CLÍNICO**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ODONTOLOGIA,
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ODONTOLOGIA INTEGRADA

Prof^a Dr^a Elizabeth Soares Fernandes

Presidente e Orientadora

Prof^a Dr^a Maria do Socorro de Sousa Cartagenes

1^o Examinadora

Prof Dr Rudys Rodolfo de Jesus Tavares

2^a Examinadora

São Luís/MA, 10 de março de 2014.

DADOS CURRICULARES

Rufino José Klug

NASCIMENTO – Ibaiti/PR, em 26 de fevereiro de 1975.

FILIAÇÃO – Rufino Klug e Leoni Aparecida Sene

FORMAÇÃO ACADÊMICA E ATIVIDADES PROFISSIONAIS

1993-1997 Graduação em Odontologia – Universidade de Marília (UNIMAR), em Marília/SP.

1997-2000 Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pela Associação Hospitalar de Bauru, Hospital de Base da 7ª Região, Bauru/SP.

2001-atual Professor do Curso de Odontologia da Faculdade de Ciências Humanas, Econômicas e da Saúde do Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos (FAHESA/ITPAC) em Araguaína/TO.

2001-atual Cirurgião Bucomaxilofacial do Regional Público de Araguaína (Concursado desde 2005), em Araguaína/TO.

2007-atual Professor Convidado dos Cursos de Especialização em Ortodontia e Radiologia da Fundação Universidade de Gurupi (CESTEP-UNIRG), posteriormente encampado pela Faculdade de Ciências do Tocantins (FACIT), em Araguaína/TO.

- 2008-2010* Especialização em Implantodontia – Fundação Universidade de Gurupi (UNIRG), Campus de Araguaína, em Araguaína/TO.
- 2010-atual* Professor Efetivo e Coordenador dos Estágios Hospitalares do Curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Fundação Universidade de Gurupi (CESTEP-UNIRG), posteriormente encampado pela Faculdade de Ciências do Tocantins (FACIT), em Araguaína/TO.
- 2011-atual* Coordenador do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e do Centro de Reabilitação de Anomalias da Face do Tocantins (CRAFT), do Hospital Regional Público de Araguaína, em Araguaína/TO.
- 2012-atual* Mestrado em Odontologia, Área de Concentração Odontologia Integrada – Universidade CEUMA, em São Luiz/MA.
- 2013-atual* Professor do Curso de Odontologia da Faculdade de Ciências do Tocantins (FACIT), em Araguaína/TO.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha esposa, Karinna e ao meu filho Arthur, simplesmente por fazerem minha vida cada dia melhor, em tudo.

À minha mãe, Leoni Aparecida Sene e, em especial, meu pai, Rufino Klug (in memoriam) pelas oportunidades que me ofereceram, para que eu crescesse e pudesse construir meu próprio caminho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

Aos meus Co-Orientadores, Prof^a Dr^a Luciana Salles Branco de Almeida e Prof Dr Marcos André dos Santos da Silva, que também participaram de maneira fundamental na construção desta dissertação.

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

AGRADECIMENTOS

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

Ao Programa de Mestrado em Odontologia, nas pessoas dos Profs Drs Matheus Coelho Bandeca e Marcos André dos Santos da Silva, 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.

A FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica), pelo apoio à pesquisa realizada neste trabalho.

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

Aos colegas de Mestrado, Murilo Gabi Neves, Fabrício Viana Pereira Lima, Mayana Soares Vieira, Amanda Martins Calixto e Giselly Bezerra, 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.

Aos colegas do Mestrado em Biologia Parasitária, da Universidade CEUMA, pelo apoio durante minha pesquisa laboratorial, participando ativamente desta importante parte.

KLUG, Rufino José. **NÍVEIS SÉRICOS E SALIVARES DE 4-HNE, CORTISOL E IG A EM PACIENTES COM DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR: UM ENSAIO CLÍNICO**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Odontologia Integrada). Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade CEUMA.

RESUMO

As disfunções temporomandibulares (DTM) afetam as articulações e/ou músculos mastigatórios em cerca de 8 a 10% da população, gerando dor e limitação funcional. Atualmente, o diagnóstico da DTM é realizado através de exame clínico e imagiologia, passíveis de subjetividade e/ou falta de precisão. Assim, existe uma carência de marcadores efetivos de severidade de DTM. Este estudo tem por objetivo quantificar os níveis de 4-HNE, Ig A e cortisol sérico e salivar, em diferentes graus de DTM em pacientes provenientes de serviços públicos de saúde. A amostra compôs-se de 37 pacientes divididos em: grupo experimental (26 pacientes) e controle (11 pacientes). O grupo experimental foi subdividido em DTM leve, moderada e severa. Ainda, a população de células sanguíneas também foi avaliada, em especial a série branca. Os resultados demonstram que dentre os marcadores avaliados, somente os níveis salivares de 4-HNE parecem estar relacionados a severidade da DTM, sendo que pacientes com disfunção moderada/grave apresentam níveis aumentados deste mediador. Ainda, o número de monócitos circulantes encontra-se aumentado em pacientes com DTM, estando mais elevados

naqueles com DTM leve. Estes resultados sugerem que o acompanhamento nos níveis de 4-HNE, associados ao hemograma, podem ser utilizados como ferramentas de suporte ao diagnóstico e prognóstico da DTM. No entanto, mais estudos são necessários para que se possa entender melhor os fatores que possam interferir com a precisão destes testes quando empregados em larga escala no cotidiano do consultório.

Palavras-Chave: Disfunção Temporomandibular, 4-HNE, Cortisol, IgA, Leucócitos

KLUG, Rufino José. **SERUM AND SALIVARY LEVELS OF 4-HNE, IG A AND CORTISOL IN PATIENTS WITH TEMPOROMANDIBULAR JOINT DISORDERS: A CLINICAL STUDY**. 2014. 70 p. Dissertation (Master in Dentistry – Integrated Dentistry). Pos Graduate Program in Dentistry – CEUMA University

ABSTRACT

Temporomandibular Joint Dysfunction Syndrome (TMD) affect the joints and/or masticatory muscles in about 8-10 % of the population, causing pain and functional limitation. Currently, the diagnosis of TMD is through clinical examination and imaging of temporomandibular joint, liable to subjectivity and/or lack of precision. Thus, there is few effective markers of severity of TMD. The aim of this study is to quantify the salivary and serum levels of 4-HNE, Ig A and cortisol in different degrees of TMD in patients from public health services. The sample consisted of 37 patients divided into experimental group (26 patients) and control group (11 patients). The experimental group divided into mild, moderate and severe TMD. Furthermore, the population of blood cells was also assessed, especially white cells. The results show that markers evaluated, only the salivary levels of 4-HNE may related to severity of TMD patients with moderate/severe dysfunction, showing increased levels of this mediator. Similarly, the number of circulating monocytes increased in patients with mild and moderate/severe TMD, being higher in patients with mild TMD. These results suggest that monitoring the levels of 4-HNE associated with the higher monocytes number, may be used to support diagnostic and prognostic tools TMD.

However, more studies needed so that we can better understand the factors that may interfere with the accuracy of these tests when used in large scale in daily practice.

Keywords:, 4 - HNE, Cortisol, IgA, Leukocytes, Temporomandibular Joint Dysfunction Syndrome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE – 4 hidróxi-2-nonenal ou 4-hidróxinonenal

Anti-CCP – *Anti-cyclic citrullinated peptides* (anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado)

ATM – Articulação temporomandibular

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

COX - Cicloxigenase

DTM – Disfunção temporomandibular

IgA – Imunoglobulina A

IL – Interleucina

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

RDC/TMD – *Research Diagnostic Criteria/Temporomandibular Dysfunction* (Critérios para Pesquisa de Diagnóstico/Disfunção Temporomandibular)

TNF- α – *Tumoral Necrosis Factor α* (Fator de Necrose Tumoral α)

TRP - *Transient receptor potential* (receptor de potencial transitório)

TRPA1 – *Transient receptor potential ankirin 1* (receptor de potencial transitório anquirina 1)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 ARTIGO.....	20
Resumo.....	21
Introdução.....	22
Métodos.....	24
<i>Pacientes.....</i>	24
<i>Avaliação Radiográfica.....</i>	25
<i>Quantificação dos Níveis de 4-HNE, Cortisol e IgA.....</i>	26
<i>Análise Estatística.....</i>	26
Resultados.....	26
Discussão.....	28
Agradecimentos.....	33
Conflito de Interesses.....	34
Tabelas.....	35
Figuras.....	38
Referências.....	44
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
ANEXOS.....	53

1 INTRODUÇÃO

As disfunções temporomandibulares (DTM) incluem um grupo de alterações que atingem a articulação temporomandibular, os músculos mastigatórios ou ambos, resultando em dor, ruídos articulares e alterações do movimento mandibular, sendo também considerada a causa mais comum de dor não odontológica na região orofacial atingindo cerca de 8% a 10% da população [4, 20, 26, 27].

Estudos sugerem que cerca de 8% da população apresentou algum tipo de disfunção temporomandibular ou dor orofacial nos últimos 6 meses e que 6% das mulheres e 3% dos homens nos Estados Unidos da América apresentaram algum tipo de dor relacionada à disfunção temporomandibular. Entretanto a variabilidade de resultados é grande, que vão de 2% a 56% de prevalência na dor da articulação temporomandibular (ATM) e de 17 a 97% de dor muscular da região orofacial [20,25,36].

Além disso, existe uma carência de estudos que delimitem ferramentas capazes de indicar o grau de severidade e a evolução desta doença com maior precisão. Atualmente, a identificação da DTM e o acompanhamento de sua evolução são realizados quase que exclusivamente através de avaliação clínica associada a exames de imagem [25,41].

Nas artrites bem como nas DTM, a dor usualmente é de origem inflamatória, e estudos recentes vem buscando propor o uso da quantificação de marcadores inflamatórios para auxiliar no diagnóstico e prognóstico precisos da DTM, como por exemplo, o cortisol e a IgA. No entanto, estes estudos são recentes e ainda contraditórios [37,42].

Dentro da multiplicidade de fatores etiológicos das DTM se inclui o estresse, sendo inclusive comumente deixado de lado por clínicos em favor de aspectos físicos, exclusivamente [20]. Isto pode ser um fator importante para o insucesso do tratamento, visto que a catastrofização da dor e prognóstico são elementos que atrapalham a cooperação às terapias com consequentes resultados negativos para o tratamento [18,26,29].

É sabido que nas situações de estresse pode ocorrer um aumento na secreção de cortisol, em nível salivar ou circulatório [19,26,29,32] e isto pode estar associado a fatores individuais, que são sujeitos a influências extrínsecas, como experiência de dor ou trauma, ou intrínsecas, por desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal [28,39].

Há indicação de que a hipersecreção do cortisol é um elemento iniciador ou perpetuador da DTM, assim como existem estudos demonstrando que também induz alterações anatômicas na ATM [19,31,32,36,45]. Por outro lado, estudos sugerem que a relevância deste mediador na DTM estaria associado a quadros de estresse físico/mental e não estaria indicado para ser utilizado como marcador de doença em pacientes que não encontram-se nesta situação [19,31,32].

Outro elemento bioquímico importante para as doenças articulares são as imunoglobulinas, em especial para o nosso trabalho, a imunoglobulina A (Ig A). As Ig A desempenham um papel importante na defesa imune dos indivíduos, como por exemplo na ativação do sistema de complemento, mas também podem ser fundamentais para o desenvolvimento de situações patológicas, como a artrite [38].

Estudos sugerem que a avaliação dos níveis de IgA para o diagnóstico da DTM pode ser promissora, mas no entanto, existem poucos estudos deste mediador

em pacientes com DTM. Sugere-se que com relação a artrite, anticorpos do tipo IgA, como por exemplo o anti-CCP encontram-se associados a casos de baixa severidade da doença ^[37]. Por outro lado, outros estudos sugerem um papel deletério para a IgA no contexto da DTM, podendo esta ativar vias inflamatórias no espaço sinovial e assim propagar o quadro inflamatório na articulação, aumentando assim sua severidade ^[8,42].

Os receptores de potencial transitório (TRP; da sigla *Transient Receptor Potential*) são canais iônicos não seletivos que medeiam a dor e inflamação ^[17]. Dentre eles, encontra-se o TRPA1 (receptor de potencial transitório anquirina 1), que é ativado por agonistas exógenos e endógenos, sendo destes últimos especialmente importantes as espécies reativas de oxigênio e metabólitos da peroxidação lipídica, como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) ^[8,28,40].

O 4-HNE é um importante marcador biológico que tem sido utilizado em diversas pesquisas, pois está associado a mecanismos fisiológicos e patológicos do nosso organismo, tais como o câncer, a doenças neurodegenerativas e autoimunes, além da inflamação ^[6,44].

O 4-HNE é um metabólito que possui habilidade para se difundir para os tecidos circundantes, sendo considerado um mensageiro do processo inflamatório ^[6,21,35,40,43]. O 4-HNE é produzido durante o processo inflamatório e pouco se conhece sobre a sua atuação nos elementos celulares articulares, mas já se verificou sua atividade quimiotática para células inflamatórias que produzem formas reativas de oxigênio e aumentam a concentração no líquido sinovial deste metabólito, que conseqüentemente induzem alterações patológicas articulares ^[40]. Estudos recentes vem implicando que a ativação do receptor TRPA1 está

diretamente relacionado a progressão da dor inflamatória articular ^[11]. Além disso, produtos de peroxidação lipídica são capazes de causar dor e inflamação ^[14]. Ainda, sugere-se que esses subprodutos, bem como as formas reativas de oxigênio e estão envolvidos na artrite, produzindo destruição dos elementos articulares ^[5,12,13].

A hipótese de trabalho deste estudo é que a expressão destes elementos bioquímicos nos pacientes portadores de DTM esteja marcadamente aumentada, servindo como elementos de diagnóstico e prognóstico destas disfunções articulares.

Por isto serão quantificados o cortisol e a IgA, que recentemente tem sido associados à DTM, pois todos estes elementos bioquímicos vem, recentemente e frequentemente, sendo associados a quadros de dor inflamatória. Desta forma, o objetivo deste estudo é quantificar a expressão do 4-HNE, cortisol e IgA com a severidade da DTM em pacientes portadores desta situação clínica, sendo importante a avaliação do 4-HNE pelo fato de estar comumente associado a doenças articulares pela ativação do TRPA1, verificando sua aplicabilidade como ferramenta de diagnóstico e/ou prognóstico desta síndrome

2 ARTIGO

Versão em Português

NÍVEIS SÉRICOS E SALIVARES DE 4-HNE, CORTISOL E IG A EM PACIENTES COM DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR: UM ENSAIO CLÍNICO

KLUG RJ¹, ALMEIDA LSB², SILVA MAS¹, BRAIN SD³, FERNANDES ES^{1,3}

¹UniCeuma, PPG Odontologia, Josué Montello, Renascença II, São Luís, MA, 65075-120, Brasil.

²Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Brasil

³Cardiovascular Division, Franklin-Wilkins Building, King's College London, Waterloo Campus, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, Reino Unido

Artigo formatado de acordo com as normas da revista PAIN.

Autor para correspondência:

Prof. Elizabeth S. Fernandes

UniCEUMA

PPG Odontologia

Rua Josué Montello, no 1, Renascença II

São Luís, MA, Brasil

65075-120

elizabeth.soares@ceuma.br

Resumo

As disfunções temporomandibulares (DTM) afetam as articulações e/ou músculos mastigatórios em cerca de 8 a 10% da população, gerando dor e limitação funcional. Atualmente, o diagnóstico da DTM é realizado através de exame clínico e imagiologia, passíveis de subjetividade e/ou falta de precisão. Assim, existe uma carência de marcadores efetivos de severidade de DTM. Este estudo tem por objetivo quantificar os níveis de 4-HNE, Ig A e cortisol sérico e salivar, em diferentes graus de DTM em pacientes provenientes de serviços públicos de saúde. A amostra compôs-se de 37 pacientes divididos em: grupo experimental (26 pacientes) e controle (11 pacientes). O grupo experimental foi subdividido em DTM leve, moderada e severa. Ainda, a população de células sanguíneas também foi avaliada, em especial a série branca. Os resultados demonstram que dentre os marcadores avaliados, somente os níveis salivares de 4-HNE parecem estar relacionados a severidade da DTM, sendo que pacientes com disfunção moderada/grave apresentam níveis aumentados deste mediador. Ainda, o número de monócitos circulantes encontra-se aumentado em pacientes com DTM, estando mais elevados naqueles com DTM leve. Estes resultados sugerem que o acompanhamento nos níveis de 4-HNE, associados ao hemograma, podem ser utilizados como ferramentas de suporte ao diagnóstico e prognóstico da DTM. No entanto, mais estudos são necessários para que se possa compreender melhor os fatores que possam interferir com a precisão destes testes quando empregados em larga escala no cotidiano do consultório.

Palavras-Chave: Disfunção Temporomandibular, 4-HNE, Cortisol, IgA, Leucócitos

Introdução

As disfunções temporomandibulares incluem um grupo de alterações que atingem a articulação temporomandibular, os músculos mastigatórios ou ambos, resultando em dor, ruídos articulares e alterações do movimento mandibular, sendo também considerada a causa mais comum de dor não odontológica na região orofacial atingindo cerca de 8% a 10% da população [4, 20, 26, 27].

A variabilidade de diagnóstico atinge números muito variáveis, de 2% a 56% de prevalência na dor da articulação temporomandibular (ATM) e 17 a 97% de dor muscular da região orofacial, gerando um problema tanto na precisão do diagnóstico quanto do prognóstico desta síndrome [23,24].

Além disso, existe uma carência de estudos que delimitem ferramentas capazes de indicar o grau de severidade e a evolução desta síndrome com maior precisão. Atualmente, a identificação da DTM e o acompanhamento de sua evolução são realizados quase que exclusivamente através de avaliação clínica associada a exames de imagem, os quais podem estar sujeitos a vieses de interpretação [25,41].

Nas artrites bem como nas DTM, a dor usualmente é de origem inflamatória, e estudos recentes vem buscando propor o uso da quantificação de marcadores inflamatórios para auxiliar no diagnóstico e prognóstico precisos da DTM, como por exemplo, o cortisol e a IgA. No entanto, estes estudos são recentes e ainda contraditórios [37,42].

Tem sido sugerido que a hipersecreção do cortisol é um elemento iniciador ou perpetuador da DTM, assim como há indicação de que também induz a alterações anatômicas na ATM [19,31,32,36,45]. Por outro lado, estudos sugerem que a relevância este mediador na DTM encontra-se associado a quadros de estresse físico/mental,

não podendo ser utilizado como marcador de doença em pacientes que não encontram-se nesta situação ^[19,31,32].

Estudos demonstraram que a avaliação dos níveis de IgA para o diagnóstico da DTM pode ser promissora, mas no entanto, existem poucos estudos deste mediador em pacientes ^[8,13,30]. Sugere-se que com relação a artrite, anticorpos do tipo IgA, como por exemplo o anti-CCP encontram-se associados a casos de baixa severidade da doença ^[37]. Por outro lado, outros estudos sugerem um papel deletério para a IgA no contexto da DTM, podendo esta ativar vias inflamatórias, como por exemplo a via do complemento no espaço sinovial e assim propagar o quadro inflamatório na articulação, aumentando assim sua severidade ^[8,42].

Os receptores de potencial transitório (TRP; do inglês *Transient Receptor Potential*) são canais iônicos não seletivos que medeiam a dor e inflamação ^[17]. Dentre eles, encontra-se o TRPA1 (receptor de potencial transitório anquirina 1), que é ativado por agonistas exógenos e endógenos, sendo destes últimos especialmente importantes as espécies reativas de oxigênio e metabólitos da peroxidação lipídica, como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) ^[8,28,40].

O 4-HNE é um metabólito que possui capacidade para se difundir para os tecidos circundantes, sendo considerado um mensageiro do processo inflamatório ^[6,21,35,40,43]. O 4-HNE é produzido durante o processo inflamatório e pouco se conhece sobre a sua atuação nos elementos celulares articulares, mas já se verificou sua atividade quimiotática para células inflamatórias que produzem formas reativas de oxigênio e aumentam a concentração no líquido sinovial deste metabólito, que conseqüentemente induzem alterações patológicas articulares ^[40]. Estudos recentes tem sugerido que a ativação do receptor TRPA1 está diretamente

relacionado a progressão da dor inflamatória articular [11]. Além disso, produtos de peroxidação lipídica são capazes de causar dor e inflamação [14]. Ainda, sugere-se que esses subprodutos, bem como as formas reativas de oxigênio e estão envolvidos na artrite, produzindo destruição dos elementos articulares [5,12,13].

O objetivo deste estudo é quantificar os níveis do 4-HNE, cortisol e IgA com a severidade da DTM em pacientes portadores de DTM, sendo importante a avaliação do 4-HNE pelo fato de estar comumente associado a doenças articulares pela ativação do TRPA1, verificando sua aplicabilidade como ferramenta de diagnóstico desta síndrome. Concomitantemente, serão quantificados o cortisol e a IgA, que recentemente tem sido associados à DTM, sendo que todos estes elementos bioquímicos estão recentemente e frequentemente associados a quadros de dor inflamatória.

Métodos

Pacientes

Como se trata de pesquisa com seres humanos, em obediência à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, a presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade CEUMA, sendo aprovada sob o número 264.629 de 29/04/2013 (Anexo A). Os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo D).

A pesquisa foi um estudo experimental por ensaio clínico, transversal, onde os pacientes voluntários foram examinados, através dos Critérios de Diagnóstico em Pesquisa para Disfunções Temporomandibulares (RDC/TMD, do inglês *Research Diagnostic Criteria/Temporomandibular Dysfunction*) e classificados em Grupo 1-

pacientes com disfunções musculares; Grupo 2 – pacientes com disfunções do deslocamento do disco, Grupo 3 – pacientes com distúrbios articulares; e Grupo 4 - pacientes sem alterações (controle), observando os critérios descritos no trabalho de Manfredini et al ^[26] e sumarizados na Tabela 1.

Pacientes gestantes, pacientes com dentição decídua ou mista, pacientes com histórico recente de infecção e/ou sob uso de anti-inflamatórios, e portadores de artrite reumatoide ou osteoartrite em outras articulações que não a ATM, foram excluídos da pesquisa; uma vez que estas alterações podem afetar os resultados.

Uma vez classificados nos grupos do RDC/TMD, os pacientes foram separados de acordo com a severidade da DTM (Tabela 1) e submetidos à coleta de sangue e saliva. As amostras de sangue foram submetidas a análise de hemograma para contagem de leucócitos totais e diferenciais. Ainda, amostras de soro foram obtidas dos mesmos pacientes, congeladas e mantidas em freezer -70°C para análise posterior.

Utilizou-se as radiografias panorâmicas para avaliação das ATM's em virtude deste exame de imagem ser um dos mais comumente utilizados para avaliação radiográfica inicial das disfunções temporomandibulares, sendo também de amplo acesso pela população.

Avaliação Radiográfica

As tomadas radiográficas foram realizadas em aparelhos digitais, seguindo os padrões normais de posicionamento e exposição radiográfica, exibindo ambas as ATM's dos pacientes. As radiografias também foram recortadas nos seguintes limites: limite superior – tangente a borda superior do arco zigomático; limite inferior – porção superior do forame mandibular; limite posterior – margem radiográfica do

lado analisado ou na metade do meato acústico; limite anterior – porção mais inferior da incisura mandibular; e avaliadas por avaliadores "cegos" especialistas em radiologia com experiência profissional superior a cinco anos. Cada imagem foi analisada separadamente conforme metodologia adaptada de Honey et al ^[16]. As imagens foram avaliadas em relação a presença ou não de alteração condilar, e em caso positivo, com relação ao tipo de alteração condilar existente.

Quantificação dos níveis de 4-HNE, Cortisol e IgA

Os níveis de 4-HNE (Cell Biolabs Inc., San Diego, EUA), cortisol (R&D Systems, Brasil) e IgA total (Bethyl Laboratories, EUA) foram quantificados através kits de Elisa, conforme instruções dos fabricantes. Os resultados para 4-HNE estão expressos em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) e os para IgA e cortisol, em nanogramas/ml (ng/ml).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. A avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de *P* menores do que 0,05 foram considerados como indicativos de significância.

Resultados

Foram selecionados 37 pacientes de ambos os gêneros, com uma proporção feminino masculino (F:M) aproximada de 2:1 e sua distribuição, bem como as médias de idade por grupo, podem ser verificadas na Tabela 2. A Tabela 3 demonstra os diagnósticos obtidos a partir do RDC/TMD, onde observou-se a

situação clínica mais comum a associação de dois diagnósticos, com 14 pacientes (53,84%), seguido da associação dos três grupos diagnósticos, com 7 pacientes (26,92%) e com uma apenas um diagnóstico com 5 pacientes (18,24%).

Quanto a distribuição dos diagnósticos obtidos através do RDC/TMD os pacientes com apenas um diagnóstico (n=5), a situação mais comum foi a luxação de disco articular com redução e sem limitação de abertura bucal com 3 pacientes. Nos indivíduos com dois diagnósticos (n=14), a situação mais comum foi a dor miofacial sem limitação de abertura bucal associada a luxação de disco articular com redução sem limitação de abertura bucal em 6 pacientes. Naqueles com três diagnósticos (n=7), o achado mais frequente foi a dor miofacial sem limitação de abertura bucal associada a luxação do disco articular com redução e artralgia da ATM, em 3 pacientes.

Os pacientes do grupo experimental foram distribuídos de acordo com a severidade da DTM em 15 pacientes com DTM leve e 8 pacientes com DTM moderada/severa. Optou-se pela divisão em apenas dois grupos experimentais pelo menor número de alterações moderadas e severas.

Observa-se na figura 1 que houve diferença estatisticamente significativa na abertura bucal máxima do grupo com DTM moderada/severa, onde houve uma diminuição da amplitude importante, considerando-se a abertura normal acima de 40 mm de distância interincisal ^[19].

Na avaliação radiográfica a alteração mais encontrada pelos avaliadores foi a facetação condilar (38,46%). No côndilo esquerdo a situação mais comumente citada foi a presença definitiva/provável de alteração condilar (57,69%) e a alteração radiográfica mais encontrada também foi a facetação da cabeça do côndilo

(46,15%). A Figura 2 exemplifica os tipos de alterações condilares, onde pode-se ver o aspectos radiográficos de um côndilo normal do grupo controle (A) e as alterações condilares mais comuns nos grupos com DTM leve, onde percebe-se a característica de facetação da superfície condilar (B). A perda do contorno da cortical óssea (C) é a característica mais comumente associada à DTM moderada, enquanto que a associação da facetação com a perda do contorno condilar (D) indica grande sobrecarga funcional e reabsorção patológica, características das DTM mais severas.

Na avaliação da população de leucócitos, não foram observadas diferenças entre os grupos controle e experimental com relação ao número de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos (Figura 3 A, B e D). O número de monócitos por sua vez, encontra-se aumentado em pacientes com DTM leve e moderada/severa quando comparados ao grupo controle (Figura 3 C). No entanto, somente o grupo de pacientes com DTM leve obteve uma diferença estatisticamente significativa.

A Figura 4 mostra os níveis salivares e séricos de cortisol. Observou-se uma redução, embora não significativa dos níveis de cortisol salivar em pacientes com DTM leve e moderada/severa em relação aos pacientes controle (Figura 4 A). Por outro lado, não foram observadas diferenças nos níveis séricos de cortisol entre os grupos avaliados (Figura 4 B).

De forma similar, os níveis séricos e salivares de IgA, mantiveram-se semelhantes, não demonstrando diferenças estatisticamente significantes entre pacientes controle e com DTM (Figura 5 A e B).

Observa-se que, quando avaliados para o 4-HNE, observou-se um aumento nos níveis salivares deste mediador em pacientes com DTM moderada/severa e não em

pacientes com DTM leve, em relação ao grupo controle (Figura 6 A). No entanto, os níveis séricos deste mediador não foram alterados pela presença de DTM (Figura 6 B).

Discussão

A DTM é considerada uma síndrome que, além da interferência funcional própria da síndrome, também interfere na qualidade de vida dos pacientes. Sabe-se que como outras patologias que dificilmente apresentam resolução espontânea, a DTM possui a possibilidade de progressão clínica desfavorável, se não tratada adequadamente.

Ferramentas diagnósticas para a DTM com alto grau de confiabilidade são poucas e mesmo com os recursos mais modernos, como as ressonâncias nucleares magnéticas, há muita discussão sobre sua aplicabilidade e valor diagnóstico, além de possuírem custo elevado ou estarem indisponíveis para muitos pacientes [2]. Assim, a procura por meios diagnósticos que sejam mais acessíveis financeiramente e confiáveis é contínua nesta área de pesquisa.

Um dos meios diagnósticos mais utilizados é o RDC/TMD, apesar da confiabilidade e reprodutibilidade, é passível de subjetividade no momento do exame, pois parte dos dados obtidos a partir dele são baseados em informações fornecidas pelos pacientes [10,30,39].

Quanto aos diagnósticos obtidos no RDC/TMD neste trabalho, a conjunção de dois ou mais grupos de alterações mostrou-se superior às alterações isoladas (80,76% e 19,24%, respectivamente), de forma similar a estudos anteriores onde os números finais das alterações associadas são superiores a 50% dos diagnósticos [15]. Outro estudo, porém demonstra resultado bem diferente, onde o número de diagnósticos

unitários é muito superior aos diagnósticos múltiplos ^[15,26], provavelmente em virtude da falta de padronização nos questionários utilizados para a pesquisa em DTM ^[15].

Pouco se trata especificamente sobre severidade da DTM e o que se percebe mais notadamente é que os trabalhos preocupam-se em fazer uma classificação diagnóstica e não traduzi-la numa situação clínica aplicável de sua severidade ^[20].

Para este trabalho se utilizou o diagnóstico obtido a partir do RDC/TMD e aplicou-o para classificar a DTM em graus diferentes de severidade (leve, moderada e severa), o que tornaria os resultados laboratoriais mais úteis clinicamente.

Neste contexto, a avaliação de possíveis marcadores biológicos são importantes. O número de monócitos elevados encontrados neste trabalho naqueles pacientes com DTM leve e moderada/severa é indicativo de inflamação aguda nos tecidos profundos, pois este tipo celular é rapidamente recrutado para os locais de lesão tecidual por citocinas inflamatórias, onde se diferenciam em macrófagos e induzem uma resposta imune local ^[34].

A intensidade da inflamação articular está associada a infiltração celular no local da lesão e, assim, especula-se que apesar do número de monócitos circulantes ser menor em pacientes com DTM moderada/severa quando comparado com pacientes com DTM leve, isso deve-se ao fato de parte desta células já terem migrado para a articulação e lá estejam perpetuando o processo inflamatório e a dor. Uma vez na articulação, os monócitos diferenciados em macrófagos, perpetuam a inflamação articular e sensibilizam os terminais nervosos através da produção de citocinas pró-inflamatórias, as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as quais estão associadas à produção de colágeno, ativação osteoclástica, síntese de prostaglandinas e liberação de glutamato. Todas estas alterações

resultam em uma piora dos quadros associados a DTM, uma vez que podem levar à degradação da cartilagem e erosão óssea, além de aumento da dor [9,21,33].

Os níveis de cortisol, entretanto, não demonstraram uma relação clara com a DTM. Na sua quantificação salivar houve uma inversão, onde o grupo controle demonstrou maiores níveis deste hormônio. Um estudo associou a secreção salivar de cortisol matinal com o status e a catastrofização da dor em pacientes com DTM, onde notou-se que os pacientes com baixa catastrofização apresentavam níveis diminuídos de cortisol salivar após experiência de dor, enquanto que o grupo com maior status de catastrofização apresentou aumento/estabilização do cortisol, o que sugere que nestes pacientes há alterações neuropsicológicas mal adaptativas nas experiências de dor [32].

Outro fator é a indicação de que o aumento do cortisol está mais associado ao estresse agudo que o crônico [29], o que pode ter influência nas leituras baixas de cortisol nos grupos com DTM, em especial no grupo com alterações moderadas/graves.

Resultados conflitantes sugerem que o cortisol pode não ser um marcador confiável na DTM, pois é influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos do indivíduo [19,29,32]. Ainda, ressalta-se que os níveis de cortisol plasmático variam de acordo com o ciclo circadiano do indivíduo, mas em pacientes com DTM a tendência é de aumento durante o dia, onde no cortisol salivar não há diferença entre grupos com DTM e controles [29].

Os resultados apresentados podem ser válidos, visto que os níveis de cortisol salivar e plasmático foram menores no grupo com DTM moderada/severa em relação ao grupo com DTM leve e ao controle, corroborando com o fato de que dores crônicas

podem não produzir aumento no cortisol. Sugere-se que estudos futuros para quantificação deste hormônio incluam a avaliação psicológica dos pacientes, em especial a presença de catastrofização da dor, visto que há indicação de aumento do cortisol em pacientes com esta tendência ^[32].

Estudos apontam que a avaliação dos níveis de IgA para o diagnóstico da DTM pode ser promissora, mas no entanto, existem poucos estudos deste mediador em pacientes^[8,13,30]. O presente estudo avaliou os níveis circulantes e salivares de IgA. No entanto, não foram detectadas diferenças na produção desta imunoglobulina entre os grupos avaliados. Isso confronta dados publicados anteriormente com relação a artrite, os quais sugerem que anticorpos anti-CCP do IgA, encontram-se associados a casos de baixa severidade da doença ^[8,37]; e estudos que sugerem um papel pro-inflamatório da IgA, através da ativação de vias inflamatórias na articulação ^[37].

Diferentes estudos apontam a relevância de produtos do estresse oxidativo a processos de dor inflamatória articular, dentre eles o 4-HNE, que encontra-se associado a condições pré-artríticas ^[3] e artríticas ^[31]. Estudos também demonstram que uma vez liberado, o 4-HNE induz a produção de cicloxigenase 2 (COX-2) por células inflamatórias como o macrófago, aumentando a produção de prostaglandinas, e desta forma, promovendo dor e inflamação ^[3,21]. Por outro lado, a baixa quantificação sérica do 4-HNE vem sendo associada a citoproteção e regulação da proliferação celular ^[3], no entanto, sua completa participação no processo de dor inflamatória articular ainda permanece por ser esclarecido. Como este mediador exerce suas ações através do receptor TRPA1 ^[1]; receptor este expresso em terminais nervosos ^[30], conhecido por mediar uma série de processos inflamatórios e dolorosos ^[4]. 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 álgicos articulares, sensibilidade local e atividade reflexa da musculatura da mastigação ^[45], no entanto, sua real relevância para a progressão da DTM ainda permanece por ser elucidada.

Os resultados do presente trabalho demonstram um aumento dos níveis salivares de 4-HNE em pacientes com DTM moderada/severa. Como este mediador pode se difundir rapidamente uma vez produzido, especula-se que o mesmo esteja sendo produzido por macrófagos intra-articulares e se difundindo através da saliva. Uma vez liberado, o 4-HNE age nas terminações nervosas, ativando o receptor TRPA1, e induzindo dor articular e muscular.

O presente estudo reúne marcadores biológicos importantes nas doenças articulares, já avaliados separadamente mas não em conjunto com os dados obtidos pelas imagens radiográficas e a classificação pelo RDC/TMD. Demonstrou-se que a quantificação de 4-HNE e o acompanhamento do número de monócitos circulantes, juntamente com o exame clínico, podem fornecer informações relevantes acerca da DTM, não só no que diz respeito ao seu diagnóstico, mas principalmente sobre a severidade da doença. No entanto, mais estudos são necessários para o melhor entendimento da participação do 4-HNE e seu receptor na DTM, bem como dos mecanismos associados a estes.

Agradecimentos

Agradecemos apoio financeiro da Universidade CEUMA, 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.

Conflito de Interesses

Não existem conflitos de interesse no presente trabalho.

Tabelas

Tabela 1. Classificação das DTM de acordo com o grau de severidade apresentado:

	<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 2. Distribuição de frequência nos grupos de pacientes controle e com DTM:

	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

Tabela 3. Distribuição do número de pacientes de acordo com o RDC/TMD

Grupo RDC/TMD	Nº Pacientes	(%)
I	2	7,69
II	3	11,53
III	0	0
I+II	6	23,07
I+III	6	23,07
II+III	2	7,69
I+II+III	7	26,92
TOTAL	26	100%

Distribuição dos pacientes de acordo com os diagnósticos do RDC/TMD isoladamente e em situações associadas. Notar que não houve diagnóstico isolado do grupo III em nossa amostra.

Figuras

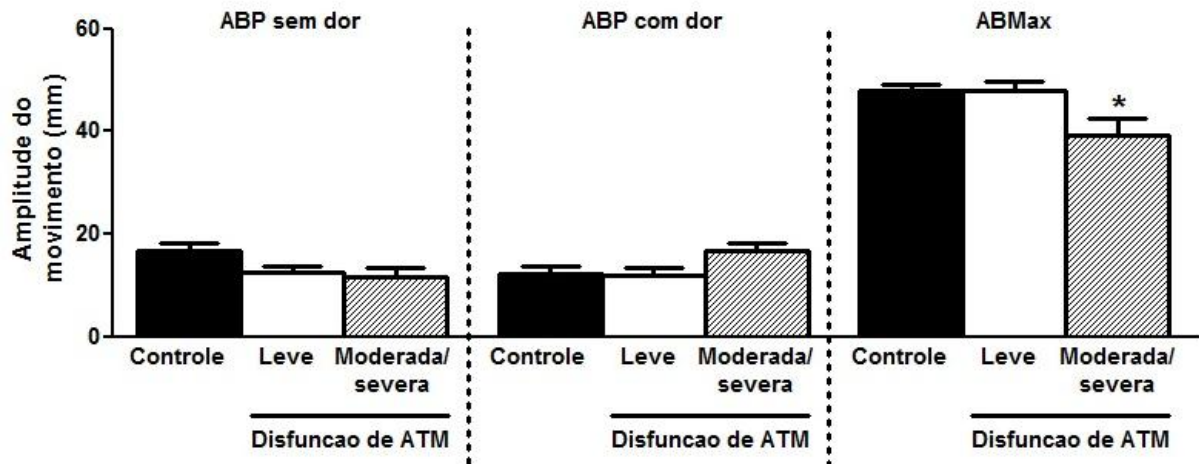


Figura 1. Amplitude dos movimentos mandibulares em pacientes com e sem DTM. Abertura bucal passiva (ABP) sem dor, ABP com dor e abertura bucal máxima (ABMax) em pacientes sem DTM (controle; $n=11$), pacientes com DTM leve ($n=15$) e pacientes com DTM moderada/severa ($n=8$). * $P \leq 0,05$ difere significativamente em relação ao grupo ABMax controle. Teste estatístico ANOVA uma via.

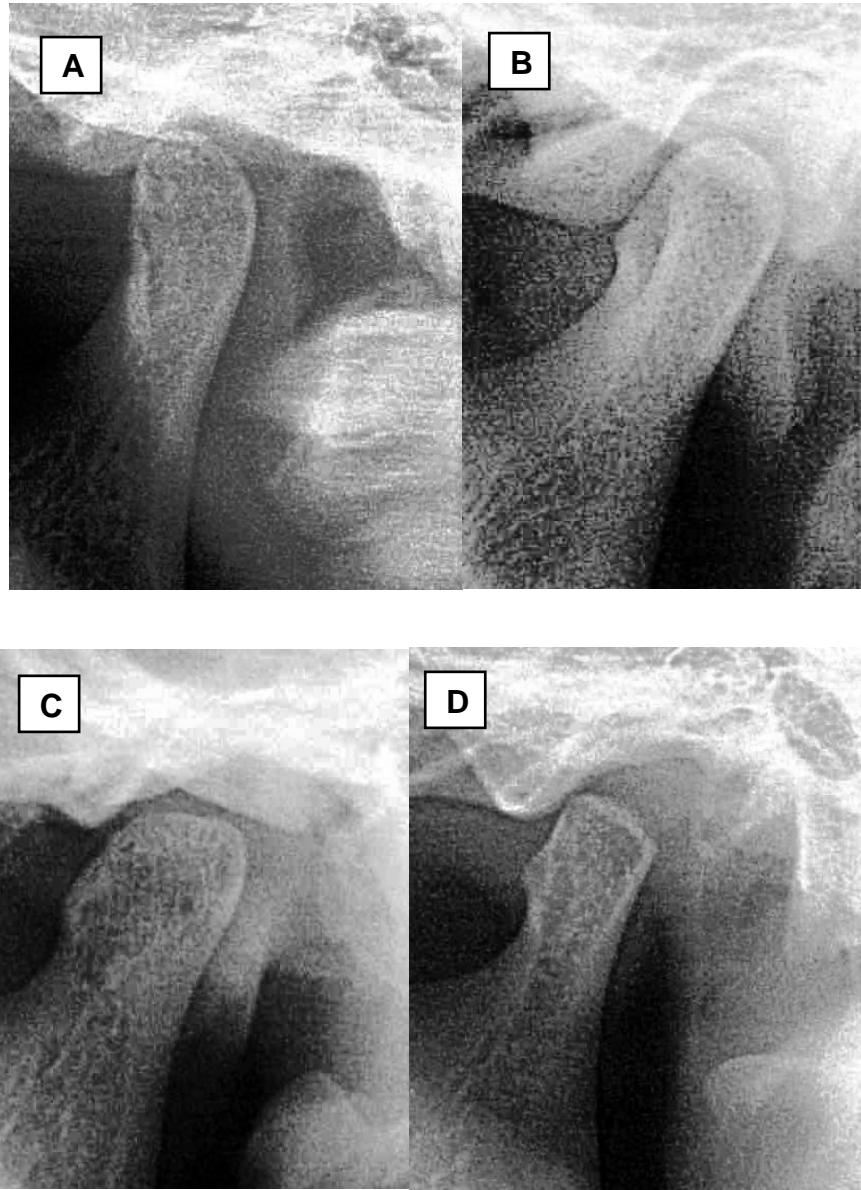


Figura 2. Aspectos condilares para avaliação radiográfica em pacientes com e sem DTM. Exemplo qualitativo das características radiográficas do A) Grupo Controle - cêndilo normal; B) DTM leve - facetação condilar; C) DTM moderada - perda do contorno da cortical óssea condilar; D) DTM severa - perda do contorno da cortical óssea condilar com facetação.

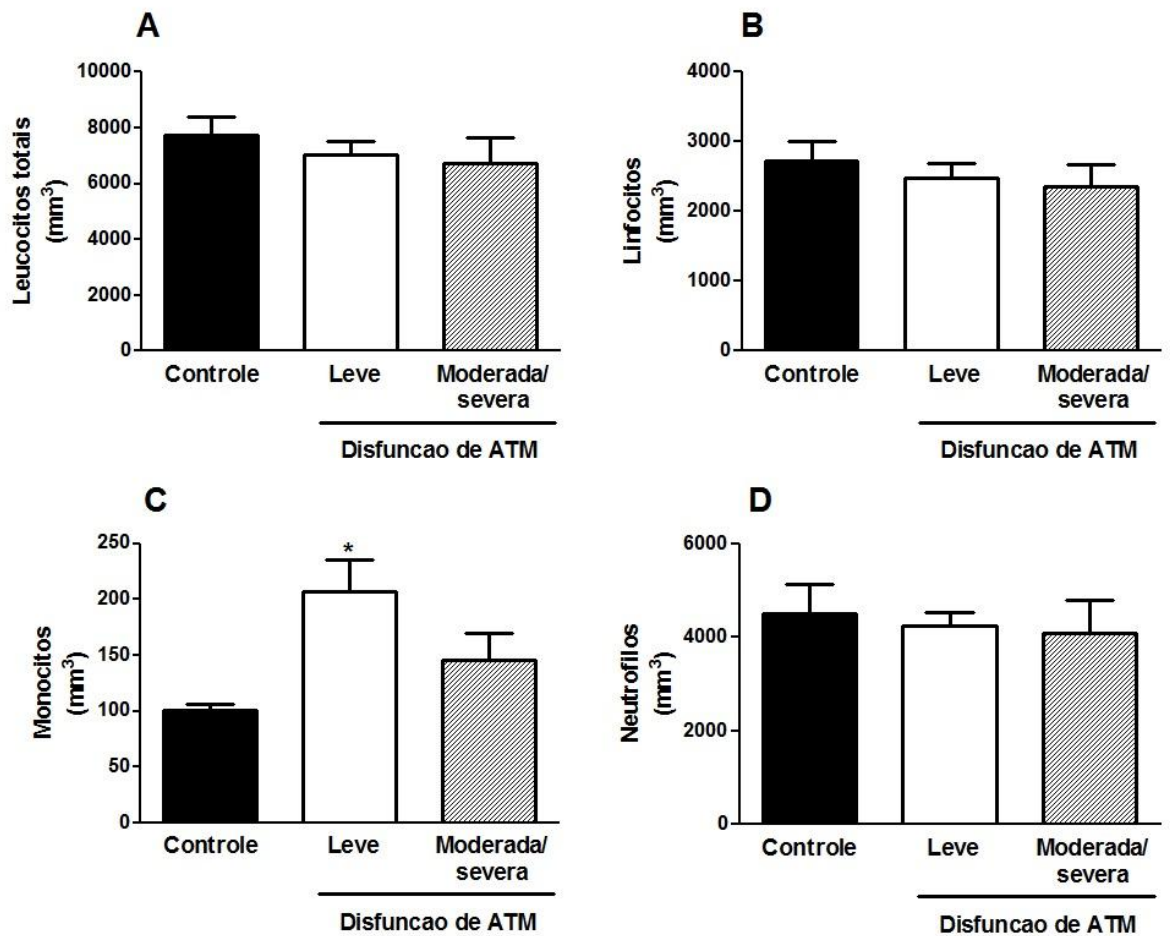


Figura 3. Avaliação da população das células do sangue periférico de pacientes controle e com DTM. Contagem de leucócitos totais (A), linfócitos (B), monócitos (C) e neutrófilos (D) obtidos de pacientes saudáveis ($n=8$) e com DTM leve ($n=6$) e moderada/severa ($n=6$). * $P<0.05$; difere significativamente em relação ao grupo controle. Teste estatístico ANOVA uma via.

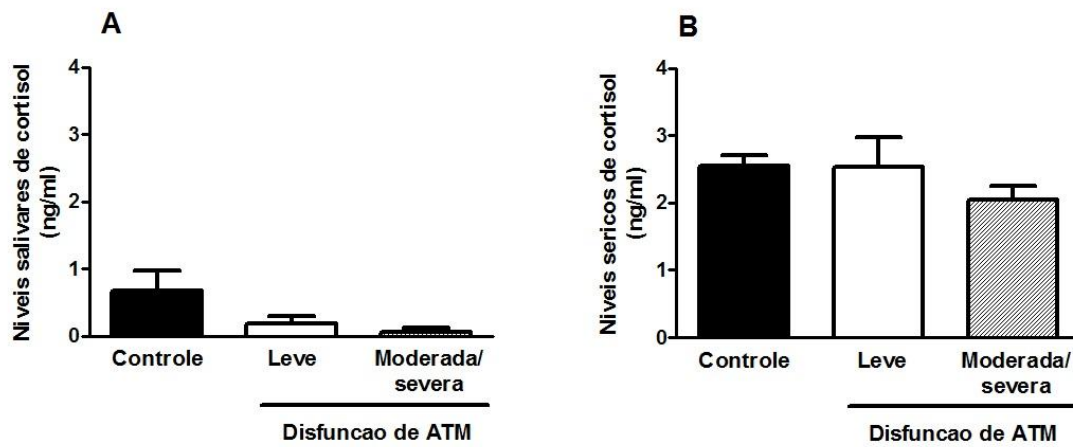


Figura 4. Quantificação dos níveis de cortisol em pacientes controle e com DTM. Níveis salivares (A) e séricos (B) de cortisol obtidos de pacientes controle ($n=8$) e com DTM leve ($n=6$) e moderada/severa ($n=6$). Teste estatístico ANOVA uma via.

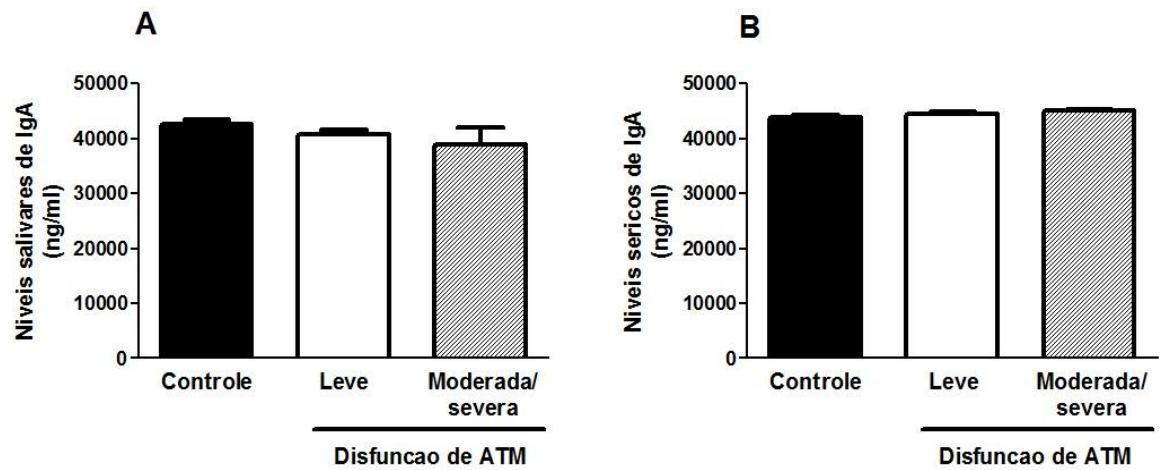


Figura 5. Quantificação dos níveis de IgA em pacientes controle e com DTM. Níveis salivares (A) e séricos (B) de IgA obtidos de pacientes controle ($n=8$) e com DTM leve ($n=6$) e moderada/severa ($n=6$). Teste estatístico ANOVA uma via.

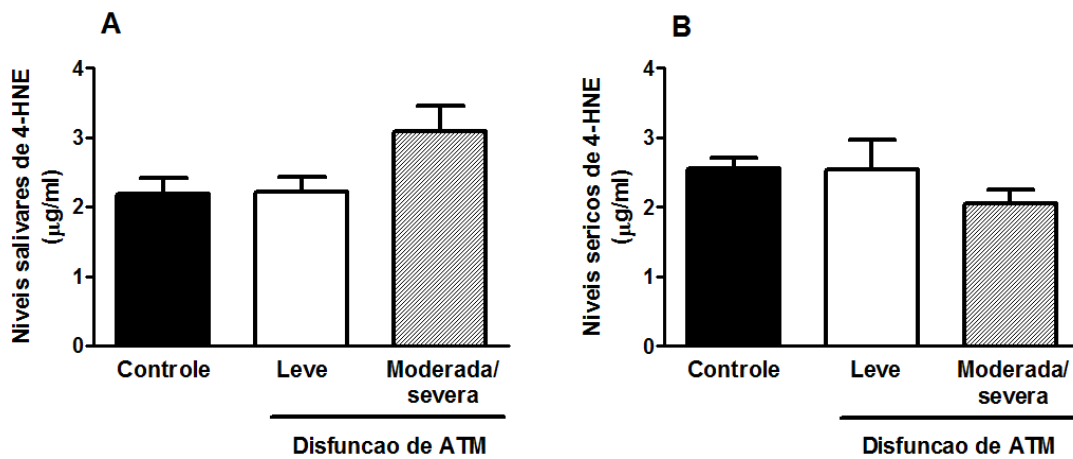


Figura 6. Quantificação dos níveis de 4-HNE em pacientes controle e com DTM. Níveis salivares (A) e séricos (B) de 4-HNE obtidos de pacientes controle ($n=8$) e com DTM leve ($n=6$) e moderada/severa ($n=6$). Teste estatístico ANOVA uma via.

Referências

- 1 Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 2009; 28: 2485-94.
- 2 Akiyama K, Mizui T, Baba S, Takahashi T, Ishimaru JI. Imaging the temporomandibular joint by double contrast cone-beam computed arthrography. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* 2012; 24: 23-26.
- 3 Biniecka M, Kennedy A, Fearon U, Teck Ng C, Veale DJ, O'Sullivan JN. Oxidative damage on synovial tissue is associated with hypoxic status in arthritic joint. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1172-78.
- 4 Bonjardim LR, Silva AP, Gameiro GH, Tambeli CH, Veiga MCFA. Nociceptive behaviour induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and central opioid analgesic. *Pharmac Biochem Behaviour* 2009; 91: 321-26.
- 5 Brain SD. TRPV1 and TRPA1 channels in inflammatory pain: elucidating mechanisms. *Ann New York Acad Sci* 2011; 1245: 36-7.
- 6 Chen J, Joshi SK, DiDomenico S, Perner RJ, Mikusa JP, Gauvin DM, Segreti JA, Han P, Zhang XF, Niforatos W, Bianchi BR, Backer SJ, Zhong C, Simler GH, MacDonald HA, Schmidt RG, MacGarrahy SP, Chu KL, Faltynek CR, Kort ME, Reilly RM, Kym PR. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain* 2011; 152: 1165-72.
- 7 Costa DSM, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB. The involvement of transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance

- of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. 2010; 148: 431-37.
- 8 Daha NA, Banda NK, Roos A, Beurskens FJ, Bakker JM, Daha MR, Trow RA. Complement activation by (auto-)antibodies. *Mol Immunobiol* 2011; 48: 1656-65.
 - 9 Diogenes A, Akopian AN, Hargreaves KM. NGF up-regulates TRPA1: Implications for orofacial pain. *J Dent Res* 1007; 86: 550-55.
 - 10 Farina D, Bodin C, Gandolfi S, Gasperi WD, Borghesi A, Maroldi R. TMJ disorders and pain: assessment for contrast-enhanced MRI. *Eur J Radiol* 2009; 70: 25-30.
 - 11 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 monarthritis. *Arthritis Rheum* 2011, 63: 819-829.
 - 12 Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves 2012; 166: 510-21.
 - 13 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, 6: 50-61.
 - 14 Graepel R, Fernandes ES, Aubdool AA, Andersson DA, Bevan S, Brain SD. 4-oxo-2-nonenal (4-ONE): evidence of transiente receptor pontential ankyrin 1-dependent and –independent nociceptive and vasoactive responses in vivo. *J Pharmacol Experiment Therapeut* 2011; 337: 117-24.

- 15 Hasanain F, Durham J, Moufti A, Steen IN, Wassel RW. Adapting the diagnostic definitions of RDC/TMD to a routine clinical practice: a feasibility study. *J Dent* 2009; 37: 955-962.
- 16 Honey OB, Scarfe WC, Hilgers MJ, Klueber K, Silveira AM, Haskell AS, Farman AG. Accuracy of cone beam computed tomography imaging of the temporomandibular joint: comparison with panoramic radiology and linear tomography. *Am J Orthod Dentofac Orthoped* 2007; 132; 429-38.
- 17 Huang D, Li S, Dhaka A, Story GM, Cao YQ. Expression of transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Molec Pain* 2012; 8(66): 1-19.
- 18 Jank S, Emshoff, Norer B, Missmann M, Nicasi A, Strobi H, Gassner R, Rudisch A, Bodner G. Diagnostic quality of dynamic high-resolution ultrasonography of TMJ – a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*; 2005: 132-37.
- 19 Jasim H, Louca S, Christidis N, Ernberg M. Salivary cortisol and psychological factors in women with chronic or acute oro-facial pain. *J Oral Rehab* 2013; 1-11. doi: 10.1111/joor.12118.
- 20 Jerjes W, Madland G, Feinman C, Hopper C, Kumar M, Upile T, Kudari M, Newman S. A psychological comparison of temporomandibular disorder and chronic daily headache: are there targets for therapeutic interventions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 367-73.
- 21 Keeble JE, Bodkin JV, Liang L, Wadorski R, Davies M, Fernandes ES, Coelho CF, Russel F, Graepel R, Muscara NM, Malcangio M, Brain SD. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting

- via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain* 2009,
- 22 Lam DK, Sessle Bj, Cairns BE, Hu JW. Peripheral NMDA receptor modulation of jaw muscle electromyographic activity induced of capsaicin injection into the temporomandibular joint of rats. *Brain Research*; 2005: 68-76.
- 23 Lapoint TK, Altier C. The role of TRPA1 in visceral inflammation and pain. *Channels* 2011; 5: 525-29.
- 24 Macfarlane TV, Blinkhorn AS, Daives RM, Ryan P, Worthington HV, Macfarlane GJ. Orofacial pain: just another chronic pain? Results from a population survey. *Pain* 2002; 99: 453-58.
- 25 Macfarlane TV, Glenny AM, Worthington HV. Systematic review of population-based epidemiological studies of oro-facial pain. *J Dent* 2001; 29: 451-67.
- 26 Madland G, Feinman C, Newman S. Factors associated with anxiety and depression in facial arthromyalgia. 2000; 84: 225-32.
- 27 Manfredini D, Picotti F, Ferronato G, Guarda-Nardini L. Age peaks of different RDC/TMD diagnoses in a patient population.
- 28 Mello CEB, Oliveira JLG, Jesus ACF, Maia MLM, Santana JCV, Andrade LSO, Quintans JSS, Quintans Júnior LJ, Conti PCR, Bonjardim LR. Temporomandibular disorders in headache patients. *Med Oral Patol Oral Ciru Bucal* 2012; 17: e1042-46.
- 29 Nilsson AM, Dahlstrom L. Perceived symptoms of psychological distress and salivary cortisol levels in young women with muscular or disk-related temporomandibular disorders. *Acta Odont Scand* 2010; 68: 284-88.

- 30 Ostalowska A, Birkner E, Wiecha M, Kasperkzyck S, Kasperkzyck A, Kapolka D, Zon-Giebel A. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006; 14: 139-145.
- 31 Park JW, Clark GT, Kim YK, Chung JW. Analysis of thermal sensitivity and psychological profiles in different subgroups of TMD patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39: 968-974.
- 32 Quartana PJ, Buenaver LF, Edwards RR, Klick B, Haythornthwaite JA, Smith MT. Pain catastrophizing and salivary cortisol responses to laboratory pain testing in temporomandibular disorders and healthy participants. *J Pain* 2010; 11: 186-94.
- 33 Rai B, Kaur J. Association between stress, sleep quality and temporomandibular joint dysfunction: simulated mars mission. *Oman Med J* 2013; 28: 216-19.
- 34 Sandler NA, Buckley MJ, Cillo JE, Braun TW. Correlation of inflammatory cytokines with arthroscopic findings in patients with temporomandibular joint internal derangements. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56: 534-43.
- 35 Seta N, Okazaki Y, Miyazaki H, Kato T, Kuwana M. Platelet-Derived Stromal Cell-Derived Factor-1 Is Required for the Transformation of Circulating Monocytes into Multipotential Cells. *PLoS One* 2013; 8: e74246. doi: 10.1371/journal.pone.0074246.
- 36 Slade GD, Conrade MS, Diatchenko L, Rashid NU, Zhong S, Smith S, Rhodes J, Medvedev A, Makarov S, Mixner W, Nackley AG. Cytokine biomarkers and chronic pain – association of genes, transcription, and circulating proteins with temporomandibular disorders and widespread

- palpation and tenderness. *Pain* 2011; 53: 2802-12.
- 37 Solberg Nes L, Carlson CR, Crofford LJ, Leeuw R, Segerstrom SC. Self-regulatory deficits in fibromyalgia and temporomandibular disorders. *Pain* 2010; 151: 37-44. doi: 10.1016/j.pain.2010.05.009.
- 38 Svard A, Kastbom A, Sommarin Y, Skogh T. Salivary IgA antibodies to citrullinated peptides (CCP) in rheumatoid arthritis. *Immunobiol* 2013; 218: 232-237.
- 39 Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA. Chronic inflammation and estradiol interact through MAPK activation to affect TMJ nociceptive processing by trigeminal caudalis neurons. *Neuroscienc*; 164: 1813-20.
- 40 Tymofiyeva O, Proff P, Richter EJ, Jakob P, Fanghänel J, Gedrange T, Rottner K. Correlation of MRT imaging with real-timeaxiography of TMJ clicks. *Ann Anatomy*; 2007: 356-61.
- 41 Ullrich O, Huser H, Ehrlich W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal in primary cultures of rabbit synovial fibroblast. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1153-57.
- 42 Vely AN, Look JO, Carlson C, Lenton PA, Kang W, Holcroft CA, Friction JR. The effect of catastrophizing and depression on chronic pain – a prospective cohort study of temporomandibular muscle and joint pain disorders. *Pain* 2011; 152: 2377-83.
- 43 Vencovsky J, Machacek S, Sedova L, Kafkova J, Gatterová J, Pesakova V, Ruzikova S. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 427-30.
- 44 Weber D, Milkovic L, Bennett SJ, Griffiths HR, Zarkovic N, Grune T. Measurement of HNE-protein adducts in human plasma and serum by

- ELISA-comparison of two primary antibodies. *Redox Biol* 2013; 1: 226-33.
- 45 Weng Y, Batista-Schepman PA, Barabas ME, Harris EQ, Dinsmore TB, Kossyreva EA, Foshage AM, Wang MH, Schwab MJ, Wang VM, Stucky CL, Story GM. Prostaglandin metabolite induces inhibition of TRPA1 and channel-dependent nociception. *Molec Pain* 2012; 8: 1-14.
- 46 Yang D, Ye L. Temporomandibular disorders and declarative memory. *Med Hypotheses* 2011; 76: 723-5. doi: 10.1016/j.mehy.2011.02.007.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do exposto no presente estudo pode-se concluir que:

- a) A quantificação sérica do 4-HNE demonstrou resultados não esperados, com menor quantificação no grupo com DTM moderada/severa que nos grupos controle e com DTM leve, ao contrário do que demonstrou a quantificação salivar, com níveis muito superiores do que estes dois grupos, o que pode sugerir que a quantificação salivar sirva como meio representativo da determinação deste metabólito na doença articular temporomandibular;
- b) A quantificação do cortisol nos grupos experimentais com DTM, apesar que abaixo do grupo controle, encontrou respaldo na literatura, onde os menores níveis de cortisol estão associados a dores crônicas e os maiores níveis de estresse, e conseqüentemente secreção deste hormônio, estão presentes nos grupos com desordens musculares, ou seja, nas DTM leves;
- c) A determinação sérica e salivar do Ig A entretanto mostrou-se dúbia, apesar da bem determinada participação nos processos inflamatórios articulares, com exceção da DTM, onde ainda não foi profundamente estudada. Este fato merece atenção, onde sugere-se maiores amostras para reavaliação deste elemento bioquímico.
- d) A hipótese de trabalho do presente estudo foi parcialmente provida, visto que os resultados, apesar de não possuírem relevância estatística, mostraram-se em concordância com a literatura do assunto, com

exceção do Ig A, que não demonstrou diferença alguma, entre os grupos controle e experimentais portadores de DTM.

Por fim, sugerimos que sejam realizados estudos com amostras maiores, no mesmo tipo de alteração articular, principalmente a expressão do 4-HNE, cortisol e Ig A, buscando confirmar se estes elementos servem como indicadores de severidade e prognóstico das DTM.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DA UNIVERSIDADE CEUMA**Fac Símile****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 discas 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: 85.075-120
 UF: MA Município: SÃO LUÍS
 Telefone: (98)3214-4285 Fax: (98)3214-4212 E-mail: cep@ceuma.br



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA**



Continuação do Parecer: 204.828

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)3214-4265 Fax: (98)3214-4212 E-mail: cep@ceuma.br

ANEXO B – ÍNDICE CLÍNICO DE FONSECA

O questionário é composto por 10 (dez) perguntas que devem ser respondidas com as alternativas SIM, NÃO ou ÀS VEZES. Assinalar apenas uma resposta para cada pergunta.

1. Sente dificuldade para abrir bem a boca?	SIM	NÃO	ÀS VEZES
2. Sente dificuldade para movimentar a mandíbula para os lados?	SIM	NÃO	ÀS VEZES
3. Tem cansaço/dor muscular quando mastiga?	SIM	NÃO	ÀS VEZES
4. Sente dores de cabeça com frequência?	SIM	NÃO	ÀS VEZES
5. Sente dor na nuca ou torcicolo?	SIM	NÃO	ÀS VEZES
6. Tem dor de ouvido ou nas articulações temporomandibulares?	SIM	NÃO	ÀS VEZES
7. Já notou se tem ruídos nas articulações temporomandibulares quando mastiga ou quando abre a boca?	SIM	NÃO	ÀS VEZES
8. Você já notou se tem algum hábito de apertar ou ranger os dentes?	SIM	NÃO	ÀS VEZES
9. Sente que seus dentes não articulam bem?	SIM	NÃO	ÀS VEZES

10. Você se considera uma pessoa tensa/nervosa?

SIM

NÃO

ÀS VEZES

ANEXO C – 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)

- Abertura passiva sem dor _____ mm
- Abertura máxima passiva _____ mm
- Abertura máxima ativa _____ mm
- Trespasse vertical incisal _____ mm

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

DOR MUSCULAR				DOR ARTICULAR			
Nenhuma	Direita	Esquerda	Ambos	Nenhuma	Direita	Esquerda	Ambos
0	1	2	3	0	1	2	3

5 – Ruidos 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			
Nenhuma	Direita	Esquerda	Ambos	Nenhuma	Direita	Esquerda	Ambos
0	1	2	3	0	1	2	3

d. desvio da linha média _____ mm.

Sim	0
Não	1
Não Apresenta	8

7 – Ruidos articulares nas excursões:

Ruidos 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

Ruidos 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

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			

ANEXO D – 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 - Correlação entre a Severidade da Disfunção Temporomandibular e a Expressão do Receptor TRPA1 e seu Agonista 4-HNE

Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa que se destina a avaliar a expressão do receptor bioquímico TRPA1 e seu agonista 4-HNE, que são importantes elementos 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 e seu agonista 4-HNE 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 e 4-HNE.

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: _____

ANEXO E – NORMAS DA REVISTA PAIN PARA PUBLICAÇÃO



Guide for Authors

- **General Information**

PAIN® is the official publication of the International Association for the Study of Pain® (IASP®). PAIN® publishes original research on the nature, mechanisms, and treatment of pain and provides a multidisciplinary forum for the dissemination of research in the basic and clinical sciences. The Editor-in-Chief of PAIN® is Francis J. Keefe, PhD, Pain Prevention and Treatment Research Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Duke University, Durham, NC, USA.

Please submit manuscripts online via the PAIN® manuscript submission site at ees.elsevier.com/pain.

Editorial Office Contact Information

PAIN, 1510 H Street NW, Suite 600, Washington DC 20005-1020 USA; telephone: +1.202.524.5300; fax: +1.202.524.5301; e-mail: painj@iasp-pain.org

Editorial Policies for Authors

The editors review manuscripts submitted under multiple authorship on the assumption that (1) all listed authors concur with the submitted version of the manuscript and the listing of the authors; (2) authors made important contributions in one or more of the following areas: conception and design, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, or making intellectual contributions to its content; (3) responsible authorities in the laboratory or at the institution where the work took place have tacitly or explicitly approved the final manuscript. A cover letter accompanying the manuscript should include a statement of any financial or other relationships that might lead to a conflict of interest.

Your cover letter should include the following:

- Title, authors, number of pages, and number of tables and figures.
- Indication that all the authors have read and approved the paper.
- Description of how each author contributed to the manuscript and others who may have assisted.
- Name of the Special Section in which the paper is to be included, if applicable.
- Names of four potential reviewers with complete contact details. As our objective is to obtain independent reviews that are free from bias, please do NOT suggest people with whom you have worked or published in recent years or anyone who works at your institution. There is no assurance that the editors will choose reviewers from the list you provided.
- Information about any previous presentation of the data (e.g., at a specific meeting or as a thesis).
- Information about the existence of any closely related manuscripts that you have submitted for simultaneous consideration to the same or another journal.

- Notice of any interests that might be seen as influencing the research (e.g., financial interest in a test or procedure, funding by pharmaceutical companies for drug research, etc.).
- A copy of the permission granted to reproduce or adapt any copyrighted material from another source or a notice that permissions are pending. Indicate the original source(s) in the legend of the illustration, or as appropriate in a footnote to the text.

By submitting a paper to PAIN®, the authors are agreeing that the paper has not been previously published (except in abstract form) nor has the paper been submitted to another online or print journal.

Articles should be written in English and should be complete in all respects. As the Publisher provides only limited editing, we ask that your article be edited by a person experienced in writing manuscripts in English BEFORE submission. The layout, style, and length of article should adhere strictly to the instructions given under "Categories of Articles" (see below) and, in particular, to the reference style of PAIN®.

The journal will only consider publication of work that includes information that is sufficient to permit replication by other laboratories. Manuscripts reporting data from novel chemical probes will not be considered unless the structure and pharmacological characterization, including selectivity and relevant formulation, are reported or directly described in a prior peer-reviewed publication.

PAIN® does not publish open-label trials, with the possible exception of the Clinical Notes section.

Manuscripts that evaluate clinical interventions must be randomized. Results that are derived from studies that are not randomized may be appropriate for the Clinical Notes section. In addition, studies should have high methodological quality and as large a representative sample as possible. If the paper is an epidemiological study, it should address a new population that will help the reader to understand the impact of cultural and socioeconomic factors on chronic pain.

Authors of reports of clinical trials must use the CONSORT checklist, as well as the PRISMA statement used for systematic reviews found at prisma-statement.org (both used with permission).

Manuscripts reporting results of randomized trials must include the Consort E-Flowchart and a checklist of items, both of which can be found at www.consort-statement.org. As the flowchart will be published only in the online version of PAIN®, please supply several summary sentences in your text that refer to the flowchart. These sentences will appear in the print issue of the journal.

Ethics of Animal Experiments. Authors must acknowledge that their experiments adhered to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP [www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Animal_Research]. Authors should indicate if the experimental work was reviewed by an institutional animal care and use committee or its equivalent.

Ethics of Human Experiments. Authors reporting on experimental work on humans should, where relevant, submit evidence that the work has been approved by an institutional clinical research panel or its equivalent.

No revisions or updates will be incorporated after the article has been accepted and sent to the Publisher (unless approved by the editors).

Manuscript Preparation

Please provide a summary of one or two sentences (25 words max.) stating the conclusions of your study. This summary will be used in the Table of Contents. When writing the synopsis, please avoid use of the first person. Please also refrain from using statements that begin with, "This study..." Do not merely rephrase the title of the paper, but rather provide some information that will inform readers of the objective, methods, results, and/or conclusions.

Please submit figures and tables as separate files (e.g., Figure 1, Figure 2, Table 1, Table 2, etc.). Each figure and table should appear on a separate page.

Text files should be supplied in Microsoft Word, Windows or Macintosh formatted. This format is preferred over ASCII text (TXT) or Rich Text Format (RTF). **Please do not import a file already in PDF format.**

Categories of Articles

[Clinical/Basic Science Research Reports](#)

[Clinical Notes](#)

[Comprehensive Reviews](#)

[Topical Reviews](#)

[Commentary \(Invited Only\)](#)

[Letter to the Editor](#)

Graphic Files

See Elsevier's website for guidelines for preparing electronic artwork: www.elsevier.com/artworkinstructions.

The following are preferred formats: native formats of Adobe® Photoshop® and Adobe® Illustrator®. If this is not possible, the graphic files may also be supplied in TIFF, EPS, JPEG, GIF, or PPT format.

All graphic files supplied as bitmap format (not vector format) in native Adobe® Photoshop®, TIFF, JPEG, GIF, or PPT must be submitted in sufficiently high resolution (240-300 dpi for gray-scale or color images and 600-1,000 dpi for line art) to allow for printing. **Please do not submit figures in PDF format.**

Multimedia files: Please contact the Editorial Office at painjournal@iasp-pain.org before attempting to submit files of this type. Additional e-files that may be submitted include a variety of multimedia options, such as large figures, photographs, and brief video clips with or without audio content. Material submitted for publication online via e-PAIN must be of a high enough resolution to be viewable in a web page-type format. These additional files should be uploaded only on the special page to which you will be directed during submission via EES. A maximum of 10 digital images, 2 video clips, and 2 audio files can be submitted for an e-PAIN manuscript. The file limit for each figure or photograph is 1.5 MB; video clips, 3.0 MB each; separate audio content, 1.0 MB.

Costs: There are no charges for material presented online, including color figures. If, together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure that these figures will appear in color on the web (e.g., ScienceDirect) at no additional charge, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. Each author will be provided with a PDF version of the text and photographs contained in the full material (print and online), and 50 copies of the summary of the article that appears in the print version of PAIN®. Authors will not receive a reprint that includes video and audio content.

Editorial Review and Publication

The PAIN® Editor-in-Chief, Francis J. Keefe, and Section Editors do the initial review of all submissions.

Proofs. Elsevier will send one set of page proofs in PDF format by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then hard-copy proofs will be sent by post). PDF proofs can be annotated; for this, you will need to download the latest version of Adobe® Reader®, available free from www.adobe.com/reader. Instructions on how to annotate the PDF files will accompany the proofs. If you do not wish to use the PDF annotation function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections, quoting the line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, scan the pages, and e-mail them, or send them by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness, and correctness of the text, tables, and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will be considered at this stage only with permission from the Editor-in-Chief. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that you send all corrections to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with publication of your article if no response is received.

Page Charges. There are no page charges for PAIN®.

Reprints. Elsevier will provide a total of 50 reprints of each paper free of charge to the corresponding author. Additional copies can be ordered at prices shown on the offprint order form, which will be sent to the author on receipt of the accepted article at the Publisher.

Author inquiries: For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission), the status of accepted articles through our Online Article Status Information System, author Frequently Asked Questions, and any other inquiries relating to Elsevier, please consult www.elsevier.com/authors.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided by Elsevier when an article is accepted for publication.

IASP does not publish announcements in the journal. For possible inclusion of announcements in the IASP Newsletter, please contact IASP, 1510 H Street NW, Suite 600, Washington DC USA 20005-1020, Fax: 1.202.524.5301; e-mail: iaspdesk@iasp-pain.org; www.iasp-pain.org.

Cover Material. IASP invites you to suggest cover images. The illustration may be from a manuscript submitted for publication, a previous paper published in PAIN®, or material not published previously. Photographs of historical interest are also welcome.

Online access to PAIN® (members only) can be found at: www.iasp-pain.org/PAIN.

This content will be archived for PAIN® at the Dutch Royal Library, The Netherlands.

Updated April 16, 2013.

Clinical/Basic Science Research Reports

The manuscript must contain an Abstract (unstructured, 250 words), Introduction (500 words), Methods (no word limit), Results (no word limit), Discussion (1,500 words), Acknowledgments, and References .

File format should be Microsoft Word, and manuscript pages should be numbered.

Title page. The title page should include the following: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the entire manuscript (including pages containing figures and tables) and the actual number of figures and tables; (v) the author to whom correspondence should be sent and this author's complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address, and, if available, institutional URL.

Acknowledgments. Place acknowledgments at the end of the text before the reference list and specify the following: (1) contributions that need acknowledging but do not justify authorship; (2) acknowledgments of technical help; (3) acknowledgments of financial and material support, specifying the nature of the support; (4) financial arrangements that may represent a possible conflict of interest.

This would also include any of the following arrangements, such as if any of the authors

have a financial relationship to the work;

have received any government or company grants or research support;

are employees of a company;

are consultants for a company;

are stockholders of the company;

are members of a speakers bureau; or
 have received any other form of financial support.

Conflict of Interest. A Conflict of Interest statement must be included for all manuscripts within the Acknowledgments section. Even if there are no conflicts of interest, please explicitly state this.

References. Cite literature references in the text using bracketed numbers that correspond to the alphabetized and numbered reference list as follows: "Pain is made worse if you hit the already injured site [15]." For multiple references in the text, please use the format [number,number] (with a comma and no spaces). For example: [2,4,28,33].

- All references cited in the text must be listed at the end of the paper. They should be numbered, double spaced, and arranged alphabetically by first author last name.

- All authors must be listed in the references; the use of et al. is not acceptable. - References must be complete, including initial(s) of author(s) cited, title of paper, journal, year of publication,

and volume and page numbers.

- For citations of books, the following uniform sequence should be maintained: author(s), title of article, editor(s), complete title of book, place of publication, publisher, year, and page numbers.

- Journal titles should be abbreviated according to the National Library of Medicine's Index Medicus. Please refer to the NLM website's FAQ on how to find Index Medicus journals: www.nlm.nih.gov/services/aim.html.

- Unpublished data, personal communications, abstracts that cannot be retrieved by casual readers (e.g., meeting abstracts that require logging into a members-only site), and other inaccessible materials should not be listed as references. Unpublished materials may be cited in parentheses within the text.

- For manuscripts containing citations that are in press, authors must have electronic copies immediately available in case reviewers/editors request these materials.

- URLs should be included for all references that are publicly accessible via the Internet.

Examples:

[1] Adams CWM. Neurohistochemistry. Amsterdam: Elsevier, 1965.

[2] Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and

regulation in health and disease. *Eur J Pain* 2005;9:463-84.

[3] Eccles R. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis* 2005;5:718-25.

[4] Turner JA. Coping and chronic pain. In: Bond MR, Charlton JE, Woolf CJ, editors. *Pain research and clinical management. Proc. VIth World Congress on Pain, Vol. 4. Amsterdam: Elsevier,; 1991. pp. 219-227.*

Figure legends. Provide each illustration with a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend; do not reproduce the title and legend on the figure itself. Legends should appear on a separate page at the end of the manuscript. Each legend should be numbered consecutively with Arabic numerals (i.e., Fig. 1, Fig. 2, etc.), and should begin with the number of the illustration to which they refer. Explain all symbols and abbreviations used in the figure.

Tables. Tables, with their captions and legends, should be intelligible with minimal reference to the text.

Tables of numerical data should each be typed (double spaced) on a separate page, numbered in sequence with Arabic numerals (i.e., Table 1, Table 2, etc.), provided with a title/heading, and referred to in the text as Table 1, Table 2, etc. Provide a detailed description of its contents and any footnotes below the body of the table.

Upload figures and tables as separate files.