



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
PPGO

ASSOCIAÇÃO DE FATORES BIOPSISSOCIAIS, CLÍNICOS E
POLIMORFISMO NO GENE *BRINP3* COM A DTM

NEBLYSSA AGATHA SCHNEIDER

CURITIBA
2022

NEBLYSSA AGATHA SCHNEIDER
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA – ÊNFASE EM ORTODONTIA
BOLSA CIP

**ASSOCIAÇÃO DE FATORES BIOPSISSOCIAIS, CLÍNICOS E
POLIMORFISMO NO GENE *BRINP3* COM A DTM**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob orientação da **Profa. Dra. Elisa Souza Camargo** e Coorientação da **Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto**.

CURITIBA
2022

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

S359a Schneider, Neblyssa Agatha
2022 Associação de fatores biopsicossociais, clínicos e polimorfismo no gene
brinp3 com a DTM / Neblyssa Agatha Schneider ; orientadora: Elisa Souza
Camargo ; coorientadora: Paula Cristina Trevilatto. – 2022.
47 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2022
Inclui bibliografias

1. Ortodontia. 2. Polimorfismo genético. 3. Articulação temporomandibular.
4. Genes. I. Camargo, Elisa Souza. II. Trevilatto, Paula Cristina. III. Pontifícia
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
IV. Título.

CDD 21. ed. – 617.643



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Escola de Medicina e Ciências da Vida

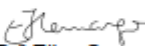
TERMO DE APROVAÇÃO


NEBLYSSA AGATHA SCHNEIDER


**ASSOCIAÇÃO DE FATORES BIOPSISSOCIAIS, CLÍNICOS, E POLIMORFISMO NO
GENE *BRINP3* COM A DTM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração **Clinica Odontológica Integrada - Ortodontia**.


Orientador (a):


Prof. Dr^a Elisa Souza Camargo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof^a Dr^a Luciana Reis Azevedo Alanis
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Orlando M. Tanaka
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof^a Dr^a Michelle Santos Vianna
Curso de Odontologia, UFPR


Prof^a Dr^a Luciana Signorini
Residência Multiprofissional em Odontologia – Cirurgia e Traumatologia
Bucamaxilofacial, HEG

Curitiba, 10 de agosto de 2022.



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

Pela fé concedida para que eu pudesse acreditar na caminhada.

Gratidão pela força para chegar até aqui, com muita benção e amor no coração.

Os meus sinceros agradecimentos às minhas orientadoras.

Agradeço à Prof. Dra. Elisa Souza Camargo pela confiança depositada em todos os momentos. Obrigada pela orientação durante todo o curso. Gratidão por me inspirar com seu exemplo de profissional e ser humano ímpar.

Agradeço à Prof. Dra. Paula Cristina Trevilatto pela oportunidade que me concedeu ao me orientar nesse trabalho. Obrigada por compartilhar comigo tantos ensinamentos. Minha eterna admiração e grande inspiração para a vida.

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe Larissa por me fazer sonhar. Obrigada por fazer o impossível para que tudo fosse possível. Obrigada por despertar em mim essa vontade insaciável de ir além, sem nunca me tirar o brilho do olhar. Obrigada por ser pai e mãe exemplar.

Agradeço de corpo, alma e coração, o apoio incondicional, amor e dedicação da minha avó Eloina (*in memoriam*) em todas as etapas da minha vida. Meu suporte, minha melhor amiga, meu eterno amor. Essa conquista é nossa!

Agradeço ao meu marido Eduardo, por fazer tudo ser leve e alegre. Por me apoiar sempre e principalmente, por me ajudar a ir além em todas as realizações dos meus sonhos com amor e positividade!

Agradeço ao meu filho Rafael, que me presenteou com sua vida, nascendo na reta final do curso alegrando os meus dias. Sempre calmo e tranquilo trouxe sua paz e os seus sorrisos, fazendo tudo ficar ainda melhor. Obrigada meu amor.

Agradeço aos meus colegas do Doutorado em especial ao time que trabalhou comigo e ofereceu todo o suporte: Lais Giacobbo, Ian Luna Parente Brasileiro, Maria Augusta A. Perin e Valéria Huk de Andrade, muito obrigada!

À Profa. Dra. Andrea Duarte Doetzer e ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pela dedicação e profissionalismo. Sem eles esse trabalho não seria possível.

À equipe de professores da Ortodontia: Prof. Dra. Elisa S. Camargo, Prof. Dr. Odilon Guariza Filho e Prof. Dr. Orlando Motohiro Tanaka, por estarem sempre à frente, despertando a vontade de prosseguir e inspirando desde o mestrado. Muito obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. Armando Saga pela oportunidade de estágio durante toda a graduação, me ensinando a prática clínica com visão científica, me instigando a aprender sempre mais e inspirando com seu exemplo de profissional.

Agradeço aos colaboradores da PUCPR, em especial a Irenice da Silva, Neide Reis Borges e Rosana da Cunha por estarem sempre em prontidão para ajudar.

Agradeço à PUCPR por me acolher, mais uma vez, fazendo parte fundamental da minha formação. Grata à isenção CIP que tornou tudo possível.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	1
Página título	1
Resumo	2
Introdução	3
Objetivo	6
Material e métodos.....	7
Resultados	10
Discussão.....	13
Conclusão	16
Referências	17
Anexos.....	44
ARTIGO EM INGLÊS.....	23
Title Page	23
Abstract	24
Introduction.....	25
Objective	27
Materials and methods	28
Results	31
Discussion	34
Conclusions.....	37
References	38

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Página título

**ASSOCIAÇÃO DE FATORES BIOPSISSOCIAIS, CLÍNICOS E
POLIMORFISMO NO GENE *BRINP3* COM A DTM**

Neblyssa Agatha Schneider

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Escola de Medicina e Ciências da Vida

Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO), Ortodontia

email: neblyssa@gmail.com

Correspondência: Paula Cristina Trevilatto. Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho. Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80215-901. Telefone: +55 (41) 3271-1849, email: paula.trevilatto@pucpr.br

Resumo

A Disfunção Temporomandibular (DTM) afeta em média até 30% da população, acometendo mais mulheres, na faixa etária entre 20 e 40 anos. Sua etiologia é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e biopsicossociais. **Objetivo:** investigar fatores biopsicossociais, clínicos e o polimorfismo genético rs1342913, no gene *BRINP3*, associados à DTM. **Material e Métodos:** Esse é um estudo caso-controle, com uma amostra de 226 indivíduos do sexo feminino, divididos em grupo caso, 95 pacientes com DTM, e grupo controle, 131 pacientes sem DTM. Para diagnóstico da DTM foi utilizado o *Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders* (RDC/DTM). Foram estudados: idade, etnia, tabagismo, depressão e ansiedade. Para depressão, foi utilizado o instrumento *Patient Health Questionnaire 9* (PHQ-9) e, para ansiedade, o *Generalized Anxiety Disorder 7* (GAD7). A seleção do marcador do gene *BRINP3* foi feita a partir do site *Info Web Server*. O rs1342913 apresentava alto desequilíbrio de ligação com outros 67 marcadores, cobrindo aproximadamente 50% do gene. A genotipagem foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste Qui-quadrado de Pearson. As variáveis quantitativas foram analisadas pelo Teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. **Resultados:** na análise univariada, idade ($p=0,002$) e depressão ($p=0,007$) estiveram associadas à DTM. Na análise genética, não houve associação do polimorfismo com a DTM. **Conclusão:** a menor média de idade e a depressão foram as variáveis associadas à DTM. Não houve associação entre o polimorfismo rs1342913 e a DTM.

Palavras-chave: Polimorfismo genético, *BRINP3*, Gene, ATM, Transtornos da Articulação Temporomandibular.

1. Introdução

As disfunções temporomandibulares (DTMs) são definidas pela *American Academy of Orofacial Pain*, como um grupo de condições que acometem as regiões musculoesqueléticas e neuromusculares das articulações temporomandibulares (ATMs), os músculos da mastigação e tecidos relacionados [1].

Considerada um problema de saúde pública, a DTM é uma condição que afeta mundialmente cerca de 5 a 15 % da população [2], podendo acometer 30% da população adulta [3]. Atinge mais mulheres na faixa etária entre 20 e 40 anos [4]. A DTM impacta a qualidade de vida do indivíduo, refletindo diretamente na sua incapacidade, prejudicando o seu rendimento psicossocial e afetando suas atividades profissionais [5]. Nos Estados Unidos, essa condição demanda US\$ 4 bilhões de dólares anualmente em custos de saúde que dobraram na última década. [5]

A DTM é dividida em três grupos: o grupo I envolve o diagnóstico muscular (dor miofascial), o grupo II refere-se aos deslocamentos de disco (com e sem redução), e o grupo III inclui artralgia, osteoartrose e osteoartrite. [6]

Entre os diversos tipos de DTMs, 40% referem-se aos deslocamentos de disco articular com e sem redução [7]. Embora tratem das mesmas estruturas anatômicas, a biomecânica desse deslocamento acontece de maneiras diferentes, ambos podendo apresentar sintomatologia dolorosa [7]. O deslocamento de disco com redução (DDCR) é o mais comum. Ocorre quando o disco articular se descola anteriormente à cabeça da mandíbula em posição de repouso, e retorna à sua posição fisiológica durante o movimento de abertura bucal, normalmente associado ao estalido [8]. O deslocamento de disco sem redução (DDSR), manifesta-se quando o disco se desloca, e é comumente acompanhado de limitação da amplitude durante o movimento de abertura bucal. Isso ocorre devido à posição do disco, que estando mais anteriorizado, impede o movimento de translação da cabeça da mandíbula. [7,8].

As disfunções na ATM podem ser decorrentes de um trauma ou de uma sobrecarga articular, resultando na inflamação [9]. O processo inflamatório é decorrente de fenômenos homeostáticos dos tecidos vascularizados, que visam reparar agentes lesivos através dos mediadores inflamatórios (MI) [10].

Atualmente, a etiologia da DTM é considerada complexa com fatores ambientais, biológicos e psicológicos, agindo sinergicamente. [11] Além disso, hiperatividade muscular, trauma e fatores emocionais predisponentes, como estresse, ansiedade e depressão também podem estar envolvidos [11]. Diretrizes da Academia Americana de Dor Orofacial passaram a considerar também, fatores genéticos na etiologia da DTM. [12]

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são as formas mais comuns de variação do DNA [13]. A influência de polimorfismos genéticos associados à dor e ao desenvolvimento da DTM tem sido considerada um marco na investigação do componente genético na etiologia da doença [14]. A DTM foi associada com o polimorfismo *TNFA-308* (rs1800629) do gene *TNFA* [15] e com o polimorfismo 102T-C do gene *HTR2A* [16].

O gene BMP / retinoic acid inducible neural specific 3 (*BRINP3*), também chamado de *FAM5C*, *DBCCR1L* ou *DBCCR1L1*. É formado por 8 éxons e está localizado no cromossomo 1 na posição 1q.31.1. Esse gene codifica a proteína bone morphogenetic protein/retinoic acid-inducible neural specific protein 3 (*BRINP3*) [17,18], composta de 766 aminoácidos [17]. A *BRINP3* localiza-se na mitocôndria e está envolvida em mecanismos celulares de proliferação, migração e apoptose celular [19]. A via mitocondrial mostrou um papel importante na apoptose celular e esteve relacionada com a degeneração do disco da ATM em pacientes com DTM. [20,21]

Polimorfismos no gene *BRINP3* foram associados às condições imunoinflamatórias como doença arterial coronariana [22], tumores hipofisários [19], cicatrização de fraturas [23], peri-implantite [24] e periodontite agressiva [25]. Esses achados sugerem que *BRINP3* está relacionado a condições inflamatórias, entretanto o mecanismo regulatório da proteína e expressão do gene permanecem pouco descritos na literatura. [19,25].

Não existem estudos investigando a associação de polimorfismos no gene *BRINP3* com a DTM. Portanto, a hipótese desse trabalho é que fatores biopsicossociais, clínicos e o polimorfismo rs1342913 do gene *BRINP3* estejam associados à DTM.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre fatores biopsicossociais, clínicos e o polimorfismo rs1342913 no gene *BRINP3* com a DTM.

3. Material e Métodos

Amostra

O estudo caracterizou-se como observacional caso-controle. A amostra foi composta por 226 pacientes do sexo feminino, com idades entre 18 e 73 anos, recrutadas na Clínica de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e no ambulatório do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Para análise de fatores biopsicossociais, clínicos e genéticos, a amostra foi dividida em dois grupos. O grupo caso foi composto por 95 pacientes diagnosticadas com DTM (deslocamento de disco articular com ou sem redução e artralgia) e grupo controle composto por 131 pacientes sem DTM.

As participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), previamente à coleta de dados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, sob o número de protocolo 1.863.521.

Não foram incluídas nesse estudo pacientes que apresentaram situações que pudessem comprometer a resposta imunoinflamatória, tais como: uso crônico de anti-inflamatórios, diabetes, hepatite, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), quimioterapia, doença maligna, doença autoimune, gravidez ou lactação, cirurgia prévia na ATM e presença de dor miofascial sem artralgia.

Diagnóstico da DTM

O diagnóstico da DTM foi realizado por meio de uma ferramenta de autoavaliação, baseada no *Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders* (RDC/TMD) [26]. O teste avalia aspectos clínicos e psicossociais para o diagnóstico da DTM. As pacientes responderam um questionário de autoavaliação. Para exame clínico, dois pesquisadores experientes (ADD) e (ILPB), após estarem calibrados pelo teste Kappa (coeficiente inter-examinador 9,5, intra-examinador 9,6), realizaram a palpação dos músculos masseter, temporal e das ATMs.

Fatores biopsicossociais

Dados como idade, etnia e tabagismo foram coletados a partir de informações disponíveis no prontuário odontológico das pacientes.

Escala de depressão

Para a avaliação da depressão foi utilizado o instrumento *Patient Health Questionnaire 9* (PHQ-9) [27]. O questionário é composto por dez perguntas que avaliam a depressão. A pontuação máxima do teste é de 27 escores, com uma escala de pontuação de somatória para a interpretação entre os diferentes níveis de depressão: leve (5 a 9), moderado (10 a 14), moderado-severo (15 a 19) e severo (20 a 27).

Escala de ansiedade

Para a avaliação da ansiedade, foi utilizado o teste *Generalized Anxiety Disorder 7* (GAD-7) [28]. O teste compreende sete itens que avaliam o comportamento ansioso do paciente, com pontuação máxima de 21 escores. Os níveis de escala variam entre: sem ansiedade (0 a 4), ansiedade leve (5 a 9), moderada (10 a 14) e severa (15 a 21).

Coleta e Purificação do DNA

O DNA foi obtido a partir de células epiteliais bucais coletadas por meio de um bochecho com solução de glicose 3% durante 1 minuto, seguida pela raspagem da mucosa bucal [29]. A solução foi agitada vigorosamente e imediatamente armazenada em tubos refrigerados. As células epiteliais bucais foram sedimentadas por centrifugação a 706 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspenso em 1.300 µl de tampão de extração [10 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM de EDTA, 0,5% de SDS]. Foram adicionados à solução 10 µl de proteinase K (20 mg/ml), deixada durante a noite a 65°C. O DNA foi purificado por adição de acetato de amônio 10 M, precipitado com isopropanol e ressuspenso com 50 µl de solução de extração [Tris 10 mM (pH 7,6) e EDTA 1 mM] [30].

Seleção do *tag*SNP do gene *BRINP3* e genotipagem

A seleção do *Tag*SNP do gene *BRINP3* foi realizada por meio de informações disponíveis no SNP *Info* *Web* *Server* (www.snpinfo.nih.gov/snpinfo/snptag.html) no ano de 2019. Os critérios de seleção para os marcadores foram: frequência alélica mínima (FAM) de 25%, população CEU (residentes de Utah com ascendência do norte e oeste da Europa), e desequilíbrio de ligação (DL) $\geq 80\%$ ($r^2 \geq 0,8$). Seguindo esses critérios, o *tag*SNP rs1342913 foi selecionado, possibilitando a cobertura de aproximadamente 50% do gene *BRINP3*, estando em alto DL com outros 67 marcadores.

O *tag*SNP rs1342913 foi genotipado pela Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com o uso da tecnologia TaqMan™ Genotyping Max Mister (Applied Biosystems). Foi utilizado o controle negativo em todas as genotipagens realizadas.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS, versão 23.0, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi obtido no Haploview 4.1.

As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste Qui-quadrado de Pearson e expressas como frequência e porcentagem. Variáveis quantitativas foram analisadas pelo Teste t de Student e descritas como média e desvio padrão.

Para análise genotípica nos modelos dominante e recessivo, foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson. O modelo aditivo foi avaliado por regressão logística binária.

Resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As estimativas de risco foram acessadas por cálculo de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

4. Resultados

O resultado da análise dos fatores biopsicossociais (tabela 1), mostrou a média de idade de 31,48 ($\pm 11,52$) anos para o grupo caso, e 37,57 ($\pm 15,57$) anos para o grupo controle ($p=0,002$). Etnia e tabagismo não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e caso, respectivamente, ($p=0,714$) e ($p=0,331$).

A variável depressão apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,007$). O nível de depressão severa foi observado em 52,6% no grupo caso, *versus* 34,4% no grupo controle. Não foi encontrada associação entre DTM e ansiedade ($p=0,084$).

Tabela 1. Resultado da análise univariada dos fatores biopsicossociais e clínicos para o grupo controle (n=131) e caso (n=95).

	Controle (n = 131)	Caso (n = 95)	Valor de p	OR (IC 95%)
Idade [^]	37,57 ($\pm 15,57$)	31,48 ($\pm 11,52$)	0,002*	-
Etnia [^]				
Caucasiana	88 (67,2)	66 (69,5)	0,714**	1,112 (0,630-1,964)
Não Caucasiana	43 (32,8)	29 (30,5)		
Tabagismo [^]				
Fumantes	10 (7,8)	11 (11,6)	0,331**	0,642 (0,261-1,580)
Não fumantes	119 (92,2)	84 (88,4)		
Depressão [^]				
Sem depressão	3 (2,3)	0 (0,0)	0,007**	-
Leve	20 (15,3)	5 (5,3)		
Moderada	63 (48,0)	40 (42,1)		
Severa	45 (34,4)	50 (52,6)		
Ansiedade [^]				
Sem ansiedade	12 (9,1)	2 (2,2)	0,084**	-
Leve	14 (10,7)	8 (8,4)		
Moderada	47 (35,9)	31 (32,6)		
Severa	58 (44,3)	54 (56,8)		

*Teste T de Student

**Teste Qui-Quadrado de Pearson

[^]Valor de n pode diferir do n total dos grupos, devido à omissão das respostas em questão

OR: *Odds Ratio*

IC: Intervalo de confiança

Análise genética

As frequências genótípicas do marcador testado estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle. O *tag*SNP rs1342913 não apresentou associação com a DTM em nenhum dos modelos genotípicos estudados $p > 0,05$ (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da análise univariada do *tag*SNP rs1342913 do gene *BRINP3* nos modelos aditivo, dominante e recessivo para os grupos caso (n=95) e controle (n=131).

Gene	<i>tag</i> SNP dbSNP ^a	Modelo Genético	Genótipos ^b	Grupos - n (%)		Valor de p	OR (IC 95%)
				Caso	Controle		
<i>BRINP3</i>	rs1342913	Aditivo	AA	34 (38,2)	40 (32,3)	0,651 [‡]	
			AG	39 (43,3)	58 (46,8)	0,413 [‡]	1,381 (0,638 - 2,991)
			GG	17 (18,5)	26 (21,0)	0,815 [‡]	0,947 (0,520 - 2,298)
		Dominante A	AA+AG	73 (82,0)	98 (79,0)	0,589 [*]	1,210 (0,606 - 2,420)
			GG	16 (18,0)	26 (21,0)		
		Recessivo A	AG +GG	55 (61,8)	84 (67,7)	0,369 [*]	0,770 (0,436 - 1,362)
			AA	34 (38,2)	40 (32,3)		

^aIdentificador de SNP baseado no dbSNP do NCBI

^bO alelo A é o mais frequente no grupo caso

[‡]Regressão logística binária

^{*}Teste Qui-quadrado de Pearson

OR: *Odds Ratio*

IC: Intervalo de Confiança

Diferenças no valor de n em decorrência de amostras não amplificadas

Poder amostral

O poder da amostra foi de 86% considerando a frequência do alelo mais raro de 42% (tabela 3).

Tabela 3. Cálculo do poder amostral, utilizando a ferramenta *Genetic Power Calculator tool* [31], estabelecendo como parâmetros: prevalência de DTM 30%, tamanho do efeito de 2,0 para carregar uma cópia do alelo de risco e 4,0 para carregar duas cópias do alelo de risco, $D'=1$, frequência do alelo raro de 42%, razão de caso e controle de 1,5 e nível de significância de 5%.

Frequência do alelo	rs1342913	
	Poder	n casos para 80% de poder
0,05	0,07	3267
0,1	0,29	378
0,2	0,86	80

5. Discussão

Esse é o primeiro trabalho a investigar o gene *BRINP3* como potencial gene candidato associado à DTM. Neste estudo transversal com mulheres, nossa hipótese foi que o polimorfismo genético no gene *BRINP3* poderia estar associado a sinais e sintomas clínicos de DTM. Foi observada a associação da menor idade e depressão com a DTM. Por outro lado, nossa hipótese de que o gene *BRINP3* (rs1342913) pudesse estar envolvido na etiologia da DTM não foi confirmada na amostra estudada.

Observou-se a menor média de idade no grupo caso. A literatura mostra uma maior prevalência de DTM em mulheres jovens na faixa entre 20 e 40 anos [32]. Estudo epidemiológico também encontrou a prevalência de DTM em mulheres jovens, na faixa etária de 21 a 30 anos, reforçando o público como o mais acometido [33].

A DTM é uma doença na qual várias citocinas e mecanismos imunorreguladores estão envolvidos [16]. Caracteriza-se por sintomas muitas vezes acompanhados de dor, inflamação, estalidos e movimentos mandibulares limitados [34,35]. Essa condição é de difícil diagnóstico e entre os fatores de risco estão o estresse, a ansiedade e a depressão [36]. A influência de fatores genéticos na etiopatogenia da DTM também vem sendo mundialmente discutida ao longo dos anos [14].

Diferentes estudos apontam a depressão como fator de risco para a DTM [36, 37,38,39]. Os resultados encontrados evidenciam a importância de relacionar a DTM aos fatores biopsicossociais envolvidos. O diagnóstico da depressão baseou-se no instrumento PHQ-9, um teste com boa sensibilidade, especificidade e confiabilidade. Além disso, esse instrumento foi validado em diferentes idiomas e várias populações [27, 28, 40, 41]. Nossos resultados mostraram a associação da depressão com a DTM na análise univariada. Dessa forma, a depressão foi observada como um fator de risco para a disfunção da ATM em mulheres jovens, corroborando com a literatura que descreve essa condição biopsicossocial como fator predisponente [35,40,41].

A ansiedade é considerada um fator de risco para a DTM [37,38,39]. Fatores como o estresse e a ansiedade estão diretamente relacionados a hábitos parafuncionais, e podem ter papel significativo no aumento da hiperatividade muscular, sobrecarregando a ATM, e até mesmo causando lesões musculares [42]. Em nosso estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre ansiedade e a população estudada.

Entre os fatores relacionados ao desenvolvimento da DTM, destaca-se o papel do componente genético. Diferentes genes foram associados à DTM [15,16, 43], entre eles, o polimorfismo 102T-C do gene *HTR2A*, em um estudo evidenciando alterações do sistema serotoninérgico, também associado à disfunção [16]. Além disso, polimorfismos no gene *COMT*, envolvido em alterações enzimáticas das catecolaminas (endorfina, dopamina e noradrenalina), foram descritos na literatura associados à DTM [44].

No presente estudo, o gene candidato foi o *BRINP3*, expresso em células musculares lisas vasculares, células mioblásticas, no sistema nervoso e nas células cancerígenas. No entanto, seu mecanismo de ação é pouco descrito na literatura e precisa ser elucidado para melhor compreensão da sua função exata [45]. Está localizado no braço longo do cromossomo 1, em região de íntron, e codifica a proteína BRINP3 [18, 20].

BRINP3 é uma proteína que participa da resposta imunoinflamatória, envolvida na proliferação, migração e apoptose celular [19, 20]. Localizada na mitocôndria celular, sua superexpressão leva ao aumento da proliferação e migração de células [19]. As mitocôndrias estão envolvidas no metabolismo sendo importantes no sistema imunológico [19, 46]. Um estudo com pacientes que apresentavam deslocamento de disco articular na ATM mostrou que a apoptose das células ocorreu parcialmente pela via mitocondrial [20]. Além disso, outros estudos envolvendo hérnia de disco lombar e da ATM mostraram a associação da degeneração do disco com a apoptose celular [20,47,48,49].

Polimorfismos no gene *BRINP3* foram associados ao aumento da inflamação vascular [45] e ao infarto do miocárdio [50]. Ainda, estudos evidenciaram que o polimorfismo rs1342913 foi associado com a cicatrização

óssea [23], peri-implantite [24] e periodontite agressiva [25]. Em nossa análise genética, o rs1342913 do gene *BRINP3* não mostrou associação com a DTM.

Uma abordagem genética que utiliza SNPs em alto desequilíbrio ligação (DL) permite que não seja necessária a genotipagem de todos os polimorfismos presentes em um determinado gene, mas apenas de SNPs “alvos” (*tagSNPs*), que capturam toda a informação do gene em termos de variabilidade. Essa estratégia torna possível a investigação de menos SNPs, reduzindo custos e tempo de genotipagem. Neste estudo, é importante observar que o polimorfismo rs1342913 captura a informação de outros 67 *tagSNPs* e cobre cerca de 50% da estrutura do gene *BRINP3*.

Uma limitação desse estudo é a escolha da população CEU, específica para a população descendente de Europeus. Contudo, apesar do nosso país contar com uma grande miscigenação, sabe-se que a população escolhida representa a região Sul do Brasil e seus imigrantes. Além disso, a replicação do estudo em outras populações é mandatória para elucidar o envolvimento desse gene no controle da etiopatogênese da DTM. Outro fator limitante, é a variabilidade de transtornos biopsicossociais como a ansiedade, que utilizou um instrumento pontual para avaliar um tipo de transtorno ansioso (escala GAD-7). No entanto, é importante destacar que a ansiedade generalizada avaliada é um dos transtornos mais comuns na prática clínica. [28]

Ao se tratar de uma condição complexa e de grande impacto na saúde pública, é de extrema importância a determinação dos fatores clínicos e biopsicossociais associados a essa condição. Nesse contexto, mais estudos são necessários incluindo outros polimorfismos do gene *BRINP3*, bem como outros genes da resposta imunoinflamatória do indivíduo, para a completa elucidação de fatores genéticos associados ao risco às DTMs.

6. Conclusão

A menor média de idade e o fator biopsicossocial depressão mostraram-se associadas à DTM. Os fatores etnia, tabagismo e ansiedade não tiveram associação com a DTM.

Na população estudada, a associação de polimorfismo no gene *BRINP3* (rs1342913) com à DTM não foi encontrada.

Referências

1. Dworkin S. Personal and societal impact of orofacial pain. In: Friction JR, Dubner RB, editors. Orofacial pain and temporomandibular disorders. New York: Raven Press; 1995. p. 15-32.
2. Schmitter M, Rammelsberg P, Hassel A. The prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders in very old subjects. *J Oral Rehabil* 2005; 32:467-73.
3. Valesan, L.F., Da-Cas, C.D., Réus, J.C. *et al.* Prevalence of temporomandibular joint disorders: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Invest* 25, 441–453 (2021).
4. Roda RP, Bagán JV, Fernández JMD, Bazán SH, Soriano YJ. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: Classification, epidemiology and risk factors. *Med Oral Patol Circ Bucal* 2007; 12: 292-8.
5. National Institute of Dental and Craniofacial Research. [7/28/2013] Facial Pain. [http:// www.nidcr.nih.gov/DataStatistics/FindDataByTopic/FacialPain/](http://www.nidcr.nih.gov/DataStatistics/FindDataByTopic/FacialPain/)
6. Franco-Micheloni AL, Fernandes G, de Godoi Gonçalves DA, Camparis CM. Temporomandibular Disorders in a Young Adolescent Brazilian Population: Epidemiologic Characterization and Associated Factors. *J Oral Facial Pain Headache*. 2015 Summer;29(3):242-9. doi: 10.11607/ofph.1262. PMID: 26244432.
7. Mlernik M, Więckiewicz W. The basic conservative treatment of temporomandibular joint anterior disc displacement without reduction - Review. Vol. 24, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2015. p. 731–5.
8. Okeson JP, de Leeuw R. Differential Diagnosis of Temporomandibular Disorders and Other Orofacial Pain Disorders. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2011 Jan;55(1):105–20.
9. Young AL. Internal derangements of the temporomandibular joint: A review of the anatomy, diagnosis, and management. *J Indian Prosthodont Soc*. 2015 Jan-Mar;15(1):2-7. doi: 10.4103/0972-4052.156998. PMID: 26929478; PMCID: PMC4762294.

10. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone*. 2016 Apr; 85:81-90. doi: 10.1016/j.bone.2016.01.019. Epub 2016 Jan 23. PMID: 26812612.
11. Ohrbach R, Fillingim RB, Mulkey F, Gonzalez Y, Gordon S, Gremillion H, et al. Clinical findings and pain symptoms as potential risk factors for chronic TMD: descriptive data and empirically identified domains from the OPPERA case-control study. *J Pain*. 2011;12: T27–45.
12. de Leeuw R, editor. *Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis, and management*, 4th ed. Chicago, IL: Quintessence; 2008. p. 129–204
13. Roskamp L, Trevilatto P, Souza C, Silva Neto U, Carneiro E, Fariniuk L, Westphalen VPD. Analysis of the association of clinical factors and il4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. *Int Endod J* 2018;51.1:12-19
14. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, Shagin D, Max MB, Makarov SS, Maixner W. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet*. 2005 Jan 1;14(1):135-43.
15. Furquim BD, Flamengui LM, Repeke CE, Cavalla F, Garlet GP, Conti PC. Influence of TNF- α -308 G/A gene polymorphism on temporomandibular disorder. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016 May;149(5):692-8.
16. de Freitas LV, Lopes AC, Piatto VB, Maniglia JV. Association of temporomandibular dysfunction with the 102T-C polymorphism in the serotonin receptor gene in Brazilian patients. *Arch Med Sci*. 2013 Dec 30;9(6):1013-8.
17. Kawano H, Nakatani T, Mori T, et al. 2004. Identification and characterization of novel developmentally regulated neural-specific proteins, BRINP family. *Brain Res Mol Brain Res* 125:60–75.
18. Tanaka KI, Matsumoto E, Higashimaki Y, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. FAM5C is a soluble osteoblast differentiation factor linking muscle to bone. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;418(1):134-9.

19. Shorts-Cary L, Xu M, Ertel J, Kleinschmidt-Demaster BT, Lillehei K, Matsuoka I, et al. Bone morphogenetic protein and retinoic acid-inducible neural specific protein-3 is expressed in gonadotropic cell pituitary adenomas and induces proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology*. 2007; 148:967–75.
20. Caltabiano R, Leonardi R, Musumeci G, Bartoloni G, Rusu MC, Almeida LE, Loreto C. Apoptosis in temporomandibular joint disc with internal derangement involves mitochondrial-dependent pathways. An in vivo study. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):577-83. doi: 10.3109/00016357.2012.700060. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22783811.
21. Loreto C, Musumeci G, Castorina A, Loreto C, Martinez G. Degenerative disc disease of herniated intervertebral discs is associated with extracellular matrix remodeling, vimentin-positive cells and cell death. *Ann Anat*. 2011 Mar;193(2):156-62. doi: 10.1016/j.aanat.2010.12.001. Epub 2011 Jan 26. PMID: 21330123.
22. Chen X, Chen X, Xu Y, Yang W, Wu N, Ye H, Yang JY, Hong Q, Xin Y, Yang MQ, Deng Y, Duan S. Association of six CpG-SNPs in the inflammation-related genes with coronary heart disease. *Hum Genomics*. 2016 Jul 25;10.
23. Guimarães JM, Guimarães IC, Duarte ME, Vieira T, Vianna VF, Fernandes MB, Vieira AR, Casado PL. Polymorphisms in BMP4 and FGFR1 genes are associated with fracture non-union. *J Orthop Res*. 2013 Dec;31(12):1971-9.
24. Casado PL, Aguiar DP, Costa LC, Fonseca MA, Vieira TC, Alvim-Pereira CC, Alvim-Pereira F, Deeley K, Granjeiro JM, Trevilatto PC, Vieira AR. Different contribution of BRINP3 gene in chronic periodontitis and peri-implantitis: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015 Mar 11;15:33.
25. Carvalho FM, Tinoco EM, Deeley K, Duarte PM, Faveri M, Marques MR, Mendonça AC, Wang X, Cuenco K, Menezes R, Garlet GP, Vieira AR. FAM5C contributes to aggressive periodontitis. *PLoS One*. 2010 Apr 7;5(4).
26. Chiffman E, Ohrbach R, Truelove E, Look J, Anderson G, Goulet JP, List T, Svensson P, Gonzalez Y, Lobbezoo F, Michelotti A, Brooks SL, Ceusters W, Drangsholt M, Ettlin D, Gaul C, Goldberg LJ, Haythornthwaite JA, Hollender L, Jensen R, John MT, De Laat A, de Leeuw R, Maixner W, van der Meulen M, Murray GM, Nixdorf DR, Palla S, Petersson A, Pionchon P, Smith B, Visscher CM, Zakrzewska J, Dworkin SF; International RDC/TMD Consortium Network, International association for Dental Research; Orofacial

- Pain Special Interest Group, International Association for the Study of Pain. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD) for Clinical and Research Applications: recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network* and Orofacial Pain Special Interest Group†. *J Oral Facial Pain Headache*. 2014 Winter;28(1):6-27.
27. Kroenke K, Spitzer RL, Williams JB. The PHQ-9: validity of a brief depression severity measure. *J Gen Intern Med*. 2001 Sep;16(9):606-13.
 28. Spitzer RL, Kroenke K, Williams JB, Löwe B. A brief measure for assessing generalized anxiety disorder: the GAD-7. *Arch Intern Med*. 2006 May 22;166(10):1092-7.
 29. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000 Jun;18(1):6-9. PMID: 11324090.
 30. Aidar M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 2007;18: 148-152.
 31. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*. 2003 Jan;19(1):149-50. doi: 10.1093/bioinformatics/19.1.149. PMID: 12499305.
 32. Ferreira CL, Silva MA, Felício CM. Signs and symptoms of temporomandibular disorders in women and men. *Codas*. 2016 Jan-Feb;28(1):17-21.
 33. Luz JG, Maragno IC, Martin MC. Characteristics of chief complaints of patients with temporomandibular disorders in a Brazilian population. *J Oral Rehabil*. 1997 Mar;24(3):240-3.
 34. Celik D, Mutlu EK. Clinical implication of latent myofascial trigger point. *Curr Pain Headache Rep*. 2013 Aug;17(8):353
 35. Griffiths, R.H. Report of Presidents Conference on Examination, Diagnosis and Management of Temporomandibular Disorders. *J Am Dent Assoc*. 106:75-7, 1983.
 36. Giannakopoulos NN, Keller L, Rammelsberg P, Kronmüller KT, Schmitter M. Anxiety and depression in patients with chronic temporomandibular pain and in controls. *J Dent*. 2010 May;38(5):369-76.

37. Fillingim RB, Ohrbach R, Greenspan JD, Knott C, Diatchenko L, Dubner R, Bair E, Baraian C, Mack N, Slade GD, Maixner W. Psychological factors associated with development of TMD: the OPPERA prospective cohort study. *J Pain*. 2013 Dec;14(12 Suppl):T75-90.
38. Schmitter M, Keller L, Giannakopoulos N, Rammelsberg P. Chronic stress in myofascial pain patients. *Clin Oral Investig*. 2010 Oct;14(5):593-7.
39. Monteiro DR, Zuim PR, Pesqueira AA, Ribeiro Pdo P, Garcia AR. Relationship between anxiety and chronic orofacial pain of temporomandibular disorder in a group of university students. *J Prosthodont Res*. 2011 Jul;55(3):154-8.
40. Kocalevent RD, Hinz A, Brähler E. Standardization of the depression screener patient health questionnaire (PHQ-9) in the general population. *Gen Hosp Psychiatry*. 2013 Sep-Oct;35(5):551-5.
41. Moriarty AS, Gilbody S, McMillan D, Manea L. Screening and case finding for major depressive disorder using the Patient Health Questionnaire (PHQ-9): a meta-analysis. *Gen Hosp Psychiatry*. 2015 Nov-Dec;37(6):567-76.
42. Fernández-Carnero J, La Touche R, Ortega-Santiago R, Galan-del-Rio F, Pesquera J, Ge HY, Fernández-de-Las-Peñas C. Short-term effects of dry needling of active myofascial trigger points in the masseter muscle in patients with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*. 2010 Winter;24(1):106-12.
43. Planello AC, Campos MI, Meloto CB, Secolin R, Rizatti-Barbosa CM, Line SR, de Souza AP. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration. *Eur J Oral Sci*. 2011 Feb;119(1):1-6.
44. Brancher JA, Bertoli FMP, Michels B, Lopes-Faturri A, Pizzatto E, Losso EM, Orsi JS, Feltrin de Souza J, Küchler EC, Wambier LM. Is catechol-O-methyltransferase gene associated with temporomandibular disorders? A systematic review and meta-analysis. *Int J Paediatr Dent*. 2021 Jan;31(1):152-163.
45. Sato J, Kinugasa M, Satomi-Kobayashi S, Hatakeyama K, Knox AJ, Asada Y, Wierman ME, Hirata K, Rikitake Y. Family with sequence similarity 5, member C (FAM5C) increases leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells: implication in vascular inflammation. *PLoS One*. 2014 Sep 24;9.

46. Kolmychkova KI, Zhelankin AV, Karagodin VP, Orekhov AN. Mitochondria and inflammation. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2016 Oct-Dec;60(4):114-21.
47. Loreto C, Almeida LE, Trevilatto P, Leonardi R. Apoptose no disco da articulação temporomandibular com e sem redução: estudo imunohistoquímico. *J Oral Pathol Med* 2011;40:103–10.
48. Bertram H, Nerlich A, Omlor G, Geiger F, Zimmermann G, Fellenberg J. A expressão de TRAIL e os receptores de morte DR4 e DR5 correlaciona-se com a progressão da degeneração nos discos intervertebrais humanos. *Mod Pathol* 2009;22:895–905.
49. Zhang L, Niu T, Yang SY, Lu Z, Chen B. A ocorrência e distribuição regional de DR4 em células de disco herniado: uma via potencial de apoptose no disco intervertebral lombar. *Spine* 2008; 33:422–7.
50. Connelly JJ, Shah SH, Doss JF, Gadson S, Nelson S, Crosslin DR, et al. Genetic and functional association of FAM5C with myocardial infarction. *BMC Med Genet.* 2008; 9:33.

51. ARTIGO EM INGLÊS

Title page

**ASSOCIATION OF BIOPSYCHOSOCIAL, CLINICAL FACTORS
AND POLYMORPHISM IN THE *BRINP3* GENE WITH TMD**

Neblyssa Agatha Schneider

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

School of Medicine and Life Sciences

Graduate Program in Dentistry

Email: neblyssa@gmail.com

Corresponding author: Paula Cristina Trevilatto. Escola de Ciências da Vida,
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Rua Imaculada Conceição,
1155, Prado Velho. Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80215-901. Telefone: +55 (41)
3271- 1849, email: paula.trevilatto@pucpr.br

Abstract

Temporomandibular Disorders (TMD) affect on average up to 30% of the population, affecting more women aged between 20 and 40 years. Its etiology is multifactorial, involving genetic and biopsychosocial factors. Objective: to investigate biopsychosocial and clinical factors and the genetic polymorphism rs1342913, in the BRINP3 gene, associated with TMD. Material and Methods: This is a case-control study, with a sample of 226 female subjects, divided into a case group, 95 patients with TMD, and a control group, 131 patients without TMD. For TMD diagnosis, the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD) was used. The following were studied: age, ethnicity, smoking, depression and anxiety. For depression, the Patient Health Questionnaire 9 (PHQ-9) was used, and for anxiety, the Generalized Anxiety Disorder 7 (GAD7). The selection of the BRINP3 gene marker was made from the Info Web Server site. rs1342913 showed high linkage disequilibrium with 67 other markers, covering approximately 50% of the gene. Genotyping was performed using the real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Qualitative variables were analyzed using Pearson's chi-square test. Quantitative variables were analyzed by Student's t test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Results: in the univariate analysis, age ($p=0.002$) and depression ($p=0.007$) were associated with TMD. In the genetic analysis, there was no association of polymorphism with TMD. Conclusion: the lowest mean age and depression were the variables associated with TMD. There was no association between the rs1342913 polymorphism and TMD.

Keywords: Genetic Polymorphism, BRINP3, Gene, TMJ, Temporomandibular Joint Disorders.

1. Introduction

Temporomandibular disorders (TMDs) are defined by the American Academy of Orofacial Pain as a group of conditions that affect the musculoskeletal and neuromuscular regions of the temporomandibular joints (TMJs), the muscles of mastication and related tissues [1].

Considered a public health problem, TMD is a condition that affects around 5 to 15% of the population worldwide [2], and may affect 30% of the adult population according to a recent study [3]. It affects more women in the age group between 20 and 40 years [4]. TMD impacts the individual's quality of life, directly reflecting on their disability, impairing their psychosocial performance and affecting their production activities [5]. In the United States, this condition demands \$4 billion dollars annually in healthcare costs that have doubled in the last decade. [5]

TMD is divided into three groups: group I involves muscle diagnosis (myofascial pain), group II refers to disc displacements (with and without reduction), and group III includes arthralgia, osteoarthritis and osteoarthritis. [6]

Among the different types of TMDs, 40% refer to articular disc displacements with and without reduction [7]. Although they deal with the same anatomical structures, the biomechanics of this displacement happen in different ways, both of which may present painful symptoms. Shrink disk offset (DDCR) is the most common. It occurs when the articular disc detaches anteriorly to the condyle in a resting position, and returns to its physiological position during the mouth opening movement, normally associated with clicking. Disc displacement without reduction (DDSR), manifests when the disc dislodges, and is commonly accompanied by limited range during mouth opening movement. This is due to the position of the disc, which, being more anterior, prevents the translational movement of the condyle. [7,8].

TMJ dysfunctions may result from trauma or joint overload, resulting in inflammation [9]. The inflammatory process results from homeostatic phenomena of vascularized tissues, which aim to repair harmful agents through inflammatory mediators (IM) [10].

Currently, the etiology of TMD is considered complex with environmental, biological and psychological factors acting synergistically. In addition, muscle hyperactivity, trauma, and predisposing emotional factors such as stress, anxiety, and depression may also be involved [11]. Guidelines from the American Academy of Orofacial Pain also started to consider genetic factors in the etiology of TMD. [12]

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common forms of DNA variation [13]. The influence of genetic polymorphisms associated with pain and the development of TMD has been considered a milestone in the investigation of the genetic component in the etiology of the disease [14]. TMD was associated with the *TNFA*-308 polymorphism (rs1800629) of the *TNFA* gene [15] and with the 102T-C polymorphism of the *HTR2A* gene [16].

The BMP / retinoic acid inducible neural specific 3 (*BRINP3*) gene, also called *FAM5C*, *DBCCR1L* or *DBCCR1L1*. It consists of 8 exons and is located on chromosome 1 at position 1q.31.1. This gene encodes the bone morphogenetic protein/retinoic acid-inducible neural specific protein 3 (BRINP3) [17,18], composed of 766 amino acids [17].

BRINP3 is located in mitochondria and is involved in cellular mechanisms of cell proliferation, migration and apoptosis [19]. The mitochondrial pathway showed an important role in cellular apoptosis and was related to TMJ disc degeneration in TMD patients. [20,21]

Polymorphisms in the *BRINP3* gene have been associated with immunoinflammatory conditions such as coronary artery disease [22], pituitary tumors [19], fracture healing [23], peri-implantitis [24] and aggressive periodontitis [25]. These findings suggest that BRINP3 is related to inflammatory conditions, however the protein regulatory mechanism and gene expression remain poorly described in the literature. [19,25].

There are no studies investigating the association of polymorphisms in the *BRINP3* gene with TMD. Therefore, the hypothesis of this work is that biopsychosocial and clinical factors and the rs1342913 polymorphism of the *BRINP3* gene are associated with TMD.

2. Objective

The aim of this study was to investigate the association between biopsychosocial and clinical factors and the rs1342913 polymorphism in the *BRINP3* gene with TMD.

3. Material and Methods

Patients' selection

The study was characterized as an observational case-control. The sample consisted of 226 female patients, aged between 18 and 73 years, recruited at the Dental Clinic of the Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) and at the outpatient clinic of the Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. For the analysis of biopsychosocial, clinical and genetic factors, the sample was divided into two groups. The case group consisted of 95 patients diagnosed with TMD (displacement of the articular disc with or without reduction and arthralgia) and the control group consisted of 131 patients without TMD.

The participants signed an informed consent form (ICF) prior to data collection. The project was approved by the Research Ethics Committee of PUCPR, under protocol number 1,863,521.

Patients who presented situations that could compromise the immunoinflammatory response, such as: chronic use of anti-inflammatory drugs, diabetes, hepatitis, human immunodeficiency virus (HIV) infection, chemotherapy, malignant disease, autoimmune disease, pregnancy or lactation, previous TMJ surgery and presence of myofascial pain without arthralgia.

This study did not include patients who presented situations that compromise the immunoinflammatory response, such as: chronic use of anti-inflammatory drugs, diabetes, hepatitis, infection with the human immunodeficiency virus (HIV), chemotherapy, malignant disease, autoimmune disease, pregnancy or lactation, surgery previous TMJ, presence of facial muscle pain without TMJ arthralgia.

TMD diagnosis

TMD diagnosis was performed using a self-assessment tool, based on the Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (RDC/TMD) [26]. The test assesses clinical and psychosocial aspects for the diagnosis of TMD. Patients answered a self-assessment questionnaire. For clinical examination, two experienced researchers (ADD) and (ILPB), after being calibrated by the Kappa

test (inter-examiner coefficient 9.5, intra-examiner 9.6), palpated the masseter, temporal and TMJ muscles.

Biopsychosocial factors

Data such as age, ethnicity and smoking were collected from information available in the patients' dental records.

Depression scale

To assess depression, the Patient Health Questionnaire 9 (PHQ-9) [27] was used. The questionnaire consists of ten questions that assess depression. The maximum test score is 27 scores, with a summation score scale for interpretation between different levels of depression: mild (5 to 9), moderate (10 to 14), moderate-severe (15 to 19) and severe (20 to 27).

Anxiety scale

To assess anxiety, the Generalized Anxiety Disorder 7 (GAD-7) test was used [28]. The test comprises seven items that assess the patient's anxious behavior, with a maximum score of 21 scores. The scale levels range from: no anxiety (0 to 4), mild (5 to 9), moderate (10 to 14) and severe (15 to 21) anxiety.

DNA collection and purification

DNA was obtained from oral epithelial cells collected by rinsing with a 3% glucose solution for 1 minute, followed by scraping the oral mucosa [29]. The solution was shaken vigorously and immediately stored in refrigerated tubes. Oral epithelial cells were pelleted by centrifugation at 706 g for 10 minutes. The supernatant was discarded and the cell pellet resuspended in 1300 µl extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. 10 µl of proteinase K (20 mg/ml) was added to the solution, left overnight at 65°C. DNA was purified by addition of 10 M ammonium acetate, precipitated with isopropanol and resuspended with 50 µl of extraction solution [10 mM Tris (pH 7.6) and 1 mM EDTA] [30].

Selection and genotyping of the *BRINP3* gene tagSNP

The *BRINP3* gene SNP Tag selection was performed using information available on the SNP Info Web Server (www.snpinfo.nih.gov/snpinfo/snptag.html) in 2019. The selection criteria for the markers were: minimum allele frequency (FAM) of 25%, CEU population (Utah residents of northern and western European ancestry), and linkage disequilibrium (DL) $\geq 80\%$ ($r^2 \geq 0.8$). Following these criteria, the tagSNP rs1342913 was selected, allowing the coverage of approximately 50% of the *BRINP3* gene, being in high DL with another 67 markers.

The tagSNP rs1342913 was genotyped by the Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the TaqMan™ Genotyping Max Master technology (Applied Biosystems). The negative control was used in all genotyping performed.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using SPSS software, version 23.0, and Hardy-Weinberg equilibrium was obtained using Haploview 4.1.

Qualitative variables were analyzed using Pearson's chi-square test and expressed as frequency and percentage. Quantitative variables were analyzed using Student's t test and described as mean and standard deviation.

For genotypic analysis in dominant and recessive models, Pearson's chi-square test was used. The additive model was evaluated by binary logistic regression.

Results with a value of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Risk estimates were accessed by calculating the Odds Ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI).

4. Results

The result of the analysis of biopsychosocial factors showed a mean age of 31.48 (± 11.52) years for the case group, and 37.57 (± 15.57) years for the control group ($p=0.002$). The variables ethnicity and smoking did not present a statistically significant difference between the case and control groups.

The biopsychosocial variable depression showed a statistically significant difference between the groups ($p=0.007$). The level of severe depression was observed in 52.6% in the case group, versus 34.4% in the control group. No association was found between TMD and anxiety ($p=0.084$). More details are described in table 1.

Table 1. Result of the univariate analysis of biopsychosocial and clinical factors for the case ($n=95$) and control ($n=131$) groups.

	Control (n = 131)	Case (n = 95)	p value	OR (CI 95%)
Age [^]	37,57 \pm 15,57	31,48 \pm 11,52	0,002*	-
Ethnicity[^]				
Caucasian	88 (67,2)	66 (69,5)	0,714**	1,112 (0,630-1,964)
No Caucasian	43 (32,8)	29 (30,5)		
Smoking[^]				
Smokers	10 (7,8)	11 (11,6)	0,331**	0,642 (0,261-1,580)
Non-smokers	119 (92,2)	84 (88,4)		
Depression[^]				
No depression	3 (2,3)	0 (0,0)	0,007**	-
Mild	20 (15,3)	5 (5,3)		
Moderate	63 (48,0)	40 (42,1)		
Severe	45 (34,4)	50 (52,6)		
Anxiety[^]				
No anxiety	12 (9,1)	2 (2,2)	0,084**	-
Mild	14 (10,7)	8 (8,4)		
Moderate	47 (35,9)	31 (32,6)		
Severe	58 (44,3)	54 (56,8)		

* Student's T Test

**Pearson's Chi-Square Test

[^]Value of n may differ from the total n of the groups, due to the omission of the answers in question

OR: Odds Ratio

CI: Confidence interval

Genetic analysis

The distribution of *BRINP3* gene genotypes is in Hardy-Weinberg equilibrium for the control group. The tagSNP rs1342913 is not associated with TMD in any of the studied genetic models $p > 0.05$ (Table 2).

Table 2. Results of the univariate analysis of the tagSNP rs1342913 of the *BRINP3* gene for the additive, dominant and recessive models between the case (n=95) and control (n=131) groups.

Gene	tagSNP dbSNP ^a	Genetic model	Genotypes ^{&}	Groups - n (%)		p value	OR (CI 95%)		
				Case	Control				
<i>BRINP3</i>	rs1342913	Additive	AA	34 (38,2)	40 (32,3)	0,651‡	1,381 (0,638 - 2,991)		
			AG	39 (43,3)	58 (46,8)			0,413‡	0,947 (0,520- 2,298)
			GG	17 (18,0)	26 (21,0)			0,815‡	
		Dominant A	AA+AG	73 (82,0)	98 (79,0)	0,589*	1,210 (0,606- 2,420)		
			GG	16 (18,0)	26 (21,0)				
		Recessive A	AG +GG	55 (61,8)	84 (67,7)	0,369*	0,770 (0,436- 1,362)		
			AA	34 (38,2)	40 (32,3)				

^aSNP identifier based on NCBI dbSNP

[&]The A allele is the most frequent in the case group

[‡] Binary logistic regression

^{*}Pearson's chi-square test

OR: *Odds Ratio*

CI: *Confidence Interval*

Value of n, due to unamplified samples

Sample power

The power of the sample was 86% considering the frequency of the rarest allele of 42% (Table 3).

Table 3. Sample power calculation, using the Genetic Power Calculator tool [29], establishing as parameters: 30% TMD prevalence, 2.0 effect size to load a copy of the risk allele and 4.0 to load two copies of the risk allele, $D'=1$, rare allele frequency of 42%, case-control ratio of 1.5 and significance level of 5%.

rs1342913		
Frequência do alelo	Poder	n casos para 80% de poder
0,05	0,07	3267
0,1	0,29	378
0,2	0,86	80

5. Discussion

This is the first work to investigate the *BRINP3* gene as a potential candidate gene associated with TMD. In this cross-sectional study with women, we hypothesized that genetic polymorphism in the *BRINP3* gene could be associated with clinical signs and symptoms of TMD. The association of younger age and depression with TMD was observed. On the other hand, our hypothesis that the *BRINP3* gene (rs1342913) could be involved in the etiology of TMD was not confirmed in the sample studied.

A lower mean age was observed in the case group. The literature shows a higher prevalence of TMD in young women between 20 and 40 years of age [32]. An epidemiological study found a prevalence of TMD in young women, aged between 21 and 30 years, reinforcing the public as the most affected [33].

TMD is a disease in which several cytokines and immunoregulatory mechanisms are involved [16]. It is characterized by symptoms often accompanied by pain, inflammation, clicking and limited jaw movements [34,35]. This condition is difficult to diagnose and among the risk factors are stress, anxiety and depression [36]. The influence of genetic factors on the etiopathogenesis of TMD has also been discussed worldwide over the years [14].

Different studies point to depression as a risk factor for TMD [36, 37,38,39]. The results found evidence the importance of relating TMD to the biopsychosocial factors involved. The diagnosis of depression was based on the PHQ-9 instrument, a test with good sensitivity, specificity and reliability. Furthermore, this instrument has been validated in different languages and various populations [27, 28, 40, 41]. Our results showed the association of depression with TMD in the univariate analysis. Thus, depression was observed as a risk factor for TMJ dysfunction in young women, corroborating the literature that describes this biopsychosocial condition as a predisposing factor. [35,40,41].

Anxiety has been considered another risk factor for TMD [37,38,39]. Factors such as stress and anxiety are directly related to parafunctional habits, and can play a significant role in increasing muscle hyperactivity, overloading the TMJ,

and even causing muscle damage [42]. In our study, there was no statistically significant difference between anxiety and the population studied.

Among the factors related to the development of TMD, the role of the genetic component has been discussed. Different genes were associated with TMD [15,16, 43], including the 102T-C polymorphism of the *HTR2A* gene, in a study showing changes in the serotonergic system, also associated with dysfunction [16]. Furthermore, polymorphisms in the *COMT* gene, involved in enzymatic alterations of catecholamines (endorphin, dopamine and noradrenaline), have been described in the literature associated with TMD [44].

In our study, the candidate gene was the *BRINP3* gene, expressed in vascular smooth muscle cells, myoblastic cells, in the nervous system and in cancer cells. However, its mechanism of action is poorly described in the literature and needs to be elucidated for a better understanding of its exact function [45]. It is located on the long arm of chromosome 1, in the intron region, and encodes the BRINP3 protein [18, 20].

BRINP3 is a protein that participates in the immunoinflammatory response, involved in cell proliferation, migration and apoptosis [19, 20]. Located in cellular mitochondria, its overexpression leads to increased cell proliferation and migration [19]. Mitochondria are involved in metabolism and are important in the immune system [19, 46]. A study with patients who presented articular disc displacement in the TMJ showed that cell apoptosis occurred partially through the mitochondrial pathway. In addition, other studies involving lumbar and TMJ herniated discs showed an association between disc degeneration and cellular apoptosis. [20,47,48,49]

Polymorphisms in the *BRINP3* gene have been associated with increased vascular inflammation [45] and myocardial infarction [50]. Furthermore, studies showed that the rs1342913 polymorphism was associated with bone healing [23], peri-implantitis [24] and aggressive periodontitis [25]. In our genetic analysis, BRINP3 gene rs1342913 showed no association with TMD. Even with a modest sample for a genetic study, the statistical power of the sample was 86%.

A genetic approach that uses SNPs in high linkage disequilibrium (DL) allows the genotyping of all polymorphisms present in a given gene not to be necessary, but only of “target” SNPs (tagSNPs), which capture all the information of the gene in terms of variability. This strategy makes it possible to investigate fewer SNPs, reducing costs and genotyping time. In this study, it is important to note that the rs1342913 polymorphism captures information from another 67 tagSNPs and covers about 50% of the *BRINP3* gene structure.

A limitation of this study is the choice of the CEU population, specific to the population of European descent. However, despite our country having a great miscegenation, it is known that the chosen population represents the southern region of Brazil and its immigrants. Furthermore, the replication of this study in other populations is mandatory to elucidate the involvement of this gene in the control of TMD etiopathogenesis. Another limiting factor is the variability of biopsychosocial disorders such as anxiety, which used a specific instrument to assess a type of anxiety disorder (GAD-7 scale). However, it is important to highlight that the assessed generalized anxiety is one of the most common disorders in clinical practice. [28]

As it is a complex condition with a great impact on public health, it is extremely important to determine the clinical and biopsychosocial factors associated with this condition. In this context, further studies are needed including other polymorphisms of the *BRINP3* gene, as well as other genes of the individual's immunoinflammatory response, for the complete elucidation of genetic factors associated with the risk of TMDs.

6. Conclusion

The lowest mean age and the biopsychosocial factor depression were associated with TMD. Ethnicity, smoking and anxiety factors were not associated with TMD.

In the population studied, the association of polymorphism in the BRINP3 gene (rs1342913) with TMD was not found.

References

1. Dworkin S. Personal and societal impact of orofacial pain. In: Friction JR, Dubner RB, editors. Orofacial pain and temporomandibular disorders. New York: Raven Press; 1995. p. 15-32.
2. Schmitter M, Rammelsberg P, Hassel A. The prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders in very old subjects. *J Oral Rehabil* 2005; 32:467-73.
3. Valesan, L.F., Da-Cas, C.D., Réus, J.C. *et al.* Prevalence of temporomandibular joint disorders: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Invest* 25, 441–453 (2021).
4. Roda RP, Bagán JV, Fernández JMD, Bazán SH, Soriano YJ. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: Classification, epidemiology and risk factors. *Med Oral Patol Circ Bucal* 2007; 12: 292-8.
5. National Institute of Dental and Craniofacial Research. [7/28/2013] Facial Pain. [http:// www.nidcr.nih.gov/DataStatistics/FindDataByTopic/FacialPain/](http://www.nidcr.nih.gov/DataStatistics/FindDataByTopic/FacialPain/)
6. Franco-Micheloni AL, Fernandes G, de Godoi Gonçalves DA, Camparis CM. Temporomandibular Disorders in a Young Adolescent Brazilian Population: Epidemiologic Characterization and Associated Factors. *J Oral Facial Pain Headache*. 2015 Summer;29(3):242-9. doi: 10.11607/ofph.1262. PMID: 26244432.
7. Mlernik M, Więckiewicz W. The basic conservative treatment of temporomandibular joint anterior disc displacement without reduction - Review. Vol. 24, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2015. p. 731–5.
8. Okeson JP, de Leeuw R. Differential Diagnosis of Temporomandibular Disorders and Other Orofacial Pain Disorders. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2011 Jan;55(1):105–20.
9. Young AL. Internal derangements of the temporomandibular joint: A review of the anatomy, diagnosis, and management. *J Indian Prosthodont Soc*. 2015 Jan-Mar;15(1):2-7. doi: 10.4103/0972-4052.156998. PMID: 26929478; PMCID: PMC4762294.

10. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone*. 2016 Apr; 85:81-90. doi: 10.1016/j.bone.2016.01.019. Epub 2016 Jan 23. PMID: 26812612.
11. Ohrbach R, Fillingim RB, Mulkey F, Gonzalez Y, Gordon S, Gremillion H, et al. Clinical findings and pain symptoms as potential risk factors for chronic TMD: descriptive data and empirically identified domains from the OPPERA case-control study. *J Pain*. 2011;12: T27–45.
12. de Leeuw R, editor. *Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis, and management*, 4th ed. Chicago, IL: Quintessence; 2008. p. 129–204
13. Roskamp L, Trevilatto P, Souza C, Silva Neto U, Carneiro E, Fariniuk L, Westphalen VPD. Analysis of the association of clinical factors and il4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. *Int Endod J* 2018;51.1:12-19
14. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, Shagin D, Max MB, Makarov SS, Maixner W. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet*. 2005 Jan 1;14(1):135-43.
15. Furquim BD, Flamengui LM, Repeke CE, Cavalla F, Garlet GP, Conti PC. Influence of TNF- α -308 G/A gene polymorphism on temporomandibular disorder. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016 May;149(5):692-8.
16. de Freitas LV, Lopes AC, Piatto VB, Maniglia JV. Association of temporomandibular dysfunction with the 102T-C polymorphism in the serotonin receptor gene in Brazilian patients. *Arch Med Sci*. 2013 Dec 30;9(6):1013-8.
17. Kawano H, Nakatani T, Mori T, et al. 2004. Identification and characterization of novel developmentally regulated neural-specific proteins, BRINP family. *Brain Res Mol Brain Res* 125:60–75.
18. Tanaka KI, Matsumoto E, Higashimaki Y, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. FAM5C is a soluble osteoblast differentiation factor linking muscle to bone. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;418(1):134-9.

19. Shorts-Cary L, Xu M, Ertel J, Kleinschmidt-Demaster BT, Lillehei K, Matsuoka I, et al. Bone morphogenetic protein and retinoic acid-inducible neural specific protein-3 is expressed in gonadotropic cell pituitary adenomas and induces proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology*. 2007; 148:967–75.
20. Caltabiano R, Leonardi R, Musumeci G, Bartoloni G, Rusu MC, Almeida LE, Loreto C. Apoptosis in temporomandibular joint disc with internal derangement involves mitochondrial-dependent pathways. An in vivo study. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):577-83. doi: 10.3109/00016357.2012.700060. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22783811.
21. Loreto C, Musumeci G, Castorina A, Loreto C, Martinez G. Degenerative disc disease of herniated intervertebral discs is associated with extracellular matrix remodeling, vimentin-positive cells and cell death. *Ann Anat*. 2011 Mar;193(2):156-62. doi: 10.1016/j.aanat.2010.12.001. Epub 2011 Jan 26. PMID: 21330123.
22. Chen X, Chen X, Xu Y, Yang W, Wu N, Ye H, Yang JY, Hong Q, Xin Y, Yang MQ, Deng Y, Duan S. Association of six CpG-SNPs in the inflammation-related genes with coronary heart disease. *Hum Genomics*. 2016 Jul 25;10.
23. Guimarães JM, Guimarães IC, Duarte ME, Vieira T, Vianna VF, Fernandes MB, Vieira AR, Casado PL. Polymorphisms in BMP4 and FGFR1 genes are associated with fracture non-union. *J Orthop Res*. 2013 Dec;31(12):1971-9.
24. Casado PL, Aguiar DP, Costa LC, Fonseca MA, Vieira TC, Alvim-Pereira CC, Alvim-Pereira F, Deeley K, Granjeiro JM, Trevilatto PC, Vieira AR. Different contribution of BRINP3 gene in chronic periodontitis and peri-implantitis: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015 Mar 11;15:33.
25. Carvalho FM, Tinoco EM, Deeley K, Duarte PM, Faveri M, Marques MR, Mendonça AC, Wang X, Cuenco K, Menezes R, Garlet GP, Vieira AR. FAM5C contributes to aggressive periodontitis. *PLoS One*. 2010 Apr 7;5(4).
26. Chiffman E, Ohrbach R, Truelove E, Look J, Anderson G, Goulet JP, List T, Svensson P, Gonzalez Y, Lobbezoo F, Michelotti A, Brooks SL, Ceusters W, Drangsholt M, Ettlin D, Gaul C, Goldberg LJ, Haythornthwaite JA, Hollender L, Jensen R, John MT, De Laat A, de Leeuw R, Maixner W, van der Meulen M, Murray GM, Nixdorf DR, Palla S, Petersson A, Pionchon P, Smith B, Visscher CM, Zakrzewska J, Dworkin SF; International RDC/TMD Consortium Network, International association for Dental Research; Orofacial

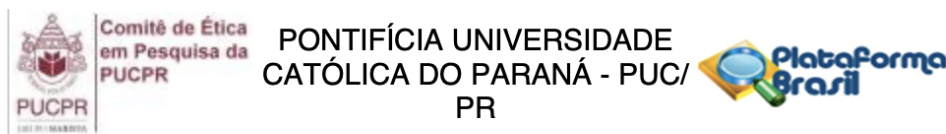
- Pain Special Interest Group, International Association for the Study of Pain. Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD) for Clinical and Research Applications: recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network* and Orofacial Pain Special Interest Group†. *J Oral Facial Pain Headache*. 2014 Winter;28(1):6-27.
27. Kroenke K, Spitzer RL, Williams JB. The PHQ-9: validity of a brief depression severity measure. *J Gen Intern Med*. 2001 Sep;16(9):606-13.
 28. Spitzer RL, Kroenke K, Williams JB, Löwe B. A brief measure for assessing generalized anxiety disorder: the GAD-7. *Arch Intern Med*. 2006 May 22;166(10):1092-7.
 29. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000 Jun;18(1):6-9. PMID: 11324090.
 30. Aidar M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 2007;18: 148-152.
 31. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*. 2003 Jan;19(1):149-50. doi: 10.1093/bioinformatics/19.1.149. PMID: 12499305.
 32. Ferreira CL, Silva MA, Felício CM. Signs and symptoms of temporomandibular disorders in women and men. *Codas*. 2016 Jan-Feb;28(1):17-21.
 33. Luz JG, Maragno IC, Martin MC. Characteristics of chief complaints of patients with temporomandibular disorders in a Brazilian population. *J Oral Rehabil*. 1997 Mar;24(3):240-3.
 34. Celik D, Mutlu EK. Clinical implication of latent myofascial trigger point. *Curr Pain Headache Rep*. 2013 Aug;17(8):353
 35. Griffiths, R.H. Report of Presidents Conference on Examination, Diagnosis and Management of Temporomandibular Disorders. *J Am Dent Assoc*. 106:75-7, 1983.
 36. Giannakopoulos NN, Keller L, Rammelsberg P, Kronmüller KT, Schmitter M. Anxiety and depression in patients with chronic temporomandibular pain and in controls. *J Dent*. 2010 May;38(5):369-76.

37. Fillingim RB, Ohrbach R, Greenspan JD, Knott C, Diatchenko L, Dubner R, Bair E, Baraian C, Mack N, Slade GD, Maixner W. Psychological factors associated with development of TMD: the OPPERA prospective cohort study. *J Pain*. 2013 Dec;14(12 Suppl):T75-90.
38. Schmitter M, Keller L, Giannakopoulos N, Rammelsberg P. Chronic stress in myofascial pain patients. *Clin Oral Investig*. 2010 Oct;14(5):593-7.
39. Monteiro DR, Zuim PR, Pesqueira AA, Ribeiro Pdo P, Garcia AR. Relationship between anxiety and chronic orofacial pain of temporomandibular disorder in a group of university students. *J Prosthodont Res*. 2011 Jul;55(3):154-8.
40. Kocalevent RD, Hinz A, Brähler E. Standardization of the depression screener patient health questionnaire (PHQ-9) in the general population. *Gen Hosp Psychiatry*. 2013 Sep-Oct;35(5):551-5.
41. Moriarty AS, Gilbody S, McMillan D, Manea L. Screening and case finding for major depressive disorder using the Patient Health Questionnaire (PHQ-9): a meta-analysis. *Gen Hosp Psychiatry*. 2015 Nov-Dec;37(6):567-76.
42. Fernández-Carnero J, La Touche R, Ortega-Santiago R, Galan-del-Rio F, Pesquera J, Ge HY, Fernández-de-Las-Peñas C. Short-term effects of dry needling of active myofascial trigger points in the masseter muscle in patients with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*. 2010 Winter;24(1):106-12.
43. Planello AC, Campos MI, Meloto CB, Secolin R, Rizatti-Barbosa CM, Line SR, de Souza AP. Association of matrix metalloproteinase gene polymorphism with temporomandibular joint degeneration. *Eur J Oral Sci*. 2011 Feb;119(1):1-6.
44. Brancher JA, Bertoli FMP, Michels B, Lopes-Faturri A, Pizzatto E, Losso EM, Orsi JS, Feltrin de Souza J, Küchler EC, Wambier LM. Is catechol-O-methyltransferase gene associated with temporomandibular disorders? A systematic review and meta-analysis. *Int J Paediatr Dent*. 2021 Jan;31(1):152-163.
45. Sato J, Kinugasa M, Satomi-Kobayashi S, Hatakeyama K, Knox AJ, Asada Y, Wierman ME, Hirata K, Rikitake Y. Family with sequence similarity 5, member C (FAM5C) increases leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells: implication in vascular inflammation. *PLoS One*. 2014 Sep 24;9.

46. Kolmychkova KI, Zhelankin AV, Karagodin VP, Orekhov AN. Mitochondria and inflammation. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2016 Oct-Dec;60(4):114-21.
47. Loreto C, Almeida LE, Trevilatto P, Leonardi R. Apoptose no disco da articulação temporomandibular com e sem redução: estudo imunohistoquímico. *J Oral Pathol Med* 2011;40:103–10.
48. Bertram H, Nerlich A, Omlor G, Geiger F, Zimmermann G, Fellenberg J. A expressão de TRAIL e os receptores de morte DR4 e DR5 correlaciona-se com a progressão da degeneração nos discos intervertebrais humanos. *Mod Pathol* 2009;22:895–905.
49. Zhang L, Niu T, Yang SY, Lu Z, Chen B. A ocorrência e distribuição regional de DR4 em células de disco herniado: uma via potencial de apoptose no disco intervertebral lombar. *Spine* 2008; 33:422–7.
50. Connelly JJ, Shah SH, Doss JF, Gadson S, Nelson S, Crosslin DR, et al. Genetic and functional association of FAM5C with myocardial infarction. *BMC Med Genet.* 2008; 9:33.

Anexos

Parecer do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE CLÍNICA, GENÉTICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA, PROTEÔMICA E SOROLÓGICA DE FATORES POSSIVELMENTE LIGADOS A ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR (ATM) HUMANA COM DESARRANJOS INTERNOS

Pesquisador: andrea duarte doetzer

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa na qual esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos participantes da pesquisa;);

Versão: 1

CAAE: 55535716.8.0000.0100

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Patrocinador Principal: fundação para o desenvolvimento científico e tecnologico da odontologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.533.139

Apresentação do Projeto:

É um estudo de associação e de caso-controle, cuja hipótese desta pesquisa é a de que fatores hormonais e inflamatórios ainda não identificados estejam envolvidos no desarranjo interno da articulação temporomandibular.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo do presente trabalho é investigar a associação de alterações em vias inflamatória e hormonal através de análise clínica, sorológica, imuno -histoquímica, proteômica e genética em pacientes com e sem disfunção da articulação temporomandibular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos deste estudo incluem: diagnóstico de alterações psicológicas como causa da disfunção de articulação temporomandibular, além de constrangimento para responder o questionário. Caso identificada alguma alteração psicológica ou clínica, medidas serão tomadas

Endereço: Rua Imaculada Conceição - 1155 - 3º andar
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br

Continuação do Parecer: 1.533.139

para sua redução, tais como encaminhar para a equipe que trate tal condição.

Benefícios:

Este estudo poderá trazer os seguintes benefícios para os participantes: identificação de causas da disfunção de articulação temporomandibular, podendo direcionar o tratamento de acordo com os resultados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa relevante, metodologicamente adequado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE claro, objetivo, preserva o sujeito de pesquisa.

TCUD claro e objetivo com período bem definidos de consulta aos prontuários

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_673296.pdf	27/04/2016 07:19:42		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	27/04/2016 07:19:18	andrea duarte doetzer	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_Compromisso_Utilizacao_Dados.pdf	03/03/2016 16:46:42	andrea duarte doetzer	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CONEP_DTM.pdf	03/03/2016 16:45:57	andrea duarte doetzer	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_ESCLARECIDO.pdf	03/03/2016 16:42:49	andrea duarte doetzer	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Imaculada Conceição - 1155 - 3º andar
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br

Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar do estudo “Análise clínica, genética, imuno-histoquímica, proteômica e sorológica de fatores possivelmente ligados a articulação temporomandibular (ATM) humana com desarranjos internos”, e que tem como objetivo avaliar investigar a associação de alterações em vias inflamatória e hormonal através de análise clínica, sorológica, imuno-histoquímica, proteômica e genética em pacientes com e sem disfunção da articulação temporomandibular. Acreditamos que ela seja importante porque poderá contribuir para identificar as possíveis causas da DTM, podendo melhorar a qualidade do tratamento.

PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A minha participação no referido estudo será de responder ao questionário, autorizar pesquisa a ser realizada com material coletado durante procedimento cirúrgico (quando indicado para tratamento), avaliação de resultados dos exames de sangue já coletados e coleta de DNA através de bochecho com saliva.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como identificação de causas da DTM, podendo direcionar o tratamento de acordo com os resultados. Recebi, também que é possível que aconteçam os seguintes desconfortos ou riscos como diagnóstico de alterações psicológicas como causa da DTM. Dos quais medidas serão tomadas para sua redução, tais como encaminhar para a equipe que trate tal condição.

SIGILO E PRIVACIDADE

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

AUTONOMIA

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, tais como transporte, alimentação entre outros, haverá ressarcimento dos valores gastos na forma seguinte: depósito em conta corrente. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Dr. Ian Luna Parente Brasileiro e Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto e com eles poderei manter contato pelos telefones **41 997359929**.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (CEP) pelo telefone (41) 3271-2292 entre segunda e sexta-feira das 08h00 as 17h30 ou pelo e-mail nep@pucpr.br.

DECLARAÇÃO

Declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito com as respostas. Entendo que receberei uma via assinada e datada deste documento e que outra via assinada e datada será arquivada nos pelo pesquisador responsável do estudo.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Dados do participante da pesquisa	
Nome:	
Telefone:	
e-mail:	

Local, ____ de _____ de ____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador

USO DE IMAGEM

Autorizo o uso de minha imagem para fins da pesquisa, sendo seu uso restrito a fins de publicação em área de pesquisa ou didático.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador