

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia

João Gabriel de Azevedo José Romero

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICADORES DA CATECOL-
O-METILTRANSFERASE (COMT) E GUANOSINA TRIFOSFATO
CICLOHIDROLASE 1 (GCH1) EM PACIENTES
COM NEURALGIA DO TRIGÊMEO**

Belo Horizonte

2020

João Gabriel de Azevedo José Romero

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICADORES DA CATECOL-
O-METILTRANSFERASE (COMT) E GUANOSINA TRIFOSFATO
CICLOHIDROLASE 1 (GCH1) EM PACIENTES
COM NEURALGIA DO TRIGÊMEO**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Megale de Almeida Leite

Coorientadora: Profa. Dra. Paula Rocha Moreira

Belo Horizonte

2020

Romero, João Gabriel de Azevedo José.
R763 a Análise de polimorfismos dos genes codificadores da catecol-o-
metiltransferase (comt) e guanossina trifosfato ciclohidrolase 1 (gch1) em
pacientes com neuralgia do trigêmeo [manuscrito]. / João Gabriel de
Azevedo José Romero. -- Belo Horizonte: 2020.
97 f.: il.
Orientador (a): Camila Megale de Almeida Leite.
Coorientador (a): Paula Rocha Moreira.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Dor Facial. 2. Nervo Trigêmeo. 3. Neuralgia do Trigêmeo. 4.
Polimorfismo Genético. 5. Catecol O-Metiltransferase. 6. Guanossina
Trifosfato. 7. Dissertação Acadêmica. I. Leite, Camila Megale de Almeida.
II. Moreira, Paula Rocha. III. Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WL 544

FOLHA DE APROVAÇÃO

“ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICADORES DA CATECOL-O-METILTRANSFERASE (COMT) E GUANOSINA TRIFOSFATO CICLOHIDROLASE 1 (GCH1) EM PACIENTES COM NEURALGIA DO TRIGÊMEO”

JOÃO GABRIEL DE AZEVEDO JOSÉ ROMERO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Profa. Vanessa de Fátima Bernardes
Departamento Patologia Geral – ICB/UFMG



Prof. Rodrigo Estevão Teixeira
Clínica Orofacial/BH



Prof. Paula Rocha Moreira
ICB/UFMG - COORIENTADORA



Profa. Camila Megale de Almeida Leite
ICB/UFMG - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2020.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Conceição Machado e no Laboratório de Biologia das Interações Celulares, ambos do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A parte clínica do estudo foi realizada no Ambulatório de Dor Orofacial da Clínica da Dor do Hospital das Clínicas da UFMG em Belo Horizonte/MG, no Hospital Felício Rocho em Belo Horizonte/MG, no Ambulatório de Dor Orofacial e Disfunção Temporomandibular do Centro de Especialização e Treinamento da Odontologia (CETRO) em Belo Horizonte/MG e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) em São Paulo/SP. Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha mãe Ivone José de Azevedo Romero e ao meu pai Renato de Azevedo Romero.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades proporcionadas ao longo da minha vida.

Agradeço aos meus pais Ivone e Renato, por todo o amor e carinho dedicados a nossa família. O incentivo e apoio de vocês foram fundamentais para a minha caminhada acadêmica. Obrigado por todos os valores transmitidos durante a minha formação, sem vocês eu não teria alcançado tantos sonhos!

Agradeço à professora Camila, minha orientadora, exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa na UFMG. Obrigado pela paciência, atenção, compromisso, dedicação e todos os ensinamentos proporcionados durante o período de graduação e pós-graduação. Tenho muita gratidão por toda orientação na minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço à professora Paula, minha coorientadora, exemplo de compromisso e ética ao ensino e pesquisa na UFMG. Obrigado pela atenção, compromisso e auxílio em todas as etapas do trabalho.

Agradeço à Grazielle, doutora em Patologia e amiga do Laboratório de Neurobiologia Conceição Machado. Obrigado pela paciência, atenção, compromisso, dedicação, bom humor e leveza na realização deste trabalho. Tenho muita gratidão pela oportunidade de conviver com uma pessoa tão dedicada e alto astral.

Agradeço ao Franklin, colega de profissão, pela parceria nos estudos e discussões sobre Disfunção Temporomandibular e Dor Orofacial. Obrigado pela oportunidade, disposição e vontade em contribuir para a minha formação profissional.

Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de Neurobiologia Conceição Machado e Laboratório de Biologia das Interações Celulares, em especial a Caroline, Bruna, Rafael, Luís, Raquel, Marcus e Paloma. Muito Obrigado pela convivência harmoniosa!

Agradeço aos pacientes e voluntários que aceitaram participar da realização deste trabalho.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para realização deste trabalho.

“Viver é muito perigoso... Porque aprender a viver é que é o viver mesmo... Travessia perigosa, mas é a da vida. Sertão que se alteia e se abaixa... O mais difícil não é um ser bom e proceder honesto, dificultoso mesmo, é um saber definido o que quer, e ter o poder de ir até o rabo da palavra”

João Guimarães Rosa

RESUMO

A neuralgia do trigêmeo (NT) é caracterizada por episódios paroxísticos de dor intensa em choque elétrico, com início e término abruptos, normalmente desencadeados por estímulos inócuos no território de inervação de um ou mais ramos do nervo trigêmeo. Polimorfismos genéticos dos genes codificadores da catecol-o-metiltransferase (COMT) e guanosina trifosfato ciclohídrose (GCH1) foram associados ao aumento da suscetibilidade e à proteção no desenvolvimento de condições dolorosas, respectivamente. Este trabalho avaliou os polimorfismos genéticos rs4680 (COMT) e rs8007267 (GCH1) em pacientes diagnosticados com a NT. Quarenta e oito indivíduos diagnosticados com NT, cuja avaliação clínica foi previamente realizada, e 48 controles foram submetidos à coleta de material biológico para genotipagem por PCR em Tempo Real com sondas específicas do sistema *Taqman*. Os resultados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as frequências genótípicas e alélicas de pacientes e controles. Também não foram encontradas associações entre a intensidade da dor e as frequências genótípicas e alélicas dos pacientes. Apesar da ausência de associação, os resultados encontrados representam contribuição importante para o conhecimento sobre a suscetibilidade genética à NT devido à escassez de estudos genéticos em NT.

Palavras-chave: dor facial, nervo trigêmeo, neuralgia do trigêmeo, polimorfismo genético, catecol-o-metiltransferase, guanosina trifosfato

ABSTRACT

Trigeminal neuralgia (NT) is characterized by paroxysms of severe shock-like pain within the distribution of one or more divisions of the trigeminal nerve. Genetic polymorphisms in genes encoding catechol-o-methyltransferase (COMT) and guanosine triphosphate cyclohydrolase (GCH1) were associated with increased susceptibility and protection to painful diseases, respectively. This work evaluated rs4680 (COMT) and rs8007267 (GCH1) genetic polymorphisms in patients diagnosed with NT. Forty-eight individuals with NT, whose clinical evaluation of pain was previously performed, and 48 controls were submitted to collection of biological material by oral swabs and DNA was analyzed by real-time polymerase chain reaction with specific probes (Taqman assay). Results showed no association among *COMT* or *GCH1* polymorphisms and the presence of TN. Genotype distribution and allele frequencies did not correlate to pain severity. Although no association of evaluated polymorphisms and trigeminal neuralgia or pain was observed, our data contributes to the knowledge of genetic susceptibility to trigeminal neuralgia, which is very scarce.

Keywords: facial pain, trigeminal nerve, trigeminal neuralgia, genetic polymorphism, catechol-o-methyltransferase, GTP cyclohydrolase 1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Área facial e intrabucal de inervação do nervo trigêmeo	18
FIGURA 2: Número de estudos de associação genética e condições dolorosas	27
FIGURA 3: Via de síntese da BH4	33
FIGURA 4: Relação da BH4 e dor	34
FIGURA 5: EVA – parte visualizada pelo paciente	39
FIGURA 6: EVA – parte visualizada pelo avaliador	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características sociodemográficas dos participantes do estudo	29
TABELA 2: Genótipo e frequência alélica do polimorfismo rs4680 do gene codificador da COMT em pacientes e controles	42
TABELA 3: Genótipo e frequência alélica do polimorfismo rs8007267 do gene codificador da GCH1 em pacientes e controles	43
TABELA 4: Associação entre os genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs4680 do gene codificador da COMT com a intensidade da dor.	43
TABELA 5: Associação entre os genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs8007267 do gene codificador da GCH1 com a intensidade da dor	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BH4 – Tetrahidrobiopterina

BTX-A – Toxina Botulínica do Tipo A

C – Citosina

CBZ – Carbamazepina

CETRO – Centro de Especialização e Treinamento da Odontologia

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP – Comitê de Ética e Pesquisa

COMT – Catecol-o-metiltransferase

DN – Dor Neuropática

DTM – Disfunção Temporomandibular

EDTA – Etilenodiaminotetracético

EM – Esclerose Múltipla

EVA – Escala Visual Analógica

G – Guanina

GCH1 – Guanosina Trifosfato Ciclohidrolase 1

GTP – Guanosina Trifosfato

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICHD-3rd – *International Classification of Headache Disorders 3rd Edition*

IHS – *International Headache Society*

MB-COMT – Catecol-o-metiltransferase ligada à membrana

Met – Metionina

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

NT – Neuralgia do Trigêmeo

NTRK1 – Gene Codificador do Receptor TrkA do Fator de Crescimento Nervoso

OXC – Oxcarbazepina

PTPS – 6-piruvotetrahidrobiopterina sintase

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SCN8A – Gene Codificador do Canal de Sódio Nav1.6

SCN9A – Gene Codificador do Canal de Sódio Nav1.7

S-COMT – Catecol-o-metiltransferase solúvel

SNC – Sistema Nervoso Central

SNPs – Polimorfismos Genéticos de Nucleotídeo Único

SR – Sepiapterina Redutase

T – Timina

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USP – Universidade de São Paulo

Val – Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Neuralgia do Trigêmeo.....	17
1.2 GENÉTICA E DOR	25
1.2.1 Genética e Dor.....	25
1.2.2 Genética e Neuralgia do Trigêmeo.....	27
1.2.3 Catecol-o-metiltransferase.....	29
1.2.4 Guanosina Trifosfato Ciclohidrolase 1	32
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 SELEÇÃO AMOSTRAL	38
4.2 INSTRUMENTOS DE MEDIDA	38
4.2.1 Escala Visual Analógica (EVA).....	38
4.3 MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
4.3.1 Coleta de sangue.....	39
4.3.2 Coleta de células.....	40
4.4 BIOLOGIA MOLECULAR.....	40
4.4.1 Extração do DNA	40
4.4.2 Genotipagem por PCR em tempo real.....	41
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Identificação dos polimorfismos	42
5.1.1 Polimorfismo rs4680 do gene codificador da COMT	42
5.1.2 Polimorfismo rs8007267 do gene codificador da GCH1	42
5.2 Associação dos genótipos e frequências alélicas com a intensidade da dor.....	43
5.2.1 Associação dos genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs4680 do gene codificador da COMT com a intensidade da dor obtida pela EVA.....	43
5.2.2 Associação dos genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs8007267 do gene codificador da GCH1 com a intensidade da dor obtida pela EVA.....	44
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	50

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	62
APÊNDICE	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neuralgia do Trigêmeo

A Neuralgia do Trigêmeo (NT) é uma condição de dor orofacial conhecida desde os tempos antigos. As primeiras descrições foram realizadas nos séculos II e XI, respectivamente por Aretaeus da Capadócia e o médico persa Ibn Sina (COLE *et al.*, 2005; KLEEF *et al.*, 2009). O filósofo e médico inglês John Locke apresentou em 1677 uma série de cartas com descrições mais detalhadas do caso de NT da condessa de Northumberland (PEARCE, 2003). A descrição foi aperfeiçoada em 1688 pelos médicos Johannes Michel Fehr e Elias Schmidt, a partir do acompanhamento de um paciente com sintomas de dor intensa na maxila, semelhante a choque elétrico, com intensidade variável e comprometimento da alimentação e fonação (COLE *et al.*, 2005; PATEL; LIU, 2016). O célebre termo “*tic douloureux*” foi cunhado em 1756, pelo francês Nicholas Andre, devido aos característicos espasmos e caretas que acompanham dor intensa durante os episódios da NT (COLE *et al.*, 2005). O médico inglês John Fothergill apresentou uma definição mais precisa em 1773, em que a NT foi caracterizada como uma dor intensa e insuportável, com episódios de curta duração em intervalos irregulares, desencadeada por estímulos como alimentação, fonação e leve toque na face (COLE *et al.*, 2005; PATEL; LIU, 2016).

A definição atual da NT é estabelecida pela *International Headache Society* (IHS), por meio da *International Classification of Headache Disorders 3rd Edition* (ICHD-3rd). Segundo essa classificação, a NT é caracterizada como um quadro de dor recorrente do tipo choque elétrico, de início e término abruptos, desencadeada por estímulos inócuos e que acomete um ou mais ramos do nervo trigêmeo (FIGURA 1) (IHS, 2018). Em alguns casos, a NT também pode apresentar dor contínua de intensidade moderada, normalmente descrita como queimação ou formigamento, na área trigeminal acometida pelos episódios de dor paroxística (CRUCCU *et al.*, 2016; DI STEFANO *et al.*, 2018; IHS, 2018).

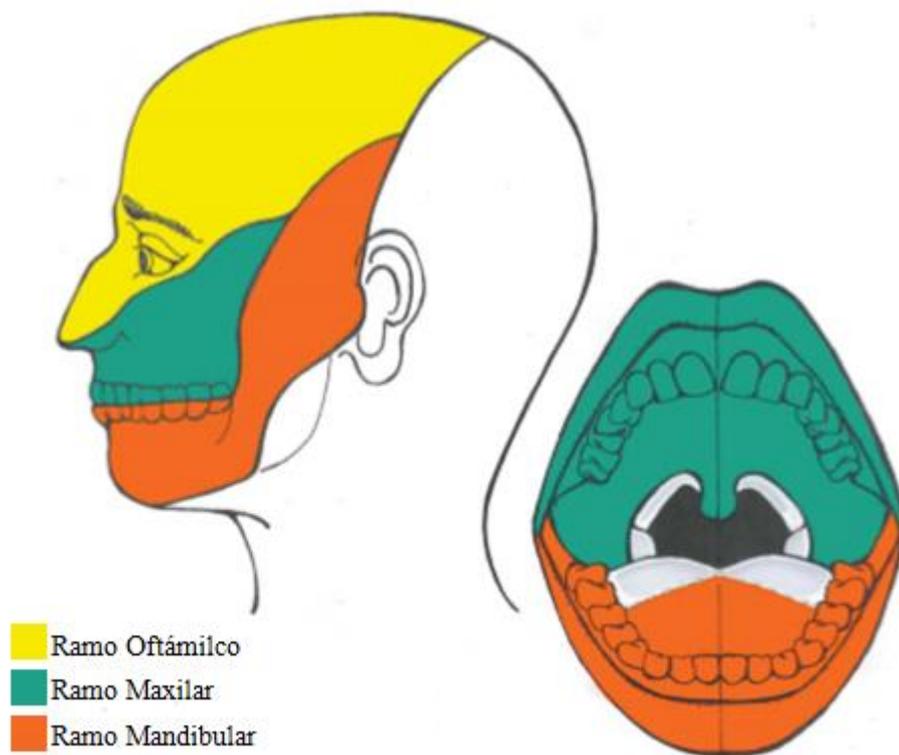


Figura 1: Área facial e intrabucal de inervação do nervo trigêmeo.

Fonte: Adaptado de CRUCCU *et al.*, 2016.

Os episódios de dor normalmente apresentam duração de segundos, podendo chegar a até 2 minutos (CRUCCU *et al.*, 2016). Esses episódios dolorosos podem se repetir após um período refratário e o paciente pode apresentar múltiplas crises de dor ao longo do dia (MARRBJERG *et al.*, 2017). As crises de dor podem ser desencadeadas por estímulos inócuos como tocar a face, conversar, mastigar e escovar os dentes, devido à estimulação das zonas gatilho localizadas na face e/ou cavidade bucal (MARRBJERG *et al.*, 2014b; DI STEFANO *et al.*, 2018). É importante ressaltar que alguns pacientes podem apresentar episódios de dor espontânea (MARRBJERG *et al.*, 2014b). As zonas gatilho são frequentemente encontradas na asa do nariz, lábio superior, bochecha, lábio inferior, região mental e gengiva (DI STEFANO *et al.*, 2018). Alguns pacientes também podem apresentar sintomas autonômicos como lacrimejamento, ptose, vermelhidão na região acometida e aumento da salivagem (SIMMS; HONEY, 2011; IHS, 2018). Outro aspecto importante é que diferentemente de outras condições de dor neuropática (DN), a NT pode apresentar períodos de remissão completa da dor (MARRBJERG *et al.*, 2014a; ZAKRZEWSKA; LINSKEY, 2015).

A epidemiologia da NT apresenta variabilidade de acordo com a população estudada, sendo observada incidência de 4,3 a 4,5 casos a cada 100.000 indivíduos para ambos os sexos na população norte-americana (KATUSIC *et al.*, 1990; IBRAHIM, 2012), enquanto, na população européia, apresenta incidência de 12,7 a 27 casos a cada 100.000 habitantes (REDDY; VISWANATHAN, 2014). A estratificação por gênero mostra a incidência de 5,9/100.000 em mulheres e 3,4/100.000 em homens (KATUSIC *et al.*, 1990), demonstrando que o sexo feminino é frequentemente mais acometido (KATUSIC *et al.*, 1990; IBRAHIM, 2012; DE TOLEDO *et al.*, 2016). Comumente, a NT manifesta-se em pacientes na faixa etária dos 50 aos 70 anos de idade (IBRAHIM, 2012), apresentado aumento da incidência com o envelhecimento, sendo a ocorrência de 17,5/100.000 entre os 60 e 69 anos de idade e de 25,6/100.000 acima dos 70 anos (KATUSIC *et al.*, 1991). A NT apresenta baixa incidência em pacientes com faixa etária inferior aos 40 anos (MONTANO *et al.*, 2015). Clinicamente, a maioria dos casos de NT tem apresentação unilateral, acometendo o lado direito e os ramos maxilares e/ou mandibulares do nervo trigêmeo (MARRBJERG *et al.*, 2014b; DE TOLEDO *et al.*, 2016; DI STEFANO *et al.*, 2018), sendo o ramo oftálmico raramente afetado (MARRBJERG *et al.*, 2014b).

Em relação à etiopatogenia, a NT é uma condição complexa, devido ao envolvimento de diversos mecanismos neurofisiológicos. Esses mecanismos são relacionados à ativação de receptores periféricos, transmissão e projeção de informações nociceptivas, além da interação de diversos neurotransmissores e neuromoduladores, que podem apresentar uma função essencial na percepção da dor (MONTANO *et al.*, 2015). A maioria dos casos de NT é atribuída à compressão da raiz do nervo trigêmeo na região próxima à sua entrada na ponte (KES; MATOVINA, 2017). A compressão vascular é responsável por 80% a 90% dos casos de desenvolvimento da NT (AL-QULITI, 2015; ALSHUKRY *et al.*, 2017), e normalmente é provocada pela artéria cerebelar superior ou até mesmo alguns de seus ramos (IBRAHIM, 2012). O consequente desenvolvimento de desmielinização focal de aferentes primários na raiz trigeminal foi proposto como mecanismo de desenvolvimento da NT. Essa região apresenta menor resistência a lesões, devido à substituição das células de Schwann por oligodendrócitos na deposição da bainha de mielina (CRUCCU, 2017). Além disso, os aferentes primários da área lesada seriam responsáveis pela geração de impulsos ectópicos devido ao maior nível de excitabilidade neuronal (CRUCCU, 2017). Portanto, a lesão trigeminal seria

responsável pelo desenvolvimento de mudanças fisiológicas, resultando em neurônios hiperexcitáveis e interligados funcionalmente. Assim, a descarga individual de qualquer neurônio poderia ser rapidamente expandida, provocando ativação de toda a população neuronal (SCRIVANI; MATHEWS; MACIEWICZ, 2005). Porém, esses mecanismos relacionados à compressão vascular, à desmielinização e o desenvolvimento da NT ainda não estão completamente esclarecidos (KES; MATOVINA, 2017).

Em outros casos, a NT pode apresentar etiologia associada ao desenvolvimento da Esclerose Múltipla (EM) e de lesões ocupantes de espaço, como tumores epidermóides, meningiomas, neuromas, malformações arteriovenosas e aneurismas (MARRBJERG *et al.*, 2017; ALSHUKRY *et al.*, 2017). A EM é caracterizada pela desmielinização inflamatória e perda axonal no Sistema Nervoso Central (SNC) e os sintomas mais comuns incluem deficiência visual, alterações sensoriais, fraqueza nos membros e dor (SOLARO; UCCELLI, 2011). A NT apresenta incidência de 1,9% a 6,3% entre os pacientes com EM, mas raramente é o primeiro sinal de manifestação dessa doença neurodegenerativa (SOLARO; UCCELLI, 2011; BURKHOLDER; KOEHLER; BOES, 2017). Em relação aos tumores, a maioria apresenta comportamento benigno e o mecanismo de lesão é relacionado à compressão da raiz trigeminal, associado ao desenvolvimento de desmielinização em função da localização e do crescimento do tumor (CRUCCU, 2017).

Atualmente, segundo a ICHD-3rd (2018), a NT é classificada de acordo com os aspectos etiopatogênicos envolvidos, permitindo assim a divisão entre NT clássica, secundária e idiopática (IHS, 2018). A NT clássica tem como principal característica a identificação de alterações morfológicas na raiz trigeminal, desencadeadas pela compressão neurovascular, constatadas por meio da Ressonância Magnética (RM) (IHS, 2018). Apenas a identificação do conflito neurovascular com a ausência de alterações morfológicas não qualifica a NT como clássica (Cruccu *et al.* 2016), pois alguns indivíduos apresentam o conflito neurovascular, mas são assintomáticos (ANTONINI *et al.*, 2014). A NT secundária é caracterizada pela presença de uma doença subjacente, como a EM ou lesões tumorais (IHS, 2018), que possam ser responsáveis pelo desenvolvimento da neuralgia (CRUCCU *et al.*, 2016). Por fim, a NT idiopática é caracterizada pela ausência de alterações constatadas por testes eletrofisiológicos e exames de RM e é confirmada após a investigação e exclusão dos fatores relacionados à NT clássica e secundária (IHS, 2018). Essas classificações da NT também apresentam

uma subclassificação que está relacionada à dor paroxística e/ou contínua. Sendo assim, o paciente também pode ser classificado de acordo com a apresentação clínica da dor (MARRBJERG *et al.*, 2014a; CRUCCU, 2017; IHS, 2018).

O diagnóstico da NT é baseado na história clínica, em associação com os exames de imagem (ALSHUKRY *et al.*, 2017; KES; MATOVINA, 2017). Assim, o histórico do paciente é fundamental para o diagnóstico adequado, pois não existem exames diagnósticos completamente definitivos (MARRBJERG *et al.*, 2017). A presença de dor facial unilateral, paroxística e restrita ao território de inervação trigeminal deve ser considerada para investigação aprofundada da possível NT (CRUCCU, 2017). A partir da suspeita inicial, o diagnóstico clínico pode ser estabelecido segundo os seguintes critérios da ICHD-3rd (2018), paroxismos recorrentes de dor facial unilateral em um ou mais ramos do nervo trigêmeo, episódios de curta duração, precipitados por estímulos inócuos, dor do tipo choque elétrico, tiro e/ou facada e de intensidade severa (IHS, 2018). Além disso, a avaliação clínica também deve permitir a reprodução dos paroxismos dolorosos por meio de estímulos em zonas gatilho (CRUCCU, 2017).

O uso dos exames de imagem de alta resolução apresenta grande importância, pois permite a investigação de doenças neurológicas como a EM, neoplasias e conflitos neurovasculares (GRAFF-RADFORD *et al.*, 2015; ALSHUKRY *et al.*, 2017). A RM apresenta sensibilidade na detecção desses processos patológicos que atravessam a base do crânio (CRUCCU *et al.*, 2016). O exame de RM também permite a identificação do conflito neurovascular, e a possível deformidade estrutural identificada pela formação de concavidade, atrofia e achatamento na estrutura nervosa (PEKER *et al.*, 2009; ANTONINI *et al.*, 2014; HUGHES *et al.*, 2016).

A NT apresenta duas modalidades principais de tratamento, a farmacológica e a cirúrgica (AL-QULITI, 2015). Dentro dessas alternativas a terapia farmacológica é indicada como primeira opção para controle da sintomatologia dolorosa, enquanto os procedimentos cirúrgicos são indicados apenas para casos refratários e de intolerância aos efeitos adversos dos medicamentos (CRUCCU *et al.*, 2008; MONTERO; CARNERERO, 2016).

A Carbamazepina (CBZ) e a Oxcarbazepina (OXC) são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da NT, principalmente devido à eficácia no controle da dor (CRUCCU *et al.*, 2008; DI STEFANO *et al.*, 2014). Essas substâncias apresentam o

mesmo mecanismo de ação que é o bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem (MARRBJERG *et al.*, 2017). A CBZ deve ser iniciada com dosagens de 100 a 200mg duas vezes ao dia, sendo a titulação realizada gradativamente de acordo com o alívio da dor e presença de efeitos adversos, não devendo ultrapassar 1200mg/dia (GRONSETH *et al.*, 2008; AL-QULITI, 2015).

A OXC é um pró-farmacó da CBZ e não utiliza o sistema citocromo do fígado (ZAKRZEWSKA; MCMILLAN, 2011). O tratamento deve ser iniciado com dosagens de 150mg duas vezes ao dia, sendo 1800mg a dosagem máxima diária recomendada (GRONSETH *et al.*, 2008; AL-QULITI, 2015). Os efeitos adversos da CBZ e OXC comumente observados são sonolência, desequilíbrio postural, tontura, náusea e visão turva, porém a OXC apresenta menor incidência desses efeitos, sendo mais tolerada pelos pacientes (DI STEFANO *et al.*, 2014; MENDLIK; URITSKY, 2015). É importante ressaltar que o tratamento com a CBZ deve ser acompanhado por testes hematológicos e de função hepática, devido à possibilidade do desenvolvimento de alterações como trombocitopenia, agranulocitose e anemia aplásica (MONTERO; CARNERERO, 2015).

A Lamotrigina, outro anticonvulsivante, e o Baclofeno, um relaxante muscular são medicamentos que também podem ser utilizados no tratamento da NT (ZAKRZEWSKA; MCMILLAN, 2011; AL-QULITI, 2015). Alguns pacientes podem ser beneficiados com a associação desses medicamentos à CBZ ou OXC, principalmente quando as altas dosagens dos bloqueadores dos canais de sódio provocam efeitos adversos significativos (MARRBJERG *et al.*, 2017). A Lamotrigina pode ser iniciada com 25mg duas vezes ao dia, atingindo resultados satisfatórios no controle da dor com dosagens totais de 100 a 400mg ao dia (GRONSETH *et al.*, 2008; AL-QULITI, 2015). O Baclofeno pode apresentar resultados benéficos sobretudo em pacientes com NT secundária à EM (AL-QULITI, 2015). O tratamento deve ser iniciado com dosagens de 10mg e o aumento gradativo pode atingir dosagens máximas de 40 a 80mg ao dia (GRONSETH *et al.*, 2008; AL-QULITI, 2015). Outros medicamentos como Fenitoína, Ácido Valpróico, Gabapentina, Pregabalina, Topiramato, Levetiracetam e Clonazepam também podem ser utilizados no tratamento da NT, porém ainda existem poucas evidências disponíveis na literatura sobre a efetividade (MONTERO; CARNERERO, 2015; PATEL; LIU, 2016). No entanto, a Gabapentina e

a Pregabalina podem ser utilizadas como bons adjuvantes aos medicamentos de primeira linha no tratamento da NT (MONTERO; CARNERERO, 2015).

As alternativas cirúrgicas indicadas para o tratamento podem ser divididas de acordo com as características do procedimento (CRUCCU, 2017). Os pacientes jovens, saudáveis e diagnosticados com a NT clássica são bons candidatos para a cirurgia de descompressão, enquanto os procedimentos percutâneos são mais indicados para os pacientes idosos ou com maiores riscos cirúrgicos (MONTERO; CARNERERO, 2016). A radiocirurgia também pode ser considerada uma alternativa para os casos refratários, sendo também indicada para pacientes idosos e que apresentam contra indicações para procedimentos invasivos (MARCHETTI *et al.*, 2019).

A cirurgia de Descompressão Microvascular é indicada para os pacientes diagnosticados com conflito neurovascular e refratários aos tratamentos farmacológicos (MARRBJERG *et al.*, 2017). O procedimento é realizado sob anestesia geral, sendo caracterizado pela craniotomia suboccipital, acesso à fossa posterior do crânio para identificação do vaso e separação das estruturas por meio de tela de Teflon (AL-QULITI, 2015; MONTERO; CARNERERO, 2016; MARRBJERG *et al.*, 2017). Os resultados pós-cirúrgicos são satisfatórios e a taxa de controle inicial da dor após o procedimento é de 80,3% a 96% (BICK; ESKANDAR, 2017). O acompanhamento em longo prazo mostra que o controle total da sintomatologia dolorosa pode ser observado em 73% a 85% dos pacientes cinco anos após a cirurgia (MARRBJERG *et al.*, 2017, BICK; ESKANDAR, 2017), enquanto 70% desses pacientes ainda apresentam alívio completo até dez anos após o procedimento (BICK; ESKANDAR, 2017). As complicações mais observadas são o desenvolvimento de meningite asséptica, perda auditiva e sensorial; porém, em alguns casos, também foram observados o extravasamento de líquido cefalorraquidiano, infarto e hematoma (AL-QULITI, 2015).

Os procedimentos percutâneos, tais como Rizotomia por Radiofrequência, Rizotomia com uso de Glicerol e Compressão por Balão, são normalmente indicados como segunda escolha para o tratamento dos pacientes refratários, mas também podem ser indicados para os casos que não apresentam o conflito neurovascular, e para aqueles indivíduos que apresentam contra indicações para a cirurgia de Descompressão Microvascular (NOORANI *et al.*, 2016; MARRBJERG *et al.*, 2017). As técnicas percutâneas apresentam contra indicação relativa para pacientes com histórico de

problemas cardíacos, devido à possibilidade de desenvolvimento de bradicardia grave durante o procedimento (TAI; NAYAR, 2019). O alívio da sintomatologia dolorosa é obtido por meio da lesão de fibras nervosas do trigêmeo (CHENG *et al.*, 2014). Aproximadamente 70% a 80% dos pacientes apresentam resposta satisfatória logo após o procedimento, enquanto 55% a 65% apresentam controle da dor até cinco anos após o tratamento (TAI; NAYAR, 2019). As Rizotomias e a Compressão apresentam diferenças em relação ao tipo de lesão provocada e seletividade das divisões trigeminais durante o procedimento (CHENG *et al.*, 2014; MONTERO; CARNERERO, 2016). De modo geral as técnicas percutâneas são seguras e associadas a baixas taxas de mortalidade (BENDER; BETTERGOWDA, 2016).

A Rizotomia por Radiofrequência é caracterizada pela termocoagulação do gânglio trigeminal por meio de uma punção percutânea guiada por fluoroscopia (MONTERO; CARNERERO, 2016). As lesões são produzidas ao máximo de 0,5 V, por 5 a 70 ciclos por segundo, em temperatura de 55°C a 80°C durante o período de 30 segundos a 2 minutos (BENDER; BETTERGOWDA, 2016). Esse procedimento apresenta boa efetividade no alívio inicial da dor, porém 25% dos casos apresentam recidiva após seis meses (MONTERO; CARNERERO, 2016). Os efeitos adversos mais observados foram disestesia, redução do reflexo corneano e parestesia (NOORANI *et al.*, 2016).

A Rizotomia com Glicerol pode ser realizada sob anestesia local ou geral, sendo a técnica caracterizada pela inserção de uma agulha no forame oval e aplicação de 0,25mL a 0,5mL de glicerol (BENDER; BETTERGOWDA, 2016; MONTERO; CARNERERO, 2016). O alívio inicial da dor pode ser alcançado em 90% dos pacientes, com a manutenção do alívio em 78% a 88% e 53% a 54%, seis meses e três anos após o tratamento, respectivamente (CHENG *et al.*, 2014). Os efeitos adversos mais observados foram redução do reflexo corneano, recorrência de Herpes Simplex e disestesia (NOORANI *et al.*, 2016).

A Compressão por Balão é realizada sob anestesia geral e a técnica é caracterizada pela inserção de um cateter no forame oval, um centímetro atrás do cavum de Meckel, insulflamento do balão com 0,7mL a 0,75mL de iohexol, e pressão de 1000 a 1200 mm/Hg durante 2 a 3 minutos (BENDER; BETTERGOWDA, 2016; MONTERO; CARNERERO, 2016). O alívio inicial da dor pode ser alcançado em até 94% dos pacientes, com manutenção dos resultados em até 69% dos casos em três anos após o

tratamento (CHENG *et al.*, 2014). Os efeitos adversos mais observados foram disestesia, parestesia e dormência (NOORANI *et al.*, 2016).

A Radiocirurgia Estereotáxica (*Gamma Knife*) tem o objetivo de lesar a estrutura da raiz do nervo trigêmeo por meio de feixes convergentes de radiação (MARRBJERG *et al.*, 2017). A técnica utiliza dosagens de 70 a 90 Gy, em um feixe direcionado a entrada da raiz trigeminal, provocando degeneração axonal e necrose (AL-QULITI, 2015). O alívio da dor se inicia duas semanas após o procedimento, sendo observado alívio total em até cinco meses (SPINA *et al.*, 2017). A eficácia apresenta variação de 30% a 68% em até dez anos pós tratamento (MARCHETTI *et al.*, 2019). Os efeitos adversos mais observados foram hipoestesia e disestesia (TULEASCA *et al.*, 2018), enquanto outros efeitos como anestesia dolorosa, perda auditiva e fraqueza mastigatória apresentam baixa frequência (MARCHETTI *et al.*, 2019).

Além das técnicas cirúrgicas descritas acima, o uso de injeções de Toxina Botulínica do tipo A (BTX-A), também pode ser uma alternativa para os casos refratários aos tratamentos convencionais (DI STEFANO; TRUINI, 2017). A sintomatologia dolorosa pode ser reduzida em até 50%, doze semanas após o tratamento, em associação à terapia farmacológica (BENDTSEN *et al.*, 2019). Após quatorze meses, o alívio completo da dor pode ser observado em 25% dos pacientes (LI *et al.*, 2014). Os efeitos adversos mais relatados foram dor no local da aplicação, hematoma e assimetria facial (MENG *et al.*, 2018) e não foram registrados efeitos adversos graves ou reações sistêmicas (MORRA *et al.*, 2016).

1.2 GENÉTICA E DOR

1.2.1 Genética e Dor

A percepção da dor é um processo complexo, influenciado por fatores biológicos, psíquicos, ambientais e genéticos (DIATCHENKO *et al.*, 2005). As DN, como a NT, são dores crônicas, resultantes de lesões ou doenças que afetam o sistema somatossensorial (VELUCHAMY *et al.*, 2018). Devido à hereditariedade relatada de 16% a 50%, as características genéticas podem aumentar o risco de desenvolver dor crônica (ZORINA-LICHENWALKER *et al.*, 2016). Assim, a suscetibilidade genética, em conjunto com fatores ambientais, sociodemográficos, psicológicos e clínicos contribuem para o risco de desenvolvimento de condições neuropáticas (VELUCHAMY *et al.*, 2018).

Os polimorfismos genéticos de nucleotídeo único (SNPs) são definidos por pequenas variações na sequência de DNA, em que, um único nucleotídeo como adenina (A), citosina (C), guanina (G) ou timina (T) é alterado. Essas substituições podem ocorrer em regiões codificadoras (exons) ou não codificadoras (introns) (GRUBER *et al.*, 2014). Aproximadamente 90% desses SNPs são encontrados em introns ou regiões intergênicas, fora do segmento de codificação de proteínas. Os SNPs localizados em exons podem levar à manutenção ou à substituição do aminoácido (ZORINA-LICHENWALKER *et al.*, 2016). As alterações em regiões intrônicas também podem apresentar efeito funcional na expressão gênica, por influenciar fatores de transcrição ou ligação ao miRNA (GRUBER *et al.*, 2014). Esses SNPs são a forma mais comum de variação genética em humanos, sendo o nucleotídeo menos comum encontrado em mais de 1% da população (MOONEY, 2005).

Um estudo recente foi realizado com objetivo de identificar quais fatores genéticos são relevantes para o desenvolvimento e manutenção de dor crônica em humanos, representando uma grande contribuição para o conhecimento e desenvolvimento de novos estudos (ZORINA-LICHENWALKER *et al.*, 2016). Os SNPs são alvos da grande maioria dos estudos de associação genética em humanos e, normalmente, apresentam efeito de modulação à suscetibilidade ao desenvolvimento de dor crônica, ou seja, o alelo polimórfico pode aumentar ou diminuir essa suscetibilidade (ZORINA-LICHENWALKER *et al.*, 2016). As condições dolorosas com maior número de estudos de associação genética publicados na literatura são a cefaleia migrânea, disfunção temporomandibular (DTM) e a fibromialgia, enquanto a NT apresentou apenas um estudo em uma ampla revisão de literatura (FIGURA 2) (ZORINA-LICHENWALKER *et al.*, 2016). Em nossa busca bibliográfica, foram encontrados três trabalhos relacionados a SNPs e NT (HUANG *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2018).

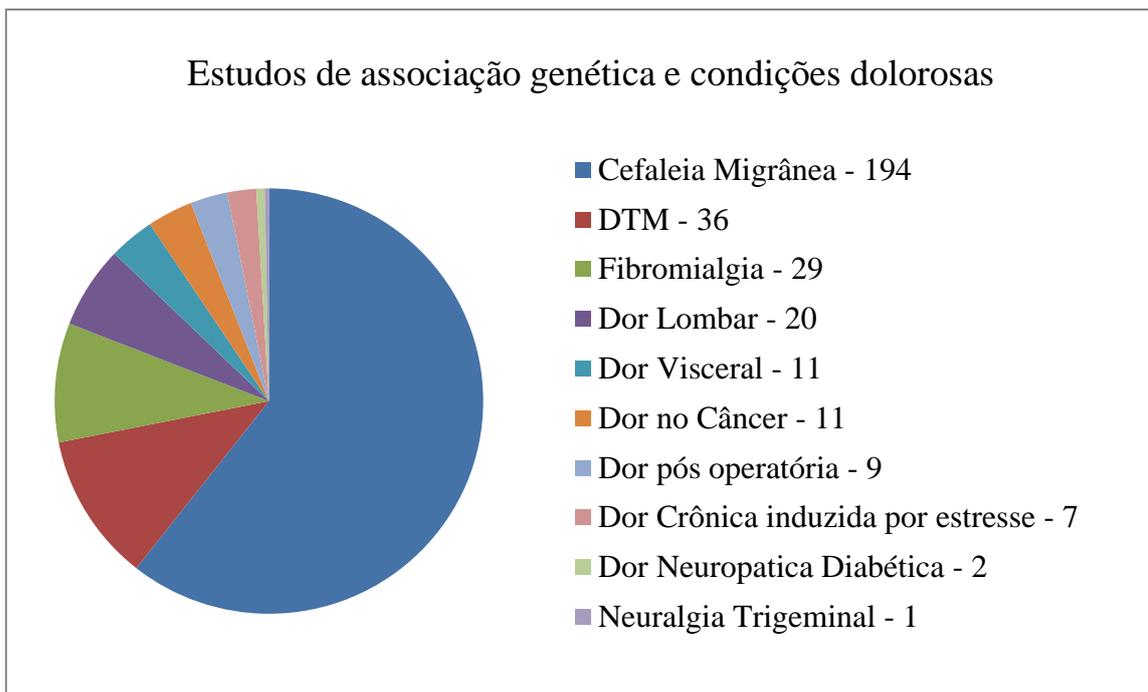


Figura 2: Número de estudos de associação genética e condições dolorosas.

Fonte: Adaptado de ZORINA-LICHENWALKER *et al.*, 2016.

1.2.2 Genética e Neuralgia do Trigêmeo

A genética pode apresentar um papel importante no desenvolvimento da NT (PANCHAGNULA *et al.*, 2019), sendo que o primeiro relato da NT familiar foi publicado no início do século XX (FERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2019). Ao longo dos anos, outros estudos também identificaram o caráter familiar da doença e relataram que indivíduos com diferentes graus de parentesco apresentaram NT (HERZBERG, 1980; BRAGA *et al.*, 1986; GUPTA *et al.*, 2002; SAVICA *et al.*, 2007; EL OTMANI *et al.*, 2008; FERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2019). Algumas hipóteses para o padrão familiar foram relacionadas às alterações em base do crânio, que poderiam favorecer o desenvolvimento da compressão neurovascular (FERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2019), enquanto outros estudos sugerem um padrão de herança autossômica dominante ou recessiva (HERZBERG, 1980; EL OTMANI *et al.*, 2008; CERVERA-MARTINEZ *et al.*, 2018) e o envolvimento de alterações na codificação dos canais de cálcio (SAVICA *et al.*, 2007).

Apesar dessas evidências, poucas pesquisas foram direcionadas para a investigação da contribuição dos mecanismos genéticos na fisiopatologia da NT. Um estudo relatou a identificação do aumento da excitabilidade neuronal devido à mutação do canal de sódio

Nav1.6 (TANAKA *et al.*, 2016), enquanto outras duas pesquisas relataram associações significativas entre SNPs e o desenvolvimento da NT (HUANG *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2014). Os SNPs rs2234693 e rs9340799 do gene codificador do receptor de estrógeno alfa (*ESR1*) foram associados ao aumento do risco de desenvolvimento da NT em mulheres (HUANG *et al.*, 2005), enquanto os pacientes com genótipo curto/curto e a presença de alelo curto para o SNP 5-HTTLPR do gene codificador do transportador de serotonina (*5-HTT*) apresentaram maior risco de desenvolvimento da NT, maior intensidade da dor e pior resposta ao tratamento com a CBZ (CUI *et al.*, 2014).

O estudo transversal do tipo caso-controle realizado previamente pelo nosso grupo, do qual este trabalho é um desdobramento, investigou as características clínicas e a possível associação dos SNPs rs6746039 do gene codificador do canal de sódio Nav1.7 (*SCN9A*), rs6334 do gene codificador do receptor TrkA do fator de crescimento nervoso (*NTRK1*), rs303810 do gene codificador do canal de sódio Nav1.6 (*SCN8A*) e rs6265 do gene codificador do fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*) e o diagnóstico da NT e a variação da intensidade da dor em uma amostra da população brasileira (COSTA *et al.*, 2018; COSTA, 2019). Os dados clínicos e sociodemográficos do trabalho anterior serão descritos a seguir, uma vez que a amostra de pacientes foi a mesma para o presente trabalho e essas informações são relevantes para a contextualização dos resultados aqui apresentados. Conforme evidenciado na **TABELA 1**, não foram observadas diferenças significativas entre pacientes e controles no que diz respeito à idade, sexo, comorbidades, medicações, atividade física e tabagismo. Os resultados clínicos dos pacientes diagnosticados com NT corroboraram outros estudos publicados anteriormente. Observamos idade média de $63,7 \pm 12,1$ anos, sendo 56,2% dos pacientes do sexo feminino. O lado direito foi acometido em 66,7% dos pacientes e 45,8% apresentaram acometimento dos ramos maxilar e mandibular (V2 e V3). A maioria (83,3%) caracterizou a intensidade da dor como intensa e 54,2% dos pacientes utilizavam a CBZ como tratamento farmacológico (COSTA *et al.*, 2018; COSTA, 2019). Em relação aos SNPs, não foram encontradas associações significativas entre o rs6746039 (*SCN9A*), rs6334 (*NTRK1*), rs303810 (*SCN8A*) e rs6265 (*BDNF*) com o diagnóstico e aumento da intensidade da dor (COSTA *et al.*, 2018; COSTA, 2019).

TABELA 1: Características sociodemográficas dos participantes do estudo.

Variáveis	Controles (n=48)	Pacientes (n=48)	p-valor
Idade (anos)	62,1±12,7 ¹	63,7±12,1 ¹	0,514 ³
Sexo (H/M)	21/27 (43,8/56,2%) ²	21/27 (43,8/56,2%) ²	1,0 ⁴
Comorbidades (Sim/Não)	30/18 (62,5/37,5%) ²	34/14 (70,8/29,2%) ²	0,386 ⁴
Hipertensão (Sim/Não)	26/22 (54,2/45,8%) ²	26/22 (54,2/45,8%) ²	1,0 ⁴
Diabetes (Sim/Não)	7/41 (14,6/85,4%) ²	6/42 (12,5/87,5%) ²	0,765 ⁴
Hipercolesterolemia (Sim/Não)	3/45 (6,2/93,8%) ²	5/43 (10,4/89,6%) ²	0,714 ⁵
Uso de medicamentos (Sim/Não)	31/17 (64,6/35,4%) ²	34/14 (70,8/29,2%) ²	0,513 ⁴
Atividade Física (Sim/Não)	24/24 (50/50%) ²	19/29 (39,6/60,4%) ²	0,305 ⁴
Tabagismo (Sim/Não)	7/41 (14,6/85,4%) ²	8/40 (16,7/83,3%) ²	0,779 ⁴

Dados apresentados em média e desvio padrão¹; Valores absolutos e porcentagem². Teste T³; Qui-quadrado⁴; Teste exato de Fisher⁵; H, homem; M, mulher. Fonte: COSTA, 2019

Dando continuidade aos trabalhos de associação genética em NT, o presente estudo avaliou SNPs de duas moléculas relevantes no contexto da dor crônica e DN: a Catecol-o-metiltransferase (COMT) e Guanosina Trifosfato Ciclohidrolase (GCH1).

1.2.3 Catecol-o-metiltransferase

O gene da COMT está localizado no cromossomo 22q11.1 – q11.2 (GROSSMAN; EMANUEL; BUDARF, 1992; CHEN *et al.*, 2004), sendo responsável pela codificação de duas isoformas da enzima COMT, a COMT ligada à membrana (MB-COMT) e a COMT solúvel (S-COMT) (TAMMIMÄKI; MÄNNISTÖ, 2012). A COMT é uma enzima fisiologicamente importante para o metabolismo de neurotransmissores, sendo responsável pela degradação de catecolaminas como noradrenalina, adrenalina e dopamina (GROSSMAN; EMANUEL; BUDARF 1992). Esses neurotransmissores apresentam importância para diversos processos fisiológicos como humor, inflamação e modulação da dor (ANDERSEN; SKORPEN, 2009; SMITH *et al.*, 2014).

O gene da COMT apresenta diversos SNPs, sendo que os mais frequentes foram investigados em relação à percepção da dor em humanos (TAMMIMÄKI; MÄNNISTÖ, 2012; SMITH *et al.*, 2014). O SNP rs4680, aqui estudado e anteriormente relacionado ao aumento da suscetibilidade à dor pós-cirúrgica e fibromialgia, à ansiedade e à depressão (SMITH *et al.*, 2014), está localizado na região de codificação da MB-COMT e S-COMT (TAMMIMÄKI; MÄNNISTÖ, 2012). Esse SNP é caracterizado pela troca do nucleotídeo G pelo A, resultando na substituição do

aminoácido valina (Val) pela metionina (Met) no códon 158 para MB-COMT e no códon 108 para S-COMT (TAMMIMÄKI; MÄNNISTÖ, 2012; HU *et al.*, 2018). Essa substituição está associada a uma diferença na termoestabilidade, levando à redução de três a quatro vezes na atividade enzimática (COHEN *et al.*, 2009). Os genótipos podem ser caracterizados pela atividade da COMT, assim GG (Val/Val) apresenta alta atividade enzimática, GA (Val/Met) atividade enzimática moderada e AA (Met/Met) atividade enzimática reduzida (HU *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação da COMT nas condições dolorosas em humanos ainda não está completamente esclarecido, mas a investigação de seus SNPs apresenta potencial para identificação de pacientes com maior suscetibilidade para desenvolvimento de dor (XU *et al.*, 2019). A diminuição da atividade da COMT foi associada ao aumento da sensibilidade à dor em animais (DIATCHENKO *et al.*, 2005). O mesmo modelo que utiliza inibidores da enzima evidenciou aumento de hiperalgesia mecânica e térmica, que foi revertida após terapia com o propranolol (antagonista não seletivo dos receptores β -adrenérgicos) e medicamentos bloqueadores seletivos dos receptores β_2 e β_3 adrenérgicos, sugerindo que a hiperalgesia estaria relacionada a esses receptores (NACLEY *et al.*, 2007). Estudos clínicos em pacientes com fibromialgia e DTM também demonstraram envolvimento de receptores β -adrenérgicos devido à melhora da sintomatologia dolorosa a curto prazo após uso do propranolol (LIGHT *et al.*, 2008). A atividade da COMT também parece apresentar alguma relação com sistema opioidérgico. Um estudo demonstrou que os pacientes com genótipo AA apresentavam maior sensibilidade à dor e maior densidade de receptores μ -opióides no cérebro (ZUBIETA *et al.*, 2003). Os estudos clínicos em pacientes com câncer identificaram que os indivíduos com genótipo AA e com haplótipo contendo o alelo A do rs4680 necessitaram de menores dosagens de morfina para o alívio da dor, quando comparados aos pacientes com outros genótipos (RAKVÅG *et al.*, 2005; REYES-GIBBY *et al.*, 2007; RAKVÅG *et al.*, 2008; LUCENTEFORTE *et al.*, 2019). O mecanismo pelo qual esse SNP pode explicar a variação nas dosagens de morfina é relacionado à ativação constante da via dopaminérgica, que seria responsável pela diminuição dos níveis de encefalinas (STEINER *et al.*, 1998), consequentemente a redução desses níveis permite uma regulação positiva para os receptores μ -opióides, mas sem alteração nos receptores ρ -opióides (CHEN *et al.*, 1993).

A literatura mostra, em uma revisão sistemática que o SNP rs4680 pode ser associado à suscetibilidade ao desenvolvimento da fibromialgia e pior resposta ao questionário *Fibromyalgia Impact Questionnaire* (FIQ) (LEE; KIM; SONG; 2015). Os estudos em populações europeias, como na população espanhola, identificaram o genótipo AA mais frequente em pacientes com fibromialgia, também sendo associado a valores elevados do FIQ (GARCÍA-FRUCTUOSO *et al.*, 2006; VARGAS-ALARCÓN *et al.*, 2007; MARTINEZ-JAUAND *et al.*, 2013) e alterações no sistema nervoso simpático e sistema imunológico humoral (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2014). Em pacientes suíços, o genótipo AA também foi associado à sensibilização central e maior intensidade da dor (DESMEULES *et al.*, 2014).

Do mesmo modo, foi observado, na população turca e israelense, que os genótipos AA e AG eram mais presentes em pacientes com fibromialgia quando comparados aos controles (GÜRSOY *et al.*, 2003; COHEN *et al.*, 2009; INANIR *et al.*, 2014), em associação a menor limiar à dor (INANIR *et al.*, 2014). Em pacientes brasileiros, o genótipo AA foi mais frequente em indivíduos com fibromialgia, sendo associado ao maior valor do FIQ e aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento dessa condição dolorosa (MATSUDA *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos realizados em pacientes turcos, mexicanos e canadenses não identificaram a associação significativa entre rs4680 e o diagnóstico de fibromialgia (VARGAS-ALARCÓN *et al.*, 2007; TANDER *et al.*, 2008; POTVIN *et al.*, 2009).

Em pacientes com DTM, foi observada a presença de um haplótipo da COMT com os SNPs rs6269 / rs4633 / rs4818 / rs4680 e variação na atividade enzimática. O haplótipo LPS (G-C-G-G) foi associado à menor sensibilidade à dor, enquanto o APS (A-T-C-A) e HPS (A-C-C-G) apresentaram maior sensibilidade. Portanto, foi identificado que a taxa de incidência do desenvolvimento de DTM muscular foi mais que o dobro em indivíduos com haplótipos APS e HPS, quando comparados aos que apresentavam pelo menos um haplótipo LPS (DIATCHENKO *et al.*, 2005). Em outros estudos, o rs4680 não foi relacionado como fator de risco para o desenvolvimento de DTM e dor aguda pós extração de terceiro molar (MLADENOVIC *et al.*, 2016).

Em relação à cefaleia migrânea, os estudos clínicos apresentam resultados controversos sobre a associação do rs4680 com a fisiopatologia da doença. Uma revisão sistemática com metanálise não encontrou resultados significativos da associação do SNP com a

cefaleia migrânea nas populações européia e asiática (LIAO *et al.*, 2017), corroborando resultados de revisão realizada anteriormente (TAMMIMÄKI; MÄNNISTÖ, 2012). Entretanto, outra revisão sistemática com metanálise encontrou resultados diferentes, indicando que esse SNP pode diminuir o risco de cefaleia migrânea em pacientes caucasianos (CHEN *et al.*, 2015). A cefaleia do tipo tensional também parece não apresentar suscetibilidade associada ao rs4680 (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2011 e 2019; TAKIGAWA; KOWA; NAKASHIMA, 2017). Porém, pacientes com o genótipo AA apresentaram maior sensibilidade à pressão muscular, histórico mais longo de cefaleia e maiores níveis de depressão quando comparados aos indivíduos com outros genótipos (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2011 e 2019).

Os estudos relacionados à investigação do rs4680 em DN não encontraram associações significativas desse SNP com o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento dessas condições (VELUCHAMY *et al.*, 2018). Os estudos na população espanhola não encontraram associações significativas do SNP rs4680 e o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de dores neuropáticas (ARMERO *et al.*, 2005, FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.* 2013; FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2013), mas em alguns pacientes, o genótipo AA foi associado à presença e ao aumento da intensidade da dor, além de maior incapacidade (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2013a; FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2013b). Porém, vale ressaltar que foram realizados poucos estudos, sendo esses sem distinção entre condições neuropáticas com etiologias diferentes, além de amostra reduzida da população européia (VELUCHAMY *et al.*, 2018).

1.2.4 Guanosina Trifosfato Ciclohidrolase 1

O gene da GCH1 está localizado no cromossomo 14q22.1 – q22.2 (SEGAWA; NOMURA; HAYASHI, 2013). A enzima GCH1 está relacionada à via de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4), cofator essencial para várias enzimas (ZHANG *et al.*, 2007) como fenilalanina, tirosina e triptofano hidroxilases, com atividades relacionadas à regulação da síntese de catecolaminas, serotonina e óxido nítrico (THONY; AUERBACH; BLAU, 2000; NASSER; MØLLER, 2014). A síntese da BH4 (FIGURA 3) tem início com ação enzimática da GCH1 na transformação da guanosina trifosfato (GTP) em 7,8-dihidroneopterina-trifosfato, sendo esse composto convertido, em sequência, pela ação da enzima 6-piruvotetrahydrobiopterina sintase (PTPS) em 6-piruvotetrahydrobiopterina. Em seguida, a enzima sepiapterina redutase (SR)

transforma o 6-piruvotetrahidrobiopterina em BH4 (NASSER; MØLLER, 2014). Após uma lesão ou inflamação, a GCH1 é aumentada, provocando consequente aumento da síntese de BH4 (NASSER; MØLLER, 2014). Em contrapartida, a deficiência de BH4 provocada por mutações autossômicas recessivas pode ser associada ao desenvolvimento de hiperfenilalaninemia, além de várias doenças neurológicas, como a distonia responsiva à Dopa, Parkinson, Alzheimer, autismo e depressão, devido à disponibilidade restrita de cofatores (THONY; AUERBACH; BLAU, 2000).

BH4 production pathway

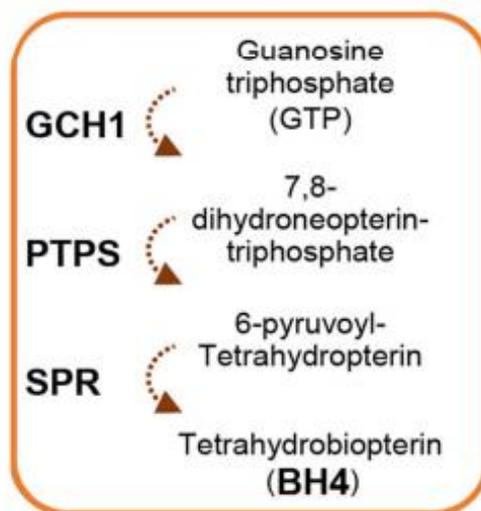


Figura 3: Via de síntese da BH4.

Fonte: Adaptado de LATREMOLIERE; COSTIGAN, 2017.

O gene *GCH1* apresenta um haplótipo, conhecido como fator de proteção à dor, composto pelos SNPs rs10483639, rs3783641 e rs8007267. Esses SNPs estão localizados em regiões não codificadoras, sendo a ação mais provável relacionada à diminuição da transcrição de *GCH1* ou à estabilidade do RNA (LOTSCH *et al.*, 2007). Os SNPs da *GCH1* tem sido estudados em conjunto e foram associados à diminuição da produção de BH4, apresentando relação com a redução da sensibilidade à dor e à cronicidade (FIGURA 4) devido à diminuição da atividade enzimática da *GCH1* (TEGEDER *et al.*, 2006). O SNP rs8007267, aqui estudado, está localizado em uma região promotora putativa e é caracterizado pela troca do nucleotídeo C por T (ANTONIADES *et al.*, 2008). Esse SNP, em conjunto com os outros SNPs, foi associado aos escores mais baixos de dor após cirurgia de discectomia lombar (TEGEDER *et al.*, 2006).

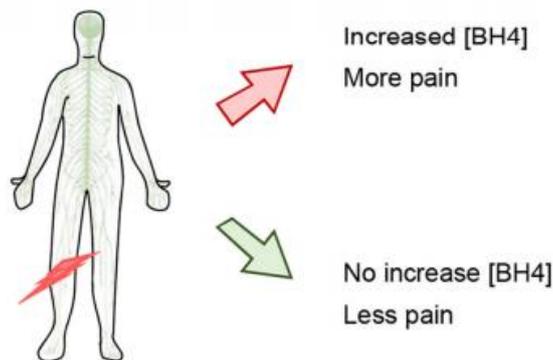


Figura 4: Relação da BH4 e dor.

Fonte: Adaptado de LATREMOLIERE; COSTIGAN, 2017.

Dois estudos investigaram os SNPs da GCH1 em fibromialgia, sendo que o rs8007267 não foi considerado fator de proteção ou suscetibilidade ao desenvolvimento dessa condição em coreanos ou espanhóis (KIM *et al.*, 2013; ESTÉVEZ-LÓPEZ *et al.*, 2018). Outros estudos investigaram os SNPs da GCH1 em condições de dor associadas ao câncer, sendo que o haplótipo protetor da dor não foi associado à proteção à dor pós-operatória em mulheres (HICKEY *et al.*, 2011). Porém, o mesmo haplótipo foi identificado como um fator de adiamento para o início do uso de opióides no alívio da dor em pacientes caucasianos homozigotos quando comparados aos heterozigotos (LÖTSCH *et al.*, 2010).

Poucos estudos investigaram a associação do haplótipo protetor da dor com o desenvolvimento de DN (VELUCHAMY *et al.*, 2018). Em um trabalho, esse haplótipo foi associado ao menor risco de desenvolvimento da dor em pacientes africanos com neuropatia associada ao HIV (WADLEY *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos realizados em pacientes com dor pós-operatória persistente, não encontraram associação significativa dos polimorfismos isolados e do haplótipo protetor da dor com a DN em europeus (HEGARDY; SHORTEN, 2012; KALLIOMÄKI *et al.*, 2016).

Estudos experimentais observaram que a inibição da GCH1 em modelos de DN foi capaz de reverter a hipersensibilidade mecânica e térmica, apresentando, efeitos anti nociceptivos (TEGEDER *et al.*, 2006). Em modelo de dor oncológica, a inibição da GCH1 em conjunto com a administração de morfina foi associada ao aumento do efeito analgésico (PICKERT *et al.*, 2012), enquanto a inibição da GCH1 em modelo de dor

inflamatória também apresentou resultados positivos, com a diminuição da hiperalgesia ao calor (TEGEDER *et al.*, 2006).

O possível mecanismo da GCH1 e BH4 no desenvolvimento da dor foi avaliado em modelos animais e foi constatado que a síntese da BH4 foi maior em neurônios sensoriais de ratos após lesão axonal e inflamação periférica. Esse aumento foi importante no desenvolvimento da dor, pois a concentração de BH4 é essencial para regulação da atividade das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), tirosina-hidroxilase e triptofano-hidroxilase, sendo a funcionalidade dessas enzimas associadas aos efeitos algícos (TEGEDER *et al.*, 2006). Esses efeitos seriam relacionados às catecolaminas, serotonina e óxido nítrico (NO) e suas funções nos complexos mecanismos de sinalização facilitadora e inibidora do sistema nociceptivo (NASSER; MØLLER, 2014). Em função desses achados, a GCH1 tornou-se um alvo promissor na pesquisa de medicamentos para o tratamento da dor crônica e neuropática, principalmente devido ao seu efeito na redução da síntese de BH4 (NAYLOR *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da evolução no conhecimento referente à NT nas últimas décadas, a literatura ainda apresenta lacunas que necessitam de esclarecimento, principalmente em aspectos relacionados à fisiopatologia, etiologia, genética e tratamento (MARRBJERG *et al.*, 2017). Os estudos publicados sobre a NT familiar reforçam a possibilidade do envolvimento de componentes genéticos no desenvolvimento da NT (PANCHAGNULA *et al.*, 2019; FERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2019), porém poucos estudos foram realizados para investigar a contribuição dos SNPs nesse contexto (HUANG *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2018). A identificação de contribuintes genéticos em condições de dor crônica apresenta-se fundamental para o entendimento das diferenças individuais na percepção da dor e analgesia e pode favorecer o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e formas de tratamento. Além disso, a identificação de subpopulações de pacientes com susceptibilidade ao desenvolvimento de determinada condição permitirá uma conduta clínica individualizada, o que contribui de maneira bastante relevante para a medicina personalizada (DIATCHENKO *et al.*, 2013).

Atualmente, a *COMT* é um dos genes mais estudados nas áreas de dor e genética devido ao seu envolvimento nos mecanismos das vias de transmissão (MELOTO *et al.*, 2016). A *GCH1*, por sua vez, tornou-se um alvo promissor na pesquisa de medicamentos devido à sua relação com a diminuição da síntese de BH4 (NAYLOR *et al.*, 2010), além do seu papel protetor no desenvolvimento da dor (LOTSCH *et al.*, 2007; WADLEY *et al.*, 2012).

Com base no exposto, portanto, o presente estudo visou investigar SNPs dos genes da *COMT* e *GCH1* em pacientes brasileiros com NT com o objetivo de contribuir para o conhecimento sobre a influência desses SNPs no desenvolvimento e fisiopatologia da NT.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar os polimorfismos dos genes codificadores da COMT e GCH1 em pacientes com NT.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar, em indivíduos com NT, o polimorfismo rs4680 do gene *COMT*, codificador da enzima COMT, associando-o à presença da NT e à intensidade da dor em comparação aos controles;
- Investigar, em indivíduos com NT, o polimorfismo rs8007267 do gene *GCH1*, codificador da enzima GCH1, associando-o à presença da NT e à intensidade da dor em comparação aos controles.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal do tipo caso-controle, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP - UFMG) sob o parecer CAAE 42098115.7.1001.5149 (**ANEXO 1**). Todos os participantes do estudo receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**APÊNDICE 1**) com as informações sobre a pesquisa e autorização para coleta de material biológico, aplicação dos instrumentos e uso das informações para fins acadêmicos. Todos os procedimentos realizados durante o estudo estavam de acordo com as normas do COEP – UFMG.

4.1 SELEÇÃO AMOSTRAL

Foram recrutados 96 indivíduos, sendo 48 diagnosticados com NT e 48 controles no Ambulatório de Dor Orofacial da Clínica da Dor do Hospital das Clínicas da UFMG, no Hospital Felício Rocho e no Ambulatório de Dor Orofacial e Disfunção Temporomandibular do Centro de Especialização e Treinamento da Odontologia (CETRO) em Belo Horizonte/MG e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) em São Paulo/SP.

Os critérios de inclusão adotados para o estudo foram: (1) diagnóstico da NT segundo as diretrizes estabelecidas pela ICHD-3 da IHS e (2) idade superior a 18 anos. Os critérios de exclusão foram: (1) incapacidade de realizar e/ou compreender algum procedimento, (2) diagnóstico de outra dor neuropática e/ou doenças neurodegenerativas (exemplo a esclerose múltipla) e (3) uso de anti-inflamatórios até quatro semanas antes do exame. Os controles selecionados apresentavam idade superior a 18 anos, não possuíam diagnóstico de NT ou os critérios de exclusão. Todos os controles do estudo foram pareados por idade e sexo. Os pacientes foram submetidos à avaliação da dor por um avaliador previamente treinado, além da coleta de células do raspado da mucosa jugal e sangue venoso para genotipagem, enquanto os controles foram submetidos apenas à coleta de material biológico.

4.2 INSTRUMENTOS DE MEDIDA

4.2.1 Escala Visual Analógica (EVA)

A Escala Visual Analógica (EVA) é um instrumento unidimensional amplamente utilizado na avaliação da intensidade da dor. A EVA é composta por uma linha horizontal com 10 cm de comprimento, onde as extremidades apresentam os descritores

“sem dor” (0) e “pior dor possível” (10) (JANSEN *et al.*, 1986; HAWKER *et al.*, 2011). A escala não apresenta números e descritores verbais nas áreas intermediárias para evitar a escolha de um número ou palavra por simples afinidade do paciente (HAWKER *et al.*, 2011). Durante a sua aplicação, o paciente é orientado a posicionar o cursor na região que representa a intensidade da dor percebida (JANSEN *et al.*, 1986) (FIGURA 5). A escala apresenta números e descritores na parte voltada para o avaliador, assim o valor atribuído pelo paciente pode ser registrado durante a avaliação (FIGURA 6).



Figura 5: EVA – parte visualizada pelo paciente.



Figura 6: EVA – parte visualizada pelo avaliador.

4.3 MATERIAL BIOLÓGICO

4.3.1 Coleta de sangue

Os participantes foram submetidos à coleta de aproximadamente 13 mL de sangue venoso da veia intermédia do cotovelo em dois tubos plásticos descartáveis a vácuo (*Vacuum II*), sendo um tubo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e outro sem aditivo. Após a coleta, os tubos permaneceram em temperatura ambiente durante 30 minutos e, após esse período, os tubos foram transportados para a geladeira do laboratório à temperatura de 4°C. A primeira etapa de processamento do material foi a centrifugação dos tubos a 2000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C para obtenção de soro, plasma e células. A segunda etapa do processamento foi caracterizada pela separação do sobrenadante dos tubos (plasma no tubo com EDTA e soro no tubo sem aditivo) e células dos dois tubos. Todos os materiais biológicos coletados foram aliquotados, devidamente identificados em tubos *ependorf* de 500µl e congelados em freezer a -80°C até o processo de extração do DNA para genotipagem.

4.3.2 Coleta de células

Os participantes foram submetidos à coleta de amostras de células do raspado da mucosa jugal. A primeira etapa da coleta foi realizada com uma escova cervical descartável e estéril (*Labor Import*). A segunda etapa, realizada com objetivo de estabilizar o DNA coletado até posterior processamento em laboratório, foi a imersão da escova em tubo *ependorf* de 1,5 mL contendo 500 µl de Tampão de Krebs com pH 7,4 (NaCl-3,62 g; KCl-0,15 g; MgSO₄-0,14 g; Hepes-2,97 g; Glicose-0,90 g; H₂O deionizada 500 ml). Após as duas etapas, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o processo de extração do DNA para genotipagem.

4.4 BIOLOGIA MOLECULAR

4.4.1 Extração do DNA

A extração do DNA de células do sangue e do raspado da mucosa jugal seguiu o protocolo descrito na literatura (BOOM *et al.*, 1990), com algumas adaptações. A primeira etapa foi o descongelamento das amostras, seguido da centrifugação a 11000 rpm por 5 minutos e descarte do sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 450 µl de solução de lise celular L6 [GuHCl-9,7 g; Tris HCl (0,1 M pH 6,4) 10 mL; EDTA (0,2 M pH 8,0) 2,2 mL; TritonX-100 245 µl] e 20 µl de suspensão de sílica; seguido da agitação em Vortex e incubação em banho seco durante 30 minutos à temperatura de 56°C. Após esse período, o material foi centrifugado por 1 minuto a 10000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 450 µl de tampão L2 [GuHCl-9,7 g; Tris HCl (0,1 M pH 6,4) 10 mL] por 2 vezes, com posterior agitação no Vortex, centrifugação e descarte do sobrenadante. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com etanol a 70%, seguido por agitação no Vortex, centrifugação e descarte do sobrenadante. Uma lavagem com acetona, seguido por agitação no Vortex, centrifugação e descarte do sobrenadante e manutenção da sílica em banho seco para secagem durante 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µl de tampão Tris-EDTA (pH 8,0), seguido de agitação no Vortex e manutenção do composto em banho seco durante 12 horas a 56°C. Após esse período, o composto foi submetido à agitação no Vortex e centrifugação, permitindo a obtenção do sobrenadante com o DNA, que foi transferido para um novo tubo *ependorf*. A amostra DNA foi quantificada em espectrofotômetro *Denovix DS11*, seguido do armazenamento em freezer a -20°C até a realização da genotipagem.

4.4.2 Genotipagem por PCR em tempo real

A genotipagem por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) é fundamentada na amplificação *in vitro* de áreas de interesse do DNA, com a utilização de iniciadores específicos baseados nas sequências correspondentes aos polimorfismos avaliados. O processo de genotipagem deste estudo foi baseado no sistema *TaqMan* de detecção que utiliza sondas específicas para os polimorfismos marcadas por fluorocromos (VIC para um alelo e FAM para o outro alelo). Há liberação da fluorescência a partir do momento em que existe a ligação da sonda com os nucleotídeos da fita de DNA com posterior início da amplificação. A emissão da fluorescência é detectada pela máquina de RT-PCR e permite a avaliação do número de cópias amplificadas e reconhecimento dos alelos presentes nas amostras estudadas e controles positivos e negativos. Foram utilizadas sondas específicas para os genes e seus polimorfismos: (1) *COMT* rs4680/Val158Met (C__25746809_50_ Assay ID, Thermo Fisher Scientific/ Waltham, Massachusetts, USA) e (2) *GCHI* rs8007267 (C__1545138_10_Assay ID, Thermo Fisher Scientific/ Waltham, Massachusetts, USA). Para a genotipagem, foi utilizado o termociclador C1000TM Thermal Cycler/CFX96 (Bio-Rad Laboratories, USA). A reação foi realizada com volume final de 20 µl, contendo 4 µl de DNA (50 ng), 10 µl de Genotyping Assay Master Mix (Thermo Fisher Scientific/ Waltham, Massachusetts, USA), 0,5 µl de sonda TaqMan e 5,5 µl de H₂O estéril. O protocolo adotado para amplificação foi de 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C por 10 minutos e 60°C por 1 minuto, de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram armazenados no programa Microsoft Excel e posteriormente exportados para o IBM-SPSS – Statistical Editor de Dados V21 e Open Epi V3.01 (online) para as análises estatísticas. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para os dois polimorfismos estudados. Foram utilizados os testes de Qui-quadrado (χ^2) e o Teste Exato de Fisher para comparação de genótipos e frequências alélicas entre pacientes e controles com significância estatística de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Identificação dos polimorfismos

5.1.1 Polimorfismo rs4680 do gene codificador da COMT

O polimorfismo rs4680 apresentou distribuição em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição genotípica ou alélica na amostra estudada (**TABELA 2**).

TABELA 2: Genótipo e frequência alélica do polimorfismo rs4680 do gene codificador da COMT em pacientes e controles.

SNP	Variáveis	Controles (n=48)	Pacientes (n=48)	p-valor
rs4680	Genótipo			1,0 ¹
	GG	19 (39,6%)	18 (37,5%)	
	AG	23 (47,9%)	23 (47,9%)	
	AA	6 (12,5%)	7 (14,6%)	
	Alelo			0,765 ¹
	G	61 (63,5%)	59 (61,5%)	
A	35 (36,5%)	37 (38,5%)		

¹Qui-quadrado

5.1.2 Polimorfismo rs8007267 do gene codificador da GCH1

O polimorfismo rs8007267 apresentou distribuição em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição genotípica ou alélica em pacientes e controles na amostra deste estudo (**TABELA 3**).

TABELA 3: Genótipo e frequência alélica do polimorfismo rs8007267 do gene codificador da GCH1 em pacientes e controles.

SNP	Variáveis	Controles (n=48)	Pacientes (n=48)	p-valor
rs8007267	Genótipo			0,061 ¹
	CC	26 (54,2%)	33 (68,8%)	
	CT	22 (45,8%)	13 (27%)	
	TT	0 (0%)	2 (4,2%)	
	Alelo			0,369 ²
	C	74 (77,1%)	79 (82,3%)	
T	22 (22,9%)	17 (17,7%)		

¹Teste Exato de Fisher; ²Qui-quadrado

5.2 Associação dos genótipos e frequências alélicas com a intensidade da dor

5.2.1 Associação dos genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs4680 do gene codificador da COMT com a intensidade da dor obtida pela EVA

As associações entre os genótipos e frequências alélicas dos pacientes da amostra estudada com os índices de dor obtidos pela EVA não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o polimorfismo rs4680 (TABELA 4).

TABELA 4: Associação entre os genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs4680 do gene codificador da COMT com a intensidade da dor.

SNP	Variáveis	EVA			p-valor
		Leve	Moderada	Grave	
rs4680	Genótipo				0,275 ¹
	GG	0 (0%)	4 (66,6%)	14 (35%)	
	AG	2 (100%)	1 (16,7%)	20 (50%)	
	AA	0 (0%)	1 (16,7%)	6 (15%)	
	Alelo				0,548 ¹
	G	2 (50%)	9 (75%)	48 (60%)	
A	2 (50%)	3 (25%)	32 (40%)		

¹Teste Exato de Fisher

5.2.2 Associação dos genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs8007267 do gene codificador da GCH1 com a intensidade da dor obtida pela EVA

As associações entre os genótipos e frequências alélicas dos pacientes com os índices de dor obtidos pela EVA não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o polimorfismo rs8007267 (TABELA 5).

TABELA 5: Associação entre os genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs8007267 do gene codificador da GCH1 com a intensidade da dor.

SNP	Variáveis	EVA			p-valor
		Leve	Moderada	Grave	
rs8007267	Genótipo				1,0 ¹
	CC	2 (100%)	4 (67%)	27 (68%)	
	CT	0 (0%)	2 (33%)	11 (27%)	
	TT	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	
	Alelo				1,0 ¹
	C	4 (100%)	10 (83%)	65 (81%)	
T	0 (0%)	2 (17%)	15 (19%)		

¹Teste Exato de Fisher

6 DISCUSSÃO

Considerando a literatura atual, este trabalho é um dos únicos a investigar fatores genéticos na NT, sendo pioneiro no estudo dos SNPs rs4680 e rs8007267 dos genes codificadores da *COMT* e *GCH1*, respectivamente, em pacientes com NT. O objetivo principal foi investigar a presença dos SNPs mencionados em indivíduos com NT e controles, com base na hipótese de que a suscetibilidade ou a proteção ao desenvolvimento da NT poderia estar associada à presença desses SNPs. O objetivo secundário foi a investigação da relação dos SNPs rs4680 (*COMT*) e rs8007267 (*GCH1*) com a avaliação da dor em pacientes diagnosticados com NT. Na amostra estudada, não foram encontradas associações entre as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs avaliados e o diagnóstico de NT ou a variabilidade da intensidade de dor experimentada pelos pacientes.

Conforme mencionado, estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo avaliou outros quatro SNPs: rs6746039 (*SCN9A*), rs6334 (*NTRK1*), rs303810 (*SCN8A*) e rs6265 (*BDNF*). Não foi encontrada associação significativa entre as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs estudados e o diagnóstico da NT ou a intensidade da dor (COSTA *et al.*, 2018; COSTA, 2019). No presente trabalho, utilizamos a mesma amostra de pacientes e controles para investigação dos SNPs rs4680 (*COMT*) e rs8007267 (*GCH1*). Dessa forma, os dados sociodemográficos e clínicos são os previamente descritos e publicados (COSTA *et al.*, 2018). Vale ressaltar que esses dados demonstram a homogeneidade da amostra, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre grupos. Ainda, os resultados clínicos, assim como os dados sociodemográficos encontrados na população, corroboraram evidências descritas na literatura no que diz respeito às características dos pacientes diagnosticados com NT (COSTA *et al.*, 2018).

Este trabalho investigou os SNPs da *COMT* e *GCH1* em função das evidências encontradas na literatura. A *COMT* é um dos genes mais pesquisados em estudos de dor e genética devido ao seu envolvimento nas vias de transmissão nociceptiva (MELOTO *et al.*, 2016). O SNP rs4680 está associado a condições de dor musculoesquelética sistêmica e orofacial, aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento da dor e sua intensidade (LEE; KIM; SONG, 2015). Por outro lado, a *GCH1* representa alvo promissor em pesquisas de novos medicamentos devido à sua relação com diminuição

da síntese do BH4 (NAYLOR *et al.*, 2010). O SNP rs8007267 faz parte do haplótipo protetor da dor e as evidências demonstram sua ação protetora no desenvolvimento de dor crônica e no uso tardio de analgésicos (WADLEY *et al.*, 2012; LÖTSCH *et al.*, 2010).

Com relação ao polimorfismo rs4680 (*COMT*), a frequência do alelo polimórfico A foi de 36,5% em pacientes e de 38,5% em controles, corroborando dados encontrados na literatura em que foram identificadas variações de 32,8% a 43% em pacientes espanhóis com cefaleia do tipo tensional e 39% em controles (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2019).

Apesar da ausência de associação significativa entre a frequência genotípica e alélica do SNP rs4680 com o diagnóstico da NT em nossa amostra, existem evidências da associação significativa desse polimorfismo com algumas condições dolorosas, tais como fibromialgia e DTM (LEE; KIM; SONG, 2015; DIATCHENKO *et al.*, 2005). As evidências encontradas na literatura consolidaram a associação do rs4680 com a fibromialgia, relacionando-o ao aumento da suscetibilidade, intensidade da dor, pior quadro clínico e alterações imunológicas (GARCÍA-FRUCTUOSO *et al.*, 2006; VARGAS-ALARCÓN *et al.*, 2007; MARTINEZ-JAUAND *et al.*, 2013; DESMEULES *et al.*, 2014; MATSUDA *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2012; FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2014).

Por outro lado, as evidências encontradas para outras condições dolorosas não são conclusivas. Em relação à cefaleia migrânea, alguns estudos não associam o SNP rs4680 ao aumento da suscetibilidade, enquanto outro estudo relaciona à diminuição da suscetibilidade ao desenvolvimento dessa condição (LIAO *et al.*, 2017; TAMMIMÄKI; MÄNNISTÖ, 2012; CHEN *et al.*, 2015). O SNP rs4680 não apresenta associação com o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento da cefaleia do tipo tensional, porém os pacientes com o genótipo homocigoto para o polimorfismo apresentaram variação na manifestação clínica, com maior sensibilidade à pressão muscular e maior tempo de desenvolvimento da cefaleia (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.*, 2011 e 2019).

Uma revisão sistemática com metanálise não encontrou associação significativa do SNP rs4680 com maior suscetibilidade ao desenvolvimento de condições neuropáticas (VELUCHAMY *et al.*, 2018). Um aspecto importante é que os estudos avaliaram apenas amostras da população europeia e com condições neuropáticas e etiologias

distintas (VELUCHAMY *et al.*, 2018). Na população espanhola, não foi encontrada associação significativa do SNP rs4680 com o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de condições neuropáticas (ARMERO *et al.*, 2005, FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.* 2013; FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.* 2013), porém em alguns pacientes, o genótipo AA foi associado ao maior grau de incapacidade e à presença da dor e ao aumento de sua intensidade (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.* 2013a; FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.* 2013b).

Portanto, a ausência de associação significativa da frequência genotípica e alélica do rs4680 na amostra de pacientes com NT deste estudo está de acordo com as poucas evidências da literatura que relatam ausência de associação do SNP com a fisiopatologia e diagnóstico de diferentes condições de DN (VELUCHAMY *et al.*, 2018).

Outro aspecto observado na literatura é a associação do rs4680 com a maior intensidade de dor em condições neuropáticas (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.* 2013a; FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS *et al.* 2013b), aspecto que não foi observado na nossa amostra, já que a maioria dos pacientes apresentou dor intensa. Essa ausência de relação com o aumento da intensidade da dor pode ser justificada pela própria característica clínica da NT, sempre apresentada com dor muito intensa desde as suas primeiras descrições por John Fothergill (COLE *et al.*, 2005; PATEL; LIU, 2016).

Alguns outros SNPs da COMT foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento de condições dolorosas. Os SNPs rs165774, rs165656, rs4646310 e rs4818 foram associados à suscetibilidade ao desenvolvimento de DTM (MLADENOVIC *et al.*, 2016; MICHELOTTI *et al.*, 2014; BRANCHER *et al.*, 2019). O rs6269, por sua vez, foi associado à dor aguda pós extração de terceiro molar (MLADENOVIC *et al.*, 2016). Esses achados podem auxiliar no direcionamento de novas pesquisas sobre o papel da COMT e seu gene em outras condições dolorosas, inclusive a NT.

Com relação ao SNP rs8007267 (*GCHI*), a frequência do alelo polimórfico T foi de 17% em pacientes e 22% em controles, o que está de acordo com as frequências alélicas encontradas na literatura de 20-22% em pacientes japoneses com depressão e 23% em controles (KISHI *et al.*, 2012).

Com relação ao polimorfismo da GCH1 aqui estudado, poucos trabalhos o estudaram de maneira isolada ou avaliaram sua associação à suscetibilidade e/ou proteção em condições dolorosas. As evidências são escassas e conflitantes, portanto, a ausência de associação significativa entre a frequência genotípica e alélica do SNP rs8007267 com o diagnóstico da NT em nossa amostra é relevante e contribui para o conhecimento atual sobre o papel da GCH1 e de seus polimorfismos em condições dolorosas.

Algumas evidências não associam o SNP rs8007267 à suscetibilidade ou proteção à fibromialgia (KIM *et al.*, 2013; ESTÉVEZ-LÓPEZ *et al.*, 2018). Alguns outros SNPs do GCH1 como rs3783641, rs841, rs752688 e rs4411417 foram considerados fatores de proteção à suscetibilidade à fibromialgia e à dor na população sul coreana (KIM *et al.*, 2013). Entretanto, o SNP rs841 apresentou associação com a suscetibilidade a essa condição dolorosa na população espanhola (ESTÉVEZ-LÓPEZ *et al.*, 2018). Podemos observar, portanto, que os estudos dos SNPs da GCH1 em associação com a fibromialgia apresentam contradições, o que reforça a necessidade de novas investigações em outras populações. Ainda não existem estudos publicados sobre a relação dos SNPs da GCH1 e condições dolorosas orofaciais como DTM, cefaleia migrânea e cefaleia do tipo tensional.

A literatura ainda não apresenta uma definição estabelecida sobre a associação dos SNPs da GCH1 e condições de dor neuropática. Uma revisão sistemática sobre o tema não conseguiu realizar a metanálise devido ao pequeno número de trabalhos disponíveis (VELUCHAMY *et al.*, 2018). A avaliação individual desses estudos mostra que um haplótipo que apresenta o rs8007267 foi associado ao menor risco de desenvolvimento de DN em pacientes africanos com neuropatia associada ao HIV (WADLEY *et al.*, 2012). Entretanto, outro estudo não encontrou associação desse haplótipo e dos SNPs com o desenvolvimento da DN em suecos submetidos à cirurgia de herniotomia na virilha (KALLIOMÄKI *et al.*, 2016). Em um trabalho o alelo C foi significativamente mais associado à dor persistente pós cirurgia lombar em pacientes irlandeses (HEGARTY; SHORTEN, 2012). Como demonstrados, os resultados encontrados ainda são preliminares, reforçando a necessidade de novos estudos para avaliação dos SNPs da GCH1 e a suscetibilidade a condições neuropáticas, o que demonstra a relevância da presente investigação, sobretudo no contexto da NT e de sua fisiopatologia. Ainda, o esclarecimento dos mecanismos que o haplótipo protetor da dor e seus SNPs apresentam em relação à diminuição da atividade enzimática (TEGEDER *et al.*, 2006)

pode auxiliar no direcionamento de novos estudos de associação genética em diversas condições dolorosas, além da NT.

7 CONCLUSÃO

Apesar da ausência de associação significativa entre os SNPs rs4680 (*COMT*) e rs8007267 (*GCHI*) e o diagnóstico de NT ou a intensidade da dor, os resultados encontrados neste trabalho são relevantes devido à escassez de pesquisas em genética e NT. Os achados podem auxiliar no direcionamento de novas investigações na população brasileira, assim como em outras populações, para melhor compreensão da influência genética na suscetibilidade ao desenvolvimento da NT. Ainda, é importante ressaltar que não se pode descartar a possibilidade de envolvimento da *COMT* e da *GCHI* na suscetibilidade à NT. Sendo assim, estudos futuros com amostras populacionais distintas, avaliação de outros SNPs da *COMT* e *GCHI* e de fatores epigenéticos são necessários e podem contribuir para a compreensão da patogênese da NT.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-QULITI, K.W. Update on neuropathic pain treatment for trigeminal neuralgia: The pharmacological and surgical options. **Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 107-114, 2015.

ALSHUKRY, A.; SALBURGO, F.; JALOUX, L.; LAVIEILLE, J.P. *et al.* Trigeminal neuralgia (TN): A descriptive literature analysis on the diagnosis and management modalities. **J Stomatol Oral Maxillofac Surg**, v. 118, n. 4, p. 251-254, 2017.

ANDERSEN, S.; SKORPEN, F. Variation in the COMT gene: Implications for pain perception and pain treatment. **Pharmacogenomics**, v. 10, n. 4, p. 669-684, 2009.

ANTONIADES, C.; SHIRODARIA, C.; VAN ASSCHE, T.; CUNNINGTON, C. *et al.* GCH1 Haplotype Determines Vascular and Plasma Biopterin Availability in Coronary Artery Disease. Effects on Vascular Superoxide Production and Endothelial Function. **J Am Coll Cardiol**, v. 52, n. 2, p. 158-165, 2008.

ANTONINI, G.; DI PASQUALE, A.; CRUCCU, G.; TRUNI, A. *et al.* Magnetic resonance imaging contribution for diagnosing symptomatic neurovascular contact in classical trigeminal neuralgia: A blinded case-control study and meta-analysis. **Pain**, v. 155, n. 8, p. 1464-1471, 2014.

ARMERO, P.; MURIEL, C.; SANTOS, J.; SÁNCHEZ-MONTERO, F.J. *et al.* COMT (Val158Met) polymorphism is not associated to neuropathic pain in a Spanish population. **Eur J Pain**, v. 9, n. 3, p. 229-232, 2005.

BARBOSA, F.R.; MATSUDA, J.B.; MAZUCATO, M.; DE CASTRO FRANÇA, S. *et al.* Influence of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms in pain sensibility of Brazilian fibromyalgia patients. **Rheumatol Int**, v. 32, n. 2, p. 427-430, 2012.

BENDER, M.T.; BETTEGOWDA, C. Percutaneous Procedures for the Treatment of Trigeminal Neuralgia. **Neurosurg Clin N Am**, v. 27, n. 3, p. 277-295, 2016.

BENDSTEN, L.; ZAKRZEWSKA, J.M.; ABBOT, J.; BRASCHINSKY, M.; DI STEFANO, G. *et al.* European Academy of Neurology guideline on trigeminal neuralgia. **Eur J Neurol**, v. 26, n. 6, p. 831-849, 2019.

BICK, S.K.B.; ESKANDAR, E.N.; Surgical Treatment of Trigeminal Neuralgia. **Neurosurg Clin N Am**, v. 28, n. 3, p. 429-438, 2017.

BOOM, R.; SOL, C.J. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v.28, n.3, p.495-503. 1990.

BRAGA, F.M.; BONATELLI, A.P.; SURIANO, I.; CANTERAS, M. Familial trigeminal neuralgia. **Surg Neurol**, v. 26, p. 405-408, 1986.

BRANCHER, J.A.; SPADA, P.P.; MEGER, M.N.; FATTURRI, A.L. *et al.* The association of genetic polymorphisms in serotonin transporter and catechol-O-

methyltransferase on temporomandibular disorders and anxiety in adolescents. **J Oral Rehabil**, p. 597-604, 2019.

BURKHOLDER, D.B.; KOEHLER, P.J.; BOES, C.J. Trigeminal Neuralgia and Multiple Sclerosis: A Historical Perspective. **Can J Neurol Sci**, v. 44, n. 5, p. 589-593, 2017.

CERVERA-MARTINEZ, C.; MARTINEZ-MANRIQUE, J.J.; REVUELTA-GUTIERREZ, R. Surgical management of familial trigeminal neuralgia with different inheritance patterns: A case report. **Front Neurol**, v. 9, p. 7-10, 2018.

CHEN, H.; JI, C.X.; ZHAO, L.L.; KONG, X. *et al.* Association between polymorphisms of DRD2, COMT, DBH, and MAO-A genes and migraine susceptibility. **Med (United States)**, v. 94, n. 47, 2015.

CHEN, J.; LIPSKA, B.K.; HALIM, N.; MA, Q.D.; *et al.* Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): Effects on mrna, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. **Am J Hum Genet**, v. 75, n. 5, p. 807-821, 2004.

CHEN, J.F.; ALOYO, V.J.; WEISS, B. Continuous treatment with the D2 dopamine receptor agonist quinpirole decreases D2 dopamine receptors, D2 dopamine receptor messenger RNA and proenkephalin messenger RNA, and increases mu opioid receptors in mouse striatum. **Neuroscience**, v. 54, n. 3, p. 669-680, 1993.

CHENG, J.S.; LIM, D.A.; CHANG, E.F.; BARBARO, N.M. A review of percutaneous treatments for trigeminal neuralgia. **Neurosurgery**, v. 10, n. 1, p. 25-33, 2014.

COHEN, H.; NEUMMAN, L.; GLAZER, Y.; EBSTEIN, R.P. *et al.* The relationship between a common catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism val158met and fibromyalgia. **Clin Exp Rheumatol**, v. 27, n. 5, 2009.

COSTA, G.M.F. Análise de Polimorfismos nos Genes Codificadores dos Canais de Sódio Nav1.6 e 1.7, do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e do Receptor TRKA do Fator de Crescimento Nervoso (NGF) em pacientes com Neuralgia do Trigêmeo. 2019. 106f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

COSTA, G.M.F.; ROCHA, L.P.C.; SIQUEIRA, S.R.D.T de.; MOREIRA, P.R.; ALMEIDA-LEITE, CM. No Association of Polymorphisms in Nav1.7 or Nerve Growth Factor Receptor Genes with Trigeminal Neuralgia. **Pain Med**, v. 20, n. 7, p. 1362-1369, 2019.

CRUCCU, G. Trigeminal neuralgia. **BMJ**, p. 396-420, 2017.

CRUCCU, G.; FINNERUP, N.B.; JENSEN, T.S.; SCHOLZ, J. *et al.* Trigeminal neuralgia: New classification and diagnostic grading for practice and research. **Neurology**, v. 87, n. 2, p. 220-228, 2016.

CRUCCU, G.; GRONSETH, G.; ALKSNE, J.; ARGOFF, C. *et al.* AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management. **Eur J Neurol**, v. 15, n. 10, p. 1013-1028, 2008.

CUI, W.; YU, X.; ZHANG, H. The serotonin transporter gene polymorphism is associated with the susceptibility and the pain severity in Idiopathic Trigeminal Neuralgia patients. **J Headache Pain**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2014.

DE TOLEDO, I.P.; CONTI RÉUS, J.; FERNANDES, M.; PORPORATTI, A.L. *et al.* Prevalence of trigeminal neuralgia: A systematic review. **J Am Dent Assoc**, v. 147, n.7, p. 570-576, 2016.

DESMEULES, J.; CHABERT, J.; REBSAMEN, M.; RAPITI, E. *et al.* Central pain sensitization, COMT Val158Met polymorphism, and emotional factors in fibromyalgia. **J Pain**, v. 15, n. 2, p. 129-136, 2014..

DI STEFANO, G.; TRUINI, A. Pharmacological treatment of trigeminal neuralgia. **Expert Rev Neurother**, v. 17, n. 10, p. 1003-1011, 2017.

DI STEFANO, G.; LA CESA, S.; TRUINI, A.; CRUCCU, G. Natural history and outcome of 200 outpatients with classical trigeminal neuralgia treated with carbamazepine or oxcarbazepine in a tertiary centre for neuropathic pain. **J Headache Pain**, v. 15, n. 1, p 1-5, 2014.

DI STEFANO, G.; MARRBJERG, S.; NURMIKKO, T.; TRUINI, A.; CRUCCU, G. Triggering trigeminal neuralgia. **Cephalalgia**, v. 38, n. 6, p. 1049-1056, 2018.

DIATCHENKO, L.; FILLINGIM R.B. *et al.* The phenotypic and genetic signatures of common musculoskeletal pain conditions. **Nat Rev Rheumatol**, v.9, n.6, Jun, p.340-50. 2013.

DIATCHENKO, L.; SLADE, G.D.; NACKLEY, A.G.; BHALANG, K. *et al.* Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. **Hum Mol Genet**, v. 14, n. 1, p. 135-143, 2005.

EL OTMANI, H.; MOUTAOUAKIL, F.; FADEL, H.; SLASSI, I. Névralgie trigéminalle familiale. **Rev Neurol (Paris)**, v. 164, n. 4, p. 384-387, 2008.

ESTÉVEZ-LÓPEZ, F.; CAMILETTI-MOIRÓN, D.; APARICIO, V.A.; SEGURA-JIMENEZ, V. *et al.* Identification of candidate genes associated with fibromyalgia susceptibility in southern Spanish women: The al-Ándalus project. **J Transl Med**. V. 16, n. 1, p. 1-6, 2018.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; AMBITE-QUESADA, S.; ORTEGA-SANTIAGO, R, MARTÍNEZ-PEREZ, A. *et al.* Catechol-O-methyltransferase val158met polymorphism is associated with pain and disability, but not widespread pressure pain sensitivity, in women with carpal tunnel syndrome. **Pain Physician**, v. 15, n. 5, set-out, p. 591-600, 2013.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; AMBITE-QUESADA, S.; ORTIZ-GUTIERREZ, R.; ORTEGA-SANTIAGO, R. *et al.* Catechol-O-methyltransferase val158met polymorphism (rs4680) Is associated with pain in multiple sclerosis. **J Pain**, v. 14, n. 12, dez, p. 1719-1723, 2013.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; AMBITE-QUESADA, S.; PALACIOS-CEÑA, M.; GUILLEM-MESADO, A. *et al.* Catechol-O-Methyltransferase (COMT) rs4680 Val158Met Polymorphism is Associated With Widespread Pressure Pain Sensitivity and Depression in Women With Chronic, but not Episodic, Tension-Type Headache. **Clin J Pain**, v. 35, n. 4, p. 345-352, 2019.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; AMBITE-QUESADA, S.; RIVAS-MARTÍNES, I.; ORTEGA-SANTIAGO, R. *et al.* Genetic contribution of catechol-o-methyltransferase polymorphism (Val158Met) in children with chronic tension-type headache. **Pediatr Res**, v. 70, n. 4, p. 395-399, 2011.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; PEÑACOBAPUENTE, C.; CIGARÁN-MÉNDEZ, M.; DÍAZ-RODRÍGUEZ, L; *et al.* Has catechol-o-methyltransferase genotype (Val158Met) an influence on endocrine, sympathetic nervous and humoral immune systems in women with fibromyalgia syndrome? **Clin J Pain**, v. 30, n. 3, p. 199-204, 2014.

FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, B.; SIMONET, C.; CERDÁN, D.M.; MOROLLÓN, N. *et al.* Familial classic trigeminal neuralgia. **Neurologia**, v. 34, n. 4, p. 229-233, 2019.

GARCÍA-FRUCTUOSO, F.J.; LAO-VILLADÓNIGA, J.I.; BEYER, K.; SANTOS, C. Relación entre genotipos del gen catecol O-metiltransferasa y la gravedad de la fibromialgia. **Reumatol Clin**, v. 2, n. 4, p. 168-172, 2006.

GRAFF-RADFORD, S.; GORDON, R.; GANAL, J.; TETRADIS, S. Trigeminal Neuralgia and Facial Pain Imaging. **Curr Pain Headache Rep**, v. 19, n. 6, 2015.

GRONSETH, G.; CRUCCU, G.; ALKSNE, J.; ARGOFF, C. *et al.* Practice Parameter: The diagnostic evaluation and treatment of trigeminal neuralgia (an evidence-based review). **Neurology**, v. 71, p. 1183-1190, 2008.

GROSSMAN, M.H.; EMANUEL, B.S.; BUDARF, M.L. Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1→q11.2. **Genomics**, v. 12, n. 4, p. 822-825, 1992.

GRUBER, H.E.; SHA, W.; BROUWER, C.R.; STEUERWALD, N. *et al.* A novel catechol-o-methyltransferase variant associated with human disc degeneration. **Int J Med Sci**, v. 11, n. 7, p. 748-753, 2014..

GUPTA, V.; SINGH, A.K.; KUMAR, S.; SINHA S. Familial Trigeminal Neuralgia. **Neurol India**, v. 50, n. 1, p. 87-89, 2002.

GÜRSOY, S.; ERDAL, E.; HERKEN, H.; MADENCI, E. *et al.* Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome. **Rheumatol Int**, v. 23, n. 3, p. 104-107, 2003.

HAWKER, G.A.; MIAN, S.; KENDZERSKA, T.; FRENCH, M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF. **Arthritis Care Res**, v. 63, n. 11, p. 240-252, 2011.

HEGARTY, D.; SHORTEN, G. Multivariate prognostic modeling of persistent pain following lumbar discectomy. **Pain Physician**, v. 15, n. 5, p. 421-434, 2012.

HERZBERG, L. Familial Trigeminal Neuralgia. 5-Minute Clin Consult Stand 2016 **Twenty Fourth Ed**, 1980

HICKEY, O.T.; NUGENT, N.F.; BURKE, S.M.; HAFEEZ, P. *et al.* Persistent pain after mastectomy with reconstruction. **J Clin Anesth**, v. 23, n. 6, p. 482-488, 2011.

HU, B.; ZHANG, X.; XU, G.; ZHANG, Q. *et al.* Association between COMT Polymorphism Val158Met and Opioid Consumption in Patients with Postoperative Pain: A Meta-Analysis. **NeuroSignals**, v. 26, n. 1, p. 11-21, 2019.

HUANG, C. J.; WANG, H. *et al.* Association of estrogen receptor gene polymorphisms and primary trigeminal neuralgia. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 23, n. 6, p. 495-497, 2005.

HUGHES M.A.; FREDERICKSON, A.M.; BRANSTETTER, B.F.; ZHU, X. *et al.* MRI of the trigeminal nerve in patients with trigeminal neuralgia secondary to vascular compression. **Am J Roentgenol**, v. 206, n. 3, p. 595-600, 2016.

IBRAHIM, S. Trigeminal neuralgia: Diagnostic criteria, clinical aspects and treatment outcomes. A retrospective study. **Gerodontology**, v. 31, n. 1, p. 89-94, 2012.

IHS. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. **Cephalalgia**, v. 38, n. 1, p. 1-211, 2018.

INANIR, A.; KARAKUS, N.; ATES, O.; SEZER, S. *et al.* Clinical symptoms in fibromyalgia are associated to catechol-O-methyltransferase (COMT) gene Val158Met polymorphism. **Xenobiotica**, v. 44, n. 10, p. 952-956, 2014.

JENSEN, M.P.; KAROLY, P.; BRAVER, S. The measurement of clinical pain intensity: a comparison of six methods. **Pain**, v. 27, p. 117-126, 1986.

KALLIOMÄKI, M.L.; SANDBLOM, G.; HALLBERG, M.; GRÖNBLADH, A. *et al.* Genetic susceptibility to postherniotomy pain. The influence of polymorphisms in the Mu opioid receptor, TNF- α , GRIK3, GCH1, BDNF and CACNA2D2 genes. **Scand J Pain**, v. 12, p. 1-6, 2016.

KATUSIC, S.; BEARD, C.M.; BERGSTRALH, E.; KURLAND, L.T. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, Rochester, Minnesota, 1945–1984. **Ann Neurol**, v. 27, n. 1, p. 89-95, 1990.

KATUSIC, S.; WILLIAMNS, D.B.; BEARD, M.; BERGSTRALH, E.; KURLAND, L.T. Epidemiology and Clinical Features of Idiopathic Trigeminal Neuralgia and Glossopharyngeal Neuralgia: Similarities and Differences, Rochester, Minnesota, 1945-1984.

KES, V.B.; MATOVINA, L.Z. Accommodation to diagnosis of trigeminal neuralgia. **Acta Clin Croat**, v. 56, n. 1, p. 157-161, 2017.

KIM, S.K.; KIM, S.H.; NAH, S.S.; HYUN LEE, J. *et al.* Association of guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 gene polymorphisms with fibromyalgia syndrome in a Korean population. **J Rheumatol**, v. 40, n. 3, p. 316-322, 2013.

KISHI, T.; ICHINOSE, H.; YOSHIMURA, R.; FUKUO, Y. *et al.* GTP cyclohydrolase 1 gene haplotypes as predictors of SSRI response in Japanese patients with major depressive disorder. **J Affect Disord**, v. 142, n. 1-3, p. 315-322, 2012.

KLEEF, V.; GENDEREN, V.; NAROUZE, S.; NURMIKKO, T. *et al.* Trigeminal Neuralgia. **Princ Neurol Surg**, v. 9, n. 4, p. 745-752, 2018.

LATREMOLIERE, A.; COSTIGAN, M.; Combining Human and Rodent Genetics to Identify New Analgesics. **Neurosci Bull**, v. 34, n. 1, p. 143-155, 2018.

LEE, Y.H.; KIM, J.H.; SONG, G.G. Association between the COMT Val158Met polymorphism and fibromyalgia susceptibility and fibromyalgia impact questionnaire score: a meta-analysis. **Rheumatol Int**, v. 35, n. 1, p. 159-166, 2015.

LI, S.; LIAN, Y.J.; CHEN, Y.; ZHANG, H.F. *et al.* Therapeutic effect of Botulinum toxin-A in 88 patients with Trigeminal Neuralgia with 14-month follow-up. **J Headache Pain**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2014.

LIAO, Y.J.; JIANG, J.R.; JIN, S.Q. The association between COMT Val158Met polymorphism and migraine risk: A meta-analysis. **Cephalalgia**, v. 37, n. 6, p. 592-598, 2017.

LIGHT, K.C.; BRAGDON, E.E.; GREWEN, K.M.; BROWNLEY, K.A. *et al.* Adrenergic Dysregulation and Pain With and Without Acute Beta-blockade in Women with Fibromyalgia and Temporomandibular Disorder. **J Pain**, v. 10, n. 10, p. 542-552, 2008.

LÖTSCH, J.; BELFER, I.; KIRCHHOF, A.; MISHRA, B.K.; MAX, M.B. *et al.* Reliable screening for a pain-protective haplotype in the GTP cyclohydrolase 1 gene (GCH1) through the use of 3 or fewer single nucleotide polymorphisms. **Clin Chem**, v. 53, n. 6, p. 1010-1015, 2007.

LÖTSCH, J.; KLEPSTAD, P.; DOEHRING, A.; DALE, O. A GTP cyclohydrolase 1 genetic variant delays cancer pain. **Pain**, v.148, n. 1, p. 103-106, 2010.

LUCENTEFORTE, E.; VANNACI, A.; CRESCIOLI, G.; LOMBARDI, N. *et al.* Opioid response in paediatric cancer patients and the Val158Met polymorphism of the

human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene: An Italian study on 87 cancer children and a systematic review. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2019.

MAARBJERG, S.; DI STEFANO, G.; BENDTSEN, L.; CRUCCU, G. Trigeminal neuralgia - Diagnosis and treatment. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 648-657, 2017.

MAARBJERG, S.; GOZALOV, A.; OLESEN, J.; BENDTSEN, L. Concomitant persistent pain in classical trigeminal neuralgia - Evidence for different subtypes. **Headache**, v. 54, n. 7, jul-ago, p. 1173-1183, 2014.

MAARBJERG, S.; GOZALOV, A.; OLESEN, J.; BENDTSEN, L. Trigeminal neuralgia-a prospective systematic study of clinical characteristics in 158 patients. **Headache**, v. 54, n. 10, nov-dez, p. 1574-1582, 2014.

MARCHETTI, M.; PINZI, V.; DE MARTIN, E.; GHIELMETTI, F. *et al.* Radiosurgery for trigeminal neuralgia: the state of art. **Neurol Sci**, v. 40, p. 153-157, 2019.

MARTÍNEZ-JAUAND, M.; SITGES, C.; RODRÍGUEZ, V.; PICORNELL, A. *et al.* Pain sensitivity in fibromyalgia is associated with catechol-O- methyltransferase (COMT) gene. **Eur J Pain (United Kingdom)**, v. 17, n. 1, p. 16-27, 2013.

MATSUDA, J.B.; BARBOSA, F.R.; MOREL, L.J.F.; FRANÇA, C. *et al.* Polimorfismos dos genes do receptor de serotonina (5-HT_{2A}) e da catecol-O-metiltransferase (COMT): fatores desencadeantes da fibromialgia? **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 2, p. 141-145, 2010.

MELOTO, C.B.; BORTSOV, A.V.; BAIR, E.; HELGESON, E. *et al.* Modification of COMT-dependent pain sensitivity by psychological stress and sex. **Pain**, v. 157, n. 4, p.858-867, 2016.

MENDLIK, M.T.; URITSKY, T.J. Treatment of Neuropathic Pain. **Curr Treat Options Neurol**, v. 17, n. 12, 2015.

MENG, F.; PENG, K.; YANG, J.P.; JI F.H. *et al.* Botulinum toxin-A for the treatment of neuralgia: A systematic review and meta-analysis. **J Pain Res**, v. 11, p. 2343-2351, 2018.

MICHELOTTI, A.; LIGUORI, R.; TORRIELO, M.; D'ANTO, V. *et al.* Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Gene Polymorphisms as Risk Factor in Temporomandibular Disorders Patients From Southern Italy. **Clin J Pain**, v. 30, n. 2, p. 129-133, 2014.

MLADENOVIC, I.; SUPIC, G.; KOZOMARA, R.; DODIC, S. *et al.* Genetic Polymorphisms of Catechol-O-Methyltransferase: Association with Temporomandibular Disorders and Postoperative Pain. **J Oral Facial Pain Headache**, v. 30, n. 4, p. 302-310, 2016.

MONTANO, N.; CONFORTI, G.; DI BONAVENTURA, R.; MEGLIO, M. *et al.* Advances in diagnosis and treatment of trigeminal neuralgia. **Ther Clin Risk Manag**, v. 11, p. 289-299, 2015.

MONTERO, A.; CARNERERO, C.I. Actualización en el manejo de la neuralgia del trigémino. **Semergen**, v. 42, n. 4, p. 244-253, 2016.

MOONEY, S. Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis. **Brief Bioinform**, v. 6, n. 1, p. 44-56, 2005.

MORRA, M.E.; ELGEBALY, A.; ELMARAEZY, A.; KHALIL, A.M. *et al.* Therapeutic efficacy and safety of Botulinum Toxin A Therapy in Trigeminal Neuralgia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Headache Pain**, v. 17, n. 1, 2016.

NACKLEY, A.G.; TAN, K.S.; FECHO, K. FLOOD, P. *et al.* Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both β 2- and β 3-adrenergic receptors. **Pain**, v. 128, n. 3, p. 199-208, 2007.

NASSER, A.; MØLEER, L.B. GCH1 variants, tetrahydrobiopterin and their effects on pain sensitivity. **Scand J Pain**, v. 5, n. 2. p. 121-128, 2014.

NAYLOR, A.M.; POJASEK, K.R.; HOPKINS, A.L.; BLAGG, J. The tetrahydrobiopterin pathway and pain. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 11, n. 1, p. 19-30, 2010.

NOORANI, I.; LODGE, A.; VAJRAMANI, G.; SPARROW, O. Comparing percutaneous treatments of trigeminal neuralgia: 19 years of experience in a single centre. **Stereotact Funct Neurosur**, v. 94, n. 2, p. 75-85, 2016.

PANCHAGNULA, S.; SULARZ, A.K.; KAHLE, K.T. Familial Trigeminal Neuralgia Cases Implicate Genetic Factors in Disease Pathogenesis. **Jama Neurol**, v. 76, n. 1, p. 9-10, 2019.

PATEL, S.K.; LIU, J.K. Overview and History of Trigeminal Neuralgia. **Neurosurg Clin N Am**, v. 27, n. 3, p. 265-276, 2016.

PEARCE, J.M.S. Historical note. **Good Society**, v. 25, p. 136-137, 2016.

PEKER, S.; DINÇER, A.; NECMETTIN P.M. Vascular compression of the trigeminal nerve is a frequent finding in asymptomatic individuals: 3-T MR imaging of 200 trigeminal nerves using 3D CISS sequences. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 151, n. 9, p. 1081-1088, 2009.

PICKERT, G.; MYRCZEK, T.; RÜCKERT, S.; Weigert WEIGERT, A. *et al.* Inhibition of GTP cyclohydrolase reduces cancer pain in mice and enhances analgesic effects of morphine. **J Mol Med**, v. 90, n. 12, p. 1473-1486, 2012.

POTVIN, S.; LAROUCHE, A.; NORMAND, E.; DE SOUZA, J.B. *et al.* DRD3 Ser9Gly Polymorphism Is Related to Thermal Pain Perception and Modulation in Chronic Widespread Pain Patients and Healthy Controls. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 969-975, 2009.

RAKVAG, T.T.; KLEPSTAD, P.; BAAR, C.; KVAM, T.M. *et al.* The val158met polymorphism of the human catechol-o-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer patients. **Pain**, v. 116, n. 1-2, p. 73-78, 2005.

RAKVAG, T.T.; ROSS, J.R.; SATO, H.; SKORPEN, F. *et al.* Genetic variation in the Catechol-O-Methyltransferase (COMT) gene and morphine requirements in cancer patients with pain. **Mol Pain**, v. 4, p. 1-12, 2008.

REDDY, G.D.; VISWANATHAN, A. Trigeminal and glossopharyngeal neuralgia. **Neurol Clin**, v. 32, n. 2, p. 539-552, 2014.

REN, X.; ZHANG, L.; XIAO, Q.; HUANG, D. *et al.* Association between COMT polymorphism, labor anxiety, and analgesia in pregnant women. **J Pain Res**. 2019;12:779–85.

REYES-GIBBY, C.C.; SHETE, S.; RAKVAG, T.; BHAT S.V. *et al.* Exploring joint effects of genes and the clinical efficacy of morphine for cancer pain: OPRM1 and COMT gene. **Pain**, v. 130, n. 1-2, p. 25-30, 2007.

SAVICA, R.; LAGANÀ, A.; SIRACUSANO, R.; CALABRÒ, R.S. *et al.* Idiopathic familial trigeminal neuralgia: A case report. **Neurol Sci**. V. 28, n. 4, p. 196-198, 2007.

SCRIVANI, S.J.; MATHEWS, E.S.; MACIEWICZ, R.J. Trigeminal neuralgia. Oral Surgery, **Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology**, v. 100, n. 5, p. 527-538, 2005.

SEGAWA, M.; NOMURA, Y.; HAYASHI, M. Dopa-responsive dystonia is caused by particular impairment of nigrostriatal dopamine neurons different from those involved in Parkinson disease: Evidence observed in studies on segawa disease. **Neuropediatrics**, v. 44, n. 2, p. 61-66, 2013.

SIMMS, H.N.; HONEY, C.R. The importance of autonomic symptoms in trigeminal neuralgia: Clinical article. **J Neurosurg**, v. 115, v. 2, p. 210-216, 2011.

SMITH, S.B.; REENILÄ, I.; MÄNNISTÖ, P.T.; SLADE, G.D. *et al.* Epistasis between polymorphisms in COMT, ESR1, and GCH1 influences COMT enzyme activity and pain. **Pain**, v. 155, n. 11, p. 2390-2399, 2014.

SOLARO, C.; UCCELLI, M. Management of pain in multiple sclerosis: A pharmacological approach. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 9, p. 519-527, 2011.

SPINA, A.; MORTINI, P.; ALEMMANO, F.; HOUDAYER, E. *et al.* Trigeminal Neuralgia: Toward a Multimodal Approach. **World Neurosurg**, v.103, p. 220-230, 2017.

STEIN, D.J.; NEWMAN, T.K.; SAVITZ, J.; RAMESAR, R. Warriors versus worriers: The role of COMT gene variants. **CNS Spectr**, v. 11, n. 10, p. 745-748 2006.

STEINER, H.; GERFEN, C.R. Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. **Exp Brain Res**. v. 123, n. 1-2, p. 60-76 1998.

TAI, A.X.; NAYAR, V.V. Update on Trigeminal Neuralgia. **Curr Treat Options Neurol.** V. 21, n. 9, 2019.

TAKIGAWA, H.; KOWA, H.; NAKASHIAM, K. No associations between five polymorphisms in COMT gene and migraine. **Acta Neurol Scand**, v. 135, n. 2, p. 225-230, 2017.

TAMMIMÄKI, A.; MÄNNISTÖ, P.T. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and chronic human pain: A systematic review and meta-analysis. **Pharmacogenet Genomics**, v. 22, n. 9, p. 673-691, 2012.

TANAKA, B.S.; ZHAO, P.; DIB-HAJJ, F.B.; MORISSET, V. *et al.* A gain-of-function mutation in Nav1.6 in a case of trigeminal neuralgia. **Mol Med**, v. 22, n. 13, p. 338-348, 2016.

TANDER, B.; GUNES, S.; BOKE, O.; ALAYLI, G *et al.* Polymorphisms of the serotonin-2A receptor and catechol-O-methyltransferase genes: A study on fibromyalgia susceptibility. **Rheumatol Int**, v. 28, n. 7, p. 685-691, 2008.

TEGEDER, I.; COSTIGAN, M.; GRIFFIN, R.S.; ABELE, A. *et al.* GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. **Nat Med**, v. 12, n. 11, p. 1269-1277, 2006.

THÖNY, B.; AUERBACH, G.; BLAU, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. **Biochem J**, v. 347, n. 1, p. 1-16, 2000.

TULEASCA, C.; RÉGIS, J.; SAHGAL, A.; DE SALLES, A. *et al.* Stereotactic radiosurgery for trigeminal neuralgia: A systematic review. **J Neurosurg**, v. 130, n. 3, p. 733-753, 2019.

VARGAS-ALARCÓN, G.; FRAGOSO, J.M.; CRUZ-ROBLES, D.; VARGAS, A. *et al.* Catechol-O-methyltransferase gene haplotypes in Mexican and Spanish patients with fibromyalgia. **Arthritis Res Ther**, v.9, n.5, p. 1-7, 2007.

VELUCHAMY, A.; HÉBERT, H.L.; MENG, W.; PALMER, C.N.A. *et al.* Systematic review and meta-analysis of genetic risk factors for neuropathic pain. **Pain**, v. 159, p. 825-848, 2018.

WADLEY, A.L.; LOMBARD, Z.; CHERRY, C.L.; PRICE, P. *et al.* Analysis of a previously identified “pain-protective” haplotype and individual polymorphisms in the GCH1 gene in Africans with HIV-associated sensory neuropathy: A genetic association study. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 60, n. 1, p. 20-23, 2012.

XU, J.; UMLAUF, A.; LETENDRE, S.; FRANKLIN, D.; BUSH, W.S. *et al.* Catechol-O-methyltransferase polymorphism Val158Met is associated with distal neuropathic pain in HIV-associated sensory neuropathy. **Aids**, v. 33, n. 10, p. 1575-1582, 2019.

ZAKRZEWSKA, J.M.; LINSKEY, M.E. Trigeminal neuralgia. **BMJ**, v. 350, p. 10-12, 2015.

ZAKRZEWSKA, J.M.; MCMILLAN, R. Trigeminal neuralgia: The diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain. **Postgrad Med J**, v. 87, n. 1028, p. 410-416, 2011.

ZHANG, L.; RAO, F.; ZHANG, K.; KHANDRIKA, S.; DAS, M. *et al.* Discovery of common human genetic variants of GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) governing nitric oxide, autonomic activity, and cardiovascular risk. **J Clin Invest**, v.117, n.9, p.2658–71, 2007.

ZORINA-LICHTENWALKER, K.; MELOTO, C.B.; KHOURY, S.; DIATCHENKO, L. Genetic predictors of human chronic pain conditions. **Neuroscience**, v. 338, p. 36–62, 2016.

ZUBIETA, J.K.; HEITZEG, M.M.; SMITH, Y.R.; BUELLER, J.A. *et al.* COMT val158met genotype affects um-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. **Science**, v. 299, p. 1240-1243, 2003.

ANEXOS

ANEXO 01 – Parecer do COEP/UFMG

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DORES OROFACIAIS: CORRELAÇÃO ENTRE DOR, DOSAGEM SÉRICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E FATORES NEUROTRÓFICOS E POLIMORFISMOS DE GENES CODIFICADORES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS, FATORES NEUROTRÓFICOS E RECEPTORES, MOLÉCULAS DAS VIAS ADRENÉRGICA E SEROTONINÉRGICA, CANAIS IONICOS.

Pesquisador: Camila Megale de Almeida Leite

Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise por parte da CONEP;)

Versão: 3

CAAE: 42098115.7.1001.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO / FINANCIAMENTO PRÓPRIO / MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.006.624

Apresentação do Projeto:

Conforme pareceres 1.033.572 e 1.829.504 (E1) Trata-se de estudo transversal do tipo caso-controle. Locais de recrutamento e realização dos procedimentos: - Ambulatório de Dor Orofacial e Disfunção Temporomandibular do Centro de Especialização e Treinamento da Odontologia (CETRO) - Ambulatório de Dor Orofacial da Clínica de Dor do Hospital das Clínicas da UFMG, em Belo Horizonte/MG. Segundo os pesquisadores, a dor orofacial refere-se à dor associada aos tecidos moles e mineralizados da cabeça, face pescoço e pode ser definida como disfunção e dor que afeta a transmissão sensitiva e motora do sistema nervoso trigeminal. De um modo geral, as dores orofaciais acometem de 12 a 22% da população mundial e são classificadas como dores somáticas ou neuropáticas. As dores neuropáticas estão entre as dores crônicas de maior intensidade, enquanto as dores somáticas de origem músculo-esqueléticas estão entre as mais prevalentes. A nevralgia do trigêmeo (NT) é uma das dores neuropáticas mais comuns e apresenta uma incidência de 4,3 casos para cada 100 mil habitantes, sendo que 45% dos pacientes relatam dor na região maxilar. Paralelamente à NT, as dores orofaciais de origem músculo-esquelética resultantes de disfunções temporomandibulares (DTMs) estão entre as dores somáticas mais frequentes. A sensibilização central tem um papel importante na fisiopatologia das dores crônicas, como a NT e as DTMs. As alterações no processamento da dor no SNC podem estar associadas a alguns genes específicos. A manifestação da dor em determinado momento é uma combinação de fatores endógenos e exógenos. Tanto fatores genéticos quanto ambientais contribuem e interagem de maneira significativa para gerar os complexos quadros de dor. Esses fatores, associados a biomarcadores para determinadas condições dolorosas, poderiam ser extremamente benéficos na determinação das condutas terapêuticas para prevenir ou reduzir a neuroplasticidade subjacente à dor crônica. Uma lacuna importante, segundo os investigadores, a ser explorada é a presença de características hereditárias que tornam um indivíduo mais susceptível a desenvolver sensibilização central, hipersensibilidade à dor e cronificação. Múltiplos fatores de risco genéticos contribuem para as variações individuais no estresse psicológico e na sensibilidade à dor. As variações alélicas funcionais, comuns ou raras, medeiam a expressão genética e ativam vias

biológicas associadas que levam à manifestação de determinados endofenótipos. Assim, este trabalho visa avaliar a associação entre sinais e sintomas da NT e de DTMs a níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos e a polimorfismos de importantes das vias adrenérgica e serotoninérgica, canais iônicos, estrógeno e seus receptores em amostra de população brasileira. Os pacientes serão submetidos a entrevistas, questionários e procedimentos incluindo os seguintes: - Questionário Douleur Neuropathique 4 (DN4) para diferenciar a dor neuropática da dor nociceptiva, RDC/TMD (Critérios de Diagnóstico para Pesquisa das Desordens Temporomandibulares), Questionário de McGill para avaliar as dimensões sensorial, afetiva e quantitativa da dor, Questionário de qualidade de vida Oral Health Impact Profile (OHIP) 49, Índice de disfunção clínica craniomandibular (IDCCM – Índice de Helkimo e Índice de Limitação Funcional Mandibular versão reduzida (MFIQ –r) que classificam a severidade dos sinais e sintomas de DTM, Escala de Incapacidade de Dor Orofacial de Manchester que avalia o impacto das condições dolorosas orofaciais e a Escala Visual Analógica (EVA) para aferir a intensidade da dor. Todos os instrumentos estão validados para a língua portuguesa. - Coleta de Sangue periférico para mensuração das concentrações dos marcadores inflamatórios no soro por ensaio imunoenzimático (mediadores inflamatórios e de fatores neurotróficos). - Coleta de amostras de raspado da mucosa jugal dos pacientes serão coletadas com espátula plástica estéril e armazenadas em solução tampão (Krebs), para extração de DNA. - Exame Físico. Critérios de inclusão: - Diagnóstico de uma das seguintes doenças: neuralgia trigeminal ou DTM (articular ou muscular); idade entre 18 e 70 anos; TCLE. Critérios de exclusão: ser incapaz de compreender e/ou realizar algum procedimento; apresentar diagnóstico de outra dor neuropática, doenças neurodegenerativas como esclerose genética codificadores de mediadores inflamatórios, fatores neurotróficos e seus receptores, moléculas múltipla, doença poliartrítica, doenças musculares sistêmicas ou tumores na região de cabeça e pescoço. Número total de participantes proposto = 250 voluntários distribuídos da seguinte forma: - Grupo Neuralgia trigeminal: avaliações através de instrumentos de medida pertinentes, exame clínico, coleta de sangue e de raspado da mucosa oral no momento das avaliações. N= 50 participantes; - Grupo DTM : avaliações pelos instrumentos de medida pertinentes, exame clínico, coleta de sangue e de raspado da mucosa oral no momento das avaliações. N = 100 participantes; - Grupo Controle: avaliações pelos instrumentos de medida pertinentes, exame clínico, coleta de sangue e de raspado da mucosa oral no momento das avaliações. N = 100 participantes. Início : 2015. Término: 2017 (nova proposta de término em 2020).

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese: A presença de diagnóstico de neuralgia trigeminal ou de disfunção temporomandibular, assim com seus sinais e sintomas, estão associados a diferenças em relação a controles em dosagens séricas de mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos e em polimorfismos de genes codificadores de citocinas, fatores neurotróficos e receptores, moléculas das vias adrenérgica e serotoninérgica, canais iônicos, estrógeno e receptores em amostra de população brasileira.

Objetivo Primário: Avaliar a associação entre diagnóstico de neuralgia trigeminal ou disfunção temporomandibular, assim como seus sinais e sintomas, a dosagens séricas de mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos e a polimorfismos de genes codificadores de mediadores inflamatórios, fatores neurotróficos e seus receptores, moléculas importantes das vias adrenérgica e serotoninérgica, canais iônicos, estrógeno e seus receptores em amostra de população brasileira.

Objetivo Secundário: - Avaliar e diagnosticar pacientes com neuralgia trigeminal segundo critérios diagnósticos da International Headache Society (IHS) e da International Association for the Study of Pain (IASP), caracterizando a dor neuropática através do questionário Douleur Neuropathique 4 (DN4);

- Avaliar e diagnosticar pacientes com DTM utilizando o protocolo de Critérios de Diagnóstico para Pesquisa das Desordens Temporomandibulares (RDC/TMD);

- Avaliar, em pacientes com neuralgia trigeminal ou DTM, a sintomatologia dolorosa, através dos questionários de McGill, Escala Visual Analógica (EVA) e Escala de Incapacidade de Dor Orofacial de Manchester;

- Avaliar, em pacientes com neuralgia trigeminal ou DTM, a qualidade de vida através do questionário Oral Health Impact Profile (OHIP) 49;
- Avaliar, nos pacientes com DTM, a severidade dos sinais clínicos e a funcionalidade mandibular através do Índice de Disfunção Clínica Craniomandibular e Índice de Limitação Funcional Mandibular (versão reduzida);
- Analisar, nos dois grupos de pacientes, a dosagem sérica de mediadores inflamatórios e de fatores neurotróficos;
- Analisar, nos dois grupos de pacientes, as principais fontes produtoras de mediadores inflamatórios dentre as populações de células mononucleares do sangue periférico;
- Analisar, nos dois grupos de pacientes, polimorfismos de genes codificadores de citocinas, fatores neurotróficos e receptores, moléculas das vias adrenérgica e serotoninérgica, canais iônicos, estrógeno e receptores;
- Correlacionar as dosagens séricas e os polimorfismos à presença das doenças, aos sinais e sintomas clínicos detectados e à qualidade de vida dos pacientes com neuralgia trigeminal ou DTM.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os autores:

Riscos: Os riscos referem-se apenas à coleta de sangue, já que o procedimento clínico para coleta de DNA é não invasivo e consiste de raspado da mucosa jugal dos pacientes com uma espátula plástica estéril. Com relação à coleta de sangue, os riscos envolvem, principalmente, mal estar e ansiedade por parte dos pacientes. Para evitar isso, a coleta de sangue será realizada por técnica em enfermagem experiente e com formação em coleta de sangue a vácuo, seguindo-se todas as normas de biossegurança. Caso ocorra alguma intercorrência, será acionado o serviço de emergência.

Benefícios: O estudo oferece benefícios em relação à identificação de mediadores químicos e marcadores genéticos que poderão contribuir para o diagnóstico, tratamento e prognóstico da neuralgia trigeminal e das DTMs. Além disso, contribuirá para o entendimento de novos mecanismos das vias de dor com possibilidades de descoberta de novos alvos terapêuticos com claras repercussões para tratamento personalizado da dor, diagnóstico precoce e a prevenção da cronificação de condições de dor aguda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante na área de neurologia. O projeto está bem descrito. Contém ampla revisão de literatura e o método está bem detalhado.

Já houve uma emenda, com justificativa de inclusão de instituição coparticipante (Faculdade de Medicina da USP, por meio de seu Departamento de Neurologia), com objetivo ampliar a amostra de pacientes com neuralgia trigeminal para que se atinja o número proposto (50), o que é essencial para obtenção de resultados satisfatórios e cientificamente relevantes.

Justificativa da atual emenda:

Parte do atual projeto será realizada por um aluno de mestrado que ingressou em fev/2018. Sendo assim, este projeto precisa ser prorrogado até março de 2020 para contemplar a realização de todas as etapas durante o mestrado do referido aluno. As únicas alterações feitas nesta emenda foram no cronograma de execução.

A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética

das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados:

- Projeto de pesquisa detalhado
- TCLE, em formato de convite
- Folha de Rosto assinada pelo vice-diretor do ICB - UFMG
- Anuência do CETRO/ Odontologia - UFMG
- Anuência do HC/ Clínica de Dor - UFMG
- Parecer consubstanciado do departamento de Morfologia - ICB - UFMG
- Declaração da DEPE - Orçamento: financiamento próprio
- Cronograma
- Termos de compromisso dos pesquisadores
- Informações Básicas do Projeto
- Parecer Consubstanciado do CEP
- Parecer consubstanciado CEP Emenda 1
- Declaração/anuência USP

Recomendações:

Recomenda-se, no TCLE: informar que o CEP deve ser contactado para dirimir dúvidas éticas, e não quaisquer dúvidas; substituir o termo "cópia" por via; inserir campo de rubricas; numerar as páginas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis pela aprovação da emenda ao projeto de pesquisa sob responsabilidade da pesquisadora Camila Megale de Almeida Leite, intitulado: Dores orofaciais: correlação entre dor, dosagem sérica de mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos e polimorfismos de genes codificadores de mediadores inflamatórios, fatores neurotróficos e receptores, moléculas das vias adrenérgica e serotoninérgica, canais iônicos, estrógeno e receptores. Pela presente emenda, prorroga-se o cronograma de execução da pesquisa até março de 2020.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_123972_8_E2.pdf	16/10/2018 08:50:38		Aceito

Outros	420981157parece.pdf	22/11/2016 11:33:01	Eliane Cristina de Freitas Rocha	Aceito
Outros	420981157emenda.pdf	22/11/2016 11:32:12	Eliane Cristina de Freitas Rocha	Aceito
Outros	DeclaracaoUSP.pdf	25/10/2016 17:10:24	Camila Megale de Almeida Leite	Aceito
Outros	Declaração HC DEPE proj DOF.pdf	24/02/2015 09:26:27		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto projeto DOF DTM.pdf	09/02/2015 14:49:23		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/02/2015 14:48:49		Aceito
Outros	Autorização CETRO.pdf	09/02/2015 13:46:47		Aceito
Outros	Termo de compromisso - Renata.pdf	24/12/2014 10:42:16		Aceito
Outros	Parecer2 - DOF.pdf	23/12/2014 12:42:27		Aceito
Outros	Parecer1 - DOF.pdf	23/12/2014 12:41:43		Aceito
Outros	Termo de compromisso - Eduardo.pdf	23/12/2014 12:37:50		Aceito
Outros	Termo de compromisso Grazielle.pdf	17/12/2014 12:40:37		Aceito
Outros	Termo de compromisso - Roberta.pdf	17/12/2014 12:39:31		Aceito
Outros	Termo de compromisso - Paula.pdf	17/12/2014 12:38:05		Aceito
Outros	Termo de compromisso - Camila.pdf	17/12/2014 12:37:35		Aceito
Outros	Autorização HC.pdf	15/12/2014 09:39:29		Aceito
Outros	Termo de compromisso - Roberto Pedras.pdf	15/12/2014 08:38:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Projeto DOF.pdf	10/12/2014 18:43:51		Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

BELO HORIZONTE, 07 de Novembro de 2018

Assinado por:

Eliane Cristina de Freitas Rocha (Coordenador(a))

ANEXO 02 – Artigo Submetido

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Pain Medicine

POLYMORPHISMS OF NAV1.6 SODIUM CHANNEL, BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR, CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE AND GUANOSINE TRIPHOSPHATE CYCLOHYDROLASE 1 GENES IN TRIGEMINAL NEURALGIA

Journal:	<i>Pain Medicine</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Romero , João Gabriel ; Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Costa, Grazielle; Universidade Federal de Minas Gerais Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia Rocha, Luis ; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas, Departamento de Morfologia Siqueira, Silvia; University of São Paulo, Escola de Artes, Ciências e humanidades; Hospital das Clinicas, University of São Paulo, Orofacial Pain Team, Medical school Moreira, Paula; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas, Departamento de Morphologia Almeida-Leite, Camila; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas, Departamento de Morfologia; Universidade Federal de Minas Gerais Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia
Keywords:	Trigeminal Neuralgia, Single Nucleotide Polymorphism, BDNF, Sodium Channel, COMT, GCH1

SCHOLARONE™
Manuscripts

TITLE:

POLYMORPHISMS OF NAV1.6 SODIUM CHANNEL, BRAIN-DERIVED
NEUROTROPHIC FACTOR, CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE AND
GUANOSINE TRIPHOSPHATE CYCLOHYDROLASE 1 GENES IN TRIGEMINAL
NEURALGIA

AUTHORS AND AFFILIATIONS:

João Gabriel de Azevedo José Romero^{1#}, Grazielle Mara Ferreira Costa^{1#}, Luiz Paulo C.
Rocha²; Silvia Regina Dowgan Tesseroli de Siqueira³, Paula Rocha Moreira⁴, Camila
Megale Almeida-Leite^{1,4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade
Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; ²Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG, Belo
Horizonte, MG, Brazil; ³Ph.D., Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, São
Paulo, SP, Brazil; ⁴Ph.D., Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte,
MG, Brazil.

[#]Both authors contributed equally to this work.

*Corresponding author:

Camila Megale Almeida-Leite

Laboratório de neurobiologia Conceição Machado / O3-245

Departamento de Morfologia

Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - 31290-701

Belo Horizonte/MG - Brazil

Telephone: 55-31-34093028

Fax: 55-31-34092772

E-mail: camila@icb.ufmg.br

This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ABSTRACT

Subjects: Trigeminal neuralgia is a neuropathic pain characterized by episodes of severe shock-like pain within the distribution of one or more divisions of the trigeminal nerve. Pain can be influenced by ethnicity, environment, gender, emotion and psychological traits, and genetics. Molecules Nav1.6 sodium channel, Brain-derived Neurotrophic Factor, Catechol-O-methyltransferase and Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase 1 have been involved in mechanisms that underlie pain and neurological conditions. **Objective:** The aim of this study was to investigate the occurrence of genetic polymorphisms in Nav1.6 sodium channel (SCN8A /rs303810), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF/rs6265/Val66Met), Catechol-O-methyltransferase (COMT/rs4680/Val158Met), and Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase 1 (GCH1/rs8007267) genes in trigeminal neuralgia patients. **Methods:** Ninety-six subjects were divided into two groups: 48 with trigeminal neuralgia diagnosis and 48 controls. Pain was evaluated by visual analog scale and McGill Pain Questionnaire. Genomic DNA was obtained from oral swabs and analyzed by real-time polymerase chain reaction. **Results:** No association was observed among Nav1.6, BDNF, COMT or GCH1 polymorphisms and the presence of trigeminal neuralgia. Genotype distribution and allele frequencies did not correlate to pain severity. **Conclusions:** Although no association of evaluated polymorphisms and trigeminal neuralgia or pain was observed, our data contributes to the knowledge of genetic susceptibility to trigeminal neuralgia, which is very scarce. Further studies may focus on other polymorphisms and mutations, as well as on epigenetics and transcriptional regulation of these genes, in order to clarify or definitively exclude the role of Nav1.6, BDNF, COMT or GCH1 in trigeminal neuralgia susceptibility and pathophysiology.

KEYWORDS: Trigeminal Neuralgia, Single Nucleotide Polymorphism, BDNF, Sodium Channel, COMT, GCH1

INTRODUCTION

Trigeminal neuralgia (TN) is a paroxysmic neuropathic pain characterized by episodes of severe shock-like pain within the distribution of one or more divisions of the V cranial (trigeminal) nerve (1, 2). Its annual incidence is 3-5/100.000 (3) and women are mostly committed (4). Clinical treatment includes anticonvulsivant drugs such as carbamazepine or oxycarbazepine and surgical treatment is usually indicated for patients with proven neurovascular compression or without satisfactory response to pharmacotherapy (2, 5, 6).

Pain is described as "an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage" (7). It can be influenced by ethnicity, environment, gender, emotion, psychological traits, and genetic features (8, 9). In the last years, a robust amount of evidence showed that genetics are related to susceptibility to pain and to distinct thresholds to nociceptive stimulus (10, 11).

There are only a few studies on TN and genetic factors. In Chinese population, it has been shown that a genetic polymorphism in the estrogen receptor alpha (ESR1) gene leads to a greater risk of developing TN (12) and that a serotonin transporter gene polymorphism is associated with susceptibility and pain in TN patients (13). More recently, a gain-of-function mutation in Nav1.6 sodium channel has been identified in a TN patient (14). Our group has investigated the occurrence of Nav1.7 sodium channel and nerve growth factor receptor TrkA gene polymorphisms (SCN9A/rs6746030, NTRK1/rs633, respectively) in trigeminal neuralgia patients. No association was

observed between evaluated polymorphisms and TN (15), but distinct genetic polymorphisms that may contribute to susceptibility to TN should be further studied. Here, we investigated four single nucleotide polymorphisms (SNP) in TN patients: Nav1.6 sodium channel (SCN8A /rs303810), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF/rs6265/Val66Met), Catechol-O-methyltransferase (COMT/rs4680/Val158Met), and Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase 1 (GCH1/rs8007267).

Sodium channels are essential in transmission of nociceptive signals and alteration in their expression can lead to neuropathic pain (16). Anesthesia and other drugs used in treatment of neuropathic pain such as carbamazepine act through blockade of sodium (6), which highlights their roles in nociception (16). Nav1.6 sodium channel is expressed both in excitatory and inhibitory neurons (17), has been implicated in pain (14, 18) and in ectopic discharge in many types of neurons, including the ones in trigeminal ganglion (19, 20). Nav1.6 is encoded by gene SCN8A, which is located in chromosome 12 (21), and mutations in this gene have been associated to some nervous system disorders (22, 23). As mentioned, a gain-of-function mutation in SCN8A has been identified in TN (14). The SNP rs303810 involves the replacement of an adenine by a guanine in an intron region of SCN8A (21) and a greater frequency of polymorphic G allele has been associated to bipolar disorder in Chinese population (23).

BDNF is the most abundant neurotrophic factor in peripheral and central nervous system (24) and is implicated in nociceptive pathways and pain modulation (25). Moreover, it is expressed in trigeminal neurons, where it contributes to their synapse plasticity (26) and has an important role in migraine (27). BDNF gene is present in chromosome 11 and SNP rs6265/Val66Met leads to a Met substitution for Val at codon 66 (28) with reduced secretion of BDNF and altered BDNF signaling (29). This

polymorphism is frequent in Caucasian population (30) and has been associated to trigeminal pain (31).

COMT gene is located on chromosome 22 (32), and is present in several tissues such as brain, kidney, liver and lungs (33). Its activity is characterized by the methylation of catecholamines (34), such as dopamine, norepinephrine and epinephrine, key mediators in pain pathways (35, 36). Several polymorphisms were identified and SNP rs4680 is characterized by replacement of Val for Met at codon 158, with decreased enzyme's thermal stability (37). Some studies show that reduced enzymatic activity may be associated with increased pain intensity, sensitivity to pain (38, 39), and risk of developing chronic pain (40). SNP rs4680 has been related to higher susceptibility to fibromyalgia (38, 39), and temporomandibular disorder (41).

GCH1 is responsible for catalyzing and limiting synthesis of tetrahydrobiopterin (BH4), an essential cofactor for several enzymes. Therefore, bioavailability of BH4 modulates production of catecholamines and nitric oxide (42, 43) and greater BH4 synthesis is associated with increased pain sensitivity (44). The GCH1 gene is located on chromosome 14 (45) and some polymorphisms have been related to its decreased function (44, 46). A haplotype of three polymorphisms, including rs8007267, that leads to the replacement of cytosine for thymine (47, 48), is associated to lower BH4 concentration and pain protection against susceptibility and pain sensitivity in fibromyalgia (49) and postoperative pain (50).

Based on the fact that sodium channels, BDNF, COMT and GCH1 play important roles in pain signaling and polymorphisms can influence nociception in a variety of pain conditions, we aimed to investigate the association between SNPs in Nav1.6 sodium ion channel (SCN8A), BDNF, COMT and GCH1 genes and TN in a sample of Brazilian individuals.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Nine six subjects of both sexes were included in this study and divided into two groups: 48 diagnosed with TN and 48 age-matched controls. Subjects were recruited from Pain Specialty Centers or community in southeastern region of Brazil (Belo Horizonte/MG and São Paulo/SP). Inclusion criteria were TN diagnosis and age over 18 years old.

Exclusion criteria were diagnosis of other neuropathic pain, neurological disorder (i.e. multiple sclerosis) or cognitive dysfunction (i.e., dementia or delirium), and use of corticosteroid or anti-inflammatory drugs four weeks prior to the examination.

Complete neurological examination was performed in all TN patients and diagnosis was established according to International Classification of Headache Disorders (ICHD-3) of the International Headache Society (IHS) (51), as following: recurrent paroxysms of unilateral facial pain in the distribution(s) of one or more branches of the trigeminal nerve, with no radiation beyond trigeminal distribution, and fulfilling the following criteria: A. Pain has all of the following characteristics: lasts from a fraction of a second to 2 minutes, severe intensity, electric shock-like, shooting, stabbing or sharp in quality; B. Precipitated by innocuous stimuli within the affected trigeminal distribution; C. Not better accounted for by another ICHD-3 diagnosis. Patients with TN caused by an underlying disease (secondary TN) were not included in the study. This study was approved by the Ethical Board of Universidade Federal de Minas Gerais/Brazil (CAAE 42098115.7.0000.5149), and patients have provided written informed consent. All procedures were performed in accordance with the ethical standards of institutional and/or national research committee and the principles stated in the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

Evaluation of pain

For pain intensity, visual analog scale (VAS) from 0 = "no pain" to 10 = "worst pain possible" was used (52). For quality of pain, multidimensional McGill Pain Questionnaire (MPQ) which characterizes emotional and sensory aspects of pain was used. Scores can range from 1 to 78 and higher scores indicated greater pain (53, 54).

Sample collection and DNA extraction

Epithelial cells from all individuals were obtained through sterile oral swab and placed immediately in 1500 µl of Krebs buffer (NaCl 20%, KCl 2%, CaCl₂ 2%, H₂O 2%, MgSO₄, KH₂PO₄, C₆H₁₂O₆) (55). Centrifugation at 200 g (11000 rpm) for 5 min was performed to obtain a cell pellet and DNA was extracted as previously described (56). After removal of the supernatant, 20 µl of silica (SiO₂; Sigma, St. Louis/MO/USA) and 450 µl of lyses buffer (6.0 M GuHCL, 65 mM Tris-HCl pH = 6.4, 25 mM EDTA and 1.5% Triton-X-100) were added. Samples were homogenized using Vortex and incubated for 30 min at 56°C and another centrifugation and supernatant discharge were performed. The pellet (with DNA adsorbed on silica) was washed 2x with 450 µl washing buffer (6.0 M GuHCL and 65 mM Tris-HCl pH = 6.4), 2x with 450 µl of 70% ethanol, 1x with 450 µl acetone and dried at 56°C for 30 min. Finally, 100 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl pH = 8.0 and 1 mM EDTA) was added and samples were incubated at 56°C for 12 hr. After solution was homogenized and centrifuged, supernatant containing DNA was transferred to a new tube as described elsewhere (55).

Genotyping

Nav1.6 sodium ion channel gene (SCN8A) SNP rs303810, BDNF gene SNP rs6265/Val66Met, COMT gene SNP rs4680/Val158Met, and GCH1 gene SNP rs8007267 were assessed by RealTime PCR amplification. Reactions were performed with TaqMan detection system (Thermo Fisher Scientific/ Waltham, Massachusetts, USA) and probes for rs303810 (C__1053214_1_Assay ID, Thermo Fisher Scientific/

Waltham, Massachusetts, USA), rs6265 (C__11592758_10_ Assay ID, Thermo Fisher Scientific/ Waltham, Massachusetts, USA), rs4680 (C__25746809_50_ Assay ID, Thermo Fisher Scientific/ Waltham, Massachusetts, USA) and rs8007267 (C__1545138_10_ Assay ID, Thermo Fisher Scientific/ Waltham, Massachusetts, USA) on a C1000TM Thermal Cycler / CFX96 (Bio-Rad Laboratories/ Hercules, California, USA) using a total volume of 20 µl, containing 50 ng of DNA diluted in H₂O sterile, 15,5 µl of Taqman Genotyping Assay Master Mix (Thermo Fisher Scientific/ Waltham, Massachusetts, USA) and 0.5 µl of probe. Gene sequences were amplified as following, according to manufacturer's instructions: 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 min at 60°C.

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using IBM SPSS Statistics for Windows (V21; IBM Inc., Chicago, IL, USA) or OpenEpi (V3.01; online). Study groups were tested for Hardy–Weinberg equilibrium for expected and observed genotype frequencies. Genotype and allelic frequencies were investigated through Chi-squared analysis or Fisher's exact test. Probability values (p) of 0.05 or less were considered significant.

RESULTS

Demographic and clinical data are summarized below as described in a previous work of our group: mean age was 63,7 years old (+/-12,1) and 56,3% of subjects were female. Most TN patients showed unilateral facial pain (93,8%) in V2 (14,6%), V3 (10,4%) or both V2/V3 divisions (45,8%). Pain was considered intense for 83,3% of TN patients by VAS or by 100% of TN patients by MPQ (57).

Genotype and allele frequencies of *Nav1.6 sodium ion channel* (SCN8A, rs303810), BDNF (BDNF, rs6265/Val66Met), COMT (COMT, rs4680/Val158Met), and GCH1

(GCH1, rs8007267) genes were in Hardy-Weinberg equilibrium in both groups and are shown in **Table 1**. There was no significant difference in genotype distribution for analyzed SNPs between TN patients and controls. For allele analyses, both groups had similar frequencies for all studied polymorphisms. Therefore, there was no association of evaluated polymorphisms and TN.

Association between pain intensity and polymorphisms has been evaluated as shown in **Table 2**. Genotype and allele frequencies of evaluated SNPs did not correlate to the VAS scores. Hence, there was no association of these polymorphisms and pain in this study.

DISCUSSION

There is a lack of studies regarding genetic characteristics and TN and this is the first study to investigate polymorphisms in Nav1.6 sodium ion *channel* (*SCN8A*), BDNF, COMT and GCH1 genes in TN patients. No association was observed between the evaluated polymorphisms and the presence of the disease or pain scores in our sample. As previously described by our group (57), the study sample was homogeneous, represented Brazilian population (58) and demographic and clinical features were similar to other studies (3, 59).

Regarding SNP rs303810 in Nav1.6 sodium ion channel gene (*SCN8A*), frequency of A allele in our sample was 20-28% which is in accordance to studies in other populations (23, 60). Here, this SNP was not associated to TN diagnosis or pain intensity, although this channel has been associated to pain conditions (14, 18), neuronal hyper excitability (61) and a variety of neurological and psychiatric disorders, such as epilepsy (62) and bipolar disorders (23, 60). In a previous work, a gain-of-function mutation in Nav1.6 gene has been identified in TN (14) and further studies should address this evaluation in

greater TN population, mainly because sodium channel blockers are first line drugs in alleviating TN signs and symptoms (6).

The BDNF SNP evaluated here showed an A allele frequency of 14-19% in controls and patients, and this data is in accordance to other studies whereas frequency ranged from 13 to 24% (63, 64). We did not find an association of Val66Met polymorphism with TN diagnosis or pain, in spite of the fact that it has been associated to a higher risk of post-surgical pain (65), affects neuroplasticity in trigeminal nociceptive pathways (25, 26, 66), and influences trigeminal pain (31). However, another study has not found association of rs6265/Val66Met and migraine (67). It has been attributed a pivotal role for BDNF in nociception (68, 69) due to its activation of different mechanisms (70).

The COMT SNP evaluated in our study had an A allele frequency of 36-38% in patients and controls, which is in agreement with other studies, whereas the frequency ranged 32-43% (71, 72). We found no association of rs4680/Val158Met polymorphism with diagnosis or pain intensity in TN, but an association with greater pain sensitivity and symptom severity in fibromyalgia (38, 39), chronic tensional headache (73), and HIV associated neuropathic pain (74) has been shown. In contrast, others studies have not found any association of rs4680/Val158Met with increased susceptibility to neuropathic pain (75) and chronic postoperative pain (76).

In GCH1 rs8007267, T allele frequency was 17-22% in patients and controls, and this is in accordance to other studies (77, 78). Regardless no association of GCH1 polymorphism and susceptibility to pain or pain intensity, others have found that the haplotype containing polymorphism studied here is a pain protection factor (48) and is related to the decreased pain intensity in neuropathic pain conditions (44).

It has been shown that genetics is crucial for the risk of development of TN (13, 14, 79). However, no association of evaluated SNPs and TN was observed here. In spite of this,

the scarcity of studies in genetics and TN highlights the relevance of this work and the presence or the lack of association between polymorphisms and TN is of interest for the field of neurology and pain. Moreover, the lack of association observed in this study does not exclude the fact that genotypes affecting Nav1.6, BDNF, COMT or GCH1 can be associated with TN or its pain. Gene-environment interactions are complex and epigenetic factors as DNA methylation and histone modifications play an important role in physiological processes and may contribute to pain generation and maintenance in neuropathic pain conditions (80, 81, 82). We believe that other genetic polymorphisms, epigenetics, post-transcriptional regulation and alterations in pathways from gene to protein need to be further addressed in order to better understand TN's pathological mechanisms and allow its personalized clinical management.

CONCLUSIONS

No association of Nav1.6 sodium ion channel (SCN8A), BDNF, COMT and GCH1 genetic polymorphisms and TN was observed in Brazilian individuals. However, our data contributes to the knowledge about the genetic susceptibility to TN, which is very scarce. Further studies may focus on distinct genetic features in these and other genes as well as on epigenetics and transcriptional regulation in order to contribute to TN susceptibility and pathophysiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to neurologists José Maurício Siqueira, Eric Grossi, and Rodrigo Santiago Gomez for patient referral and to Dr. Walderez O. Dutra for use of equipment and laboratory facilities.

REFERENCES

1. Gadiant PM, Smith JH. The neuralgias: diagnosis and management. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2014; **14**: 459-66.
2. Montano N, Conforti G, Di Bonaventura R, Meglio M, Fernandez E, Papacci F. Advances in diagnosis and treatment of trigeminal neuralgia. *Ther Clin Risk Manag* 2015; **11**: 289-99.
3. Katusic S, Beard CM, Bergstralh E, Kurland LT. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, Rochester, Minnesota, 1945-1984. *Ann Neurol* 1990; **27**: 89-95.
4. De Toledo IP, Conti Reus J, Fernandes M, Porporatti AL, Peres MA, Takaschima A, Linhares MN, Guerra E, De Luca Canto G. Prevalence of trigeminal neuralgia: A systematic review. *J Am Dent Assoc* 2016; **147**: 570-6.
5. Zakrzewska JM, Wu N, Lee JYK, Werneburg B, Hoffman D, Liu Y. Characterizing Treatment Utilization Patterns for Trigeminal Neuralgia in the United States. *Clin J Pain* 2018; **34**:691-699.
6. Di Stefano G, Truini A, Cruccu G. Current and Innovative Pharmacological Options to Treat Typical and Atypical Trigeminal Neuralgia. *Drugs* 2018; **78**:1433-1442.
7. IASP. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. ISSN 978-0- 931092-05-3. 2011.
8. Coghill RC. Individual differences in the subjective experience of pain: new insights into mechanisms and models. *Headache* 2010; **50**: 1531-5.
9. Young EE, Lariviere WR, Belfer I. Genetic basis of pain variability: recent advances. *J Med Genet* 2012; **49**: 1-9.

10. Zorina-Lichtenwalter K, Meloto CB, Khoury S, Diatchenko L. Genetic predictors of human chronic pain conditions. *Neuroscience* 2016; **338**: 36-62.
11. Zorina-Lichtenwalter K, Parisien M, Diatchenko L. Genetic studies of human neuropathic pain conditions: a review. *Pain* 2018; **159**: 583-594.
12. Huang CJ, Wang H, Wu MY, Zhang JJ, Meng QR, Fu CH, Deng JZ, Yi P. Association of estrogen receptor gene polymorphisms and primary trigeminal neuralgia. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China journal of stomatology* 2005; **23**:495-7.
13. Cui W, Yu X, Zhang H. The serotonin transporter gene polymorphism is associated with the susceptibility and the pain severity in idiopathic trigeminal neuralgia patients. *J Headache Pain* 2014; **20**: 15-42.
14. Tanaka BS, Zhao P, Dib-Hajj FB, Morisset V, Tate S, Waxman SG, Dib-Hajj SD. A gain-of-function mutation in Nav1.6 in a case of trigeminal neuralgia. *Mol Med (Cambridge, MA, U.S.)* 2016; **22**: 338-48.
15. Costa GMF, de Oliveira AP, Martinelli PM, da Silva Camargos ER, Arantes RME, de Almeida-Leite CM. Demyelination/remyelination and expression of interleukin-1beta, substance P, nerve growth factor, and glial-derived neurotrophic factor during trigeminal neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 2016; **612**: 210-8.
16. Rogers M, Tang L, Madge DJ, Stevens EB. The role of sodium channels in neuropathic pain. *Semin Cell Dev Biol* 2006; **17**: 571-81.
17. Lorincz A, Nusser Z. Molecular identity of dendritic voltage-gated sodium channels. *Science* 2010; **328**: 906-9.

18. Chen L, Huang J, Zhao P, Persson AK, Dib-Hajj FB, Cheng X, Tan A, Waxman SG, Dib-Hajj SD. Conditional knockout of Nav1.6 in adult mice ameliorates neuropathic pain. *Sci Rep* 2018; **8**: 3845.
19. Cummins TR, Dib-Hajj SD, Herzog RI, Waxman SG. Nav1.6 channels generate resurgent sodium currents in spinal sensory neurons. *FEBS Lett* 2005; **579**: 2166-70.
20. Enomoto A, Han JM, Hsiao CF, Chandler SH. Sodium currents in mesencephalic trigeminal neurons from Nav1.6 null mice. *J Neurophysiol* 2007; **98**: 710-9.
21. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (dbSNP) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs303810>.
22. Wagnon JL, Barker BS, Hounshell JA, Haaxma CA, Shealy A, Moss T, Parikh S, Messer RD, Patel MK, Meisler MH. Pathogenic mechanism of recurrent mutations of SCN8A in epileptic encephalopathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2015; **3**: 114-23.
23. Wang Y, Zhang J, Li X, Ji J, Yang F, Wan C, Feng G, Wan P, He L, He G. SCN8A as a novel candidate gene associated with bipolar disorder in the Han Chinese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; **32**: 1902-4.
24. Lipsky RH, Marini AM. Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1122**: 130-43.
25. Thompson SW, Bennett DL, Kerr BJ, Bradbury EJ, McMahon SB. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci. U.S. A.* 1999; **96**: 7714-8.

26. Ichikawa H, Yabuuchi T, Jin HW, Terayama R, Yamaai T, Deguchi T, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Sugimoto T. Brain-derived neurotrophic factor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion and trigeminal sensory nuclei. *Brain Res* 2006; **1081**: 113-8.
27. Tanure MT, Gomez RS, Hurtado RC, Teixeira AL, Domingues RB. Increased serum levels of brain-derived neurotropic factor during migraine attacks: a pilot study. *J Headache Pain* 2010; **11**: 427-30.
28. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003; **112**: 257-69.
29. Bath KG, Lee FS. Variant BDNF (Val66Met) impact on brain structure and function. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2006; **6**: 79-85.
30. Shimizu E, Hashimoto K, Iyo M. Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am J Med Genet, Part B* 2004; **126B**: 122-3.
31. Di Lorenzo C, Di Lorenzo G, Daverio A, Pasqualetti P, Coppola G, Giannoudas I, Barone Y, Grieco GS, Niolu C, Pascale E, Santorelli FM, Nicoletti F, Pierelli F, Siracusano A, Seri S. The Val66Met polymorphism of the BDNF gene influences trigeminal pain-related evoked responses. *J Pain* 2012; **13**: 866-73.
32. Grossman MH, Emanuel BS, Budarf ML. Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1—q11.2. *Genomics* 1992; **12**: 822–825.

33. Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolanein R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* 1994; **223**: 1049–1059.
34. Männistö PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev* 1999; **51**: 593–628.
35. Andersen S, Skorpen F. Variation in the COMT gene: implications for pain perception and pain treatment. *Pharmacogenomics* 2009; **10**: 669-684.
36. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 1996; **6**: 243-50.
37. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana, BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger D R. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 2004; **75**: 807–821.
38. Cohen H, Neumann L, Glazer Y, Ebstein RP, Buskila D. The relationship between a common catechol-o-methyltransferase (COMT) polymorphism val(158) met and fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol* 2009; **27**: 52-6.
39. Martínez-Jauand M, Sitges C, Rodríguez V, Picornell A, Ramon M, Buskila D, Montoya P. Pain sensitivity in fibromyalgia is associated with catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. *Eur J Pain* 2013; **17**: 16-27.
40. George SZ, Wallace MR, Wright TW, Moser MW, Greenfield WH, III, Sack BK, Herbstman DM, Fillingim RB. Evidence for a biopsychosocial influence on

- shoulder pain: pain catastrophizing and catechol-O-methyltransferase (COMT) diplotype predict clinical pain ratings. *Pain* 2008; **136**: 53–61
41. 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 M. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet* 2005; **14**: 135–143.
42. Thony B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem. J* 2000; **347**: 1–16.
43. Zhang L, Rao F, Zhang K, Khandrika S, Das M, Vaingankar SM, Bao X, Rana BK, Smith DW, Wessel J, Salem RM, Rodriguez-Flores JL, Mahata SK, Schork NJ, Ziegler MG, O'Connor DT. Discovery of common human genetic variants of GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) governing nitric oxide, autonomic activity, and cardiovascular risk. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2658-71.
44. Tegeder I, Costigan M, Griffin RS, Abele A, Belfer I, Schmidt H, Ehnert C, Nejim J, Marian C, Scholz J, Wu T, Allchorne A, Diatchenko L, Binshtok AM, Goldman D, Adolph J, Sama S, Atlas SJ, Carlezon WA, Parsegian A, Lötsch J, Filingim RB, Maixner W, Geisslinger G, Max MB, Woolf CJ. GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. *Nat Med* 2006; **12**: 1269-77.
45. Segawa M, Nomura Y, Hayashi M. Dopa-responsive dystonia is caused by particular impairment of nigrostriatal dopamine neurons different from those involved in Parkinson disease: evidence observed in studies on Segawa disease. *Neuropediatrics* 2013; **44**: 61-6.

46. Tegeder I, Adolph J, Doehring A, Schmidt H, Woolf CJ, Geisslinger G, Lötsch J. Reduced hyperalgesia in homozygous carriers of a GTP cyclohydrolase 1 haplotype. *Eur J Pain* 2008; **12**: 1069-77.
47. Antoniadou C, Shirodaria C, VanAssche T, Cunningham C, Tegeder I, Lötsch J, Guzik TJ, Leeson P, Diesch J, Tousoulis D, Stefanadis C, Costigan M, Woolf CJ, Alp NJ, Channon KM. GCH1 haplotype determines vascular and plasma biopterin availability in coronary artery disease effects on vascular superoxide production and endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2008; **52**: 158-165.
48. Lötsch J, Belfer I, Kirchhof A, Mishra BK, Max MB, Doehring A, Costigan M, Woolf CJ, Geisslinger G, Tegeder I. Reliable screening for a pain-protective haplotype in the GTP cyclohydrolase 1 gene (GCH1) through the use of 3 or fewer single nucleotide polymorphisms. *Clin Chem* 2007; **53**: 1010-1015.
49. Kim SK, Kim SH, Nah SS, Lee JH, Hong SJ, Kim HS, Lee HS, Kim HA, Jung CI, Bae J, Choe JY, Lee SS. Association of guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 gene polymorphisms with fibromyalgia syndrome in a Korean population. *J Rheumatol* 2013; **40**: 316-22.
50. Kim DH, Dai F, Belfer I, Banco RJ, Martha JF, Tighiouart H, Tromanhauser SG, Jenis LG, Hunter DJ, Schwartz CE. Polymorphic variation of the guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 gene predicts outcome in patients undergoing surgical treatment for lumbar degenerative disc disease. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010; **35**: 1909-14.
51. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia* 2018; **38**: 1-211.

52. Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, French M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis Care Res* 2011; **63**: S240-52.
53. Melzack R. The McGill Pain Questionnaire: major properties and scoring methods. *Pain* 1975; **1**: 277-99.
54. Varoli FK, Pedrazzi V. Adapted version of the McGill Pain Questionnaire to Brazilian Portuguese. *Braz Dent J* 2006; **17**: 328-35.
55. Moreira PR, de Sa AR, Xavier GM, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res* 2005; **40**: 306-11.
56. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 495-503.
57. Costa GMF, Rocha LPC, Siqueira SRDT, Moreira PR, Almeida-Leite CM. No Association of Polymorphisms in Nav1.7 or Nerve Growth Factor Receptor Genes with Trigeminal Neuralgia. *Pain Med* 2018; **20**: 1362-1369.
58. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; **100**: 177-82.
59. Mueller D, Obermann M, Yoon MS, Poitz F, Hansen N, Slomke MA, Dommès P, Gizewski E, Diener HC, Katsarava K. Prevalence of trigeminal neuralgia

- and persistent idiopathic facial pain: a population-based study. *Cephalalgia* 2011; **31**: 1542-8.
60. Bonilla C, Hooker S, Mason T, Bock CH, Kittles RA. Prostate cancer susceptibility Loci identified on chromosome 12 in African Americans. *PloS one* 2011; **6**: e16044.
61. Hargus NJ, Nigam A, Bertram EH, 3rd, Patel MK. Evidence for a role of Nav1.6 in facilitating increases in neuronal hyperexcitability during epileptogenesis. *J Neurophysiol* 2013; **110**: 1144-57.
62. Wagnon JL, Barker BS, Hounshell JA, Haaxma CA, Shealy A, Moss T, Parikh S, Messer RD, Patel MK, Meisler MH. Pathogenic mechanism of recurrent mutations of SCN8A in epileptic encephalopathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2015; **3**: 114-23.
63. Cai X, Shi X, Zhang X, Zhang A, Zheng M, Fang Y. The association between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphism and migraine: a meta-analysis. *J Headache Pain* 2017; **18**: 13.
64. Vieira RN, Magalhaes JD, Sant'Anna J, Moriguti MM, de Paula JJ, Cintra MT, de Miranda DM, De Marco L, de Moraes EN, Romano-Silva MA, Bicalho MA. The GAB2 and BDNF polymorphisms and the risk for late-onset Alzheimer's disease in an elderly Brazilian sample. *Int Psychogeriatr* 2015; **27**: 1687-92.
65. Tian Y, Liu X, Jia M, Yu H, Lichtner P, Shi Y, Meng Z, Kou S, Ho IHT, Jia B, Cheng BCP, Lam CKM, Tsang S, Wong SH, Yu J, Cheng CHK, Gin T, Wu WKK, Chen Z, Chan MTV, Targeted Genotyping Identifies Susceptibility Locus in Brain-derived Neurotrophic Factor Gene for Chronic Postsurgical Pain. *Anesthesiology* 2018; **128**: 587-97.

66. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009; **10**: 895-926.
67. Lemos C, Mendonca D, Pereira-Monteiro J, Barros J, Sequeiros J, Alonso I, Sousa A. BDNF and CGRP interaction: implications in migraine susceptibility. *Cephalalgia* 2010; **30**: 1375-82.
68. Fukuhara K, Ishikawa K, Yasuda S, Kishishita Y, Kim HK, Kakeda T, Yamamoto M, Norii T, Ishikawa T. Intracerebroventricular 4-methylcatechol (4-MC) ameliorates chronic pain associated with depression-like behavior via induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Cell Mol Neurobiol* 2011; **32**: 971-7.
69. Zhang X, Xu Y, Wang J, Zhou Q, Pu S, Jiang W, Du D. The effect of intrathecal administration of glial activation inhibitors on dorsal horn BDNF overexpression and hind paw mechanical allodynia in spinal nerve ligated rats. *J Neural Transm (Vienna)* 2012; **119**: 329-36.
70. Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, Bardoni R. BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol* 2008; **85**: 297-317.
71. Fernández-de-Las-Peñas C, Ambite-Quesada S, Palacios-Ceña M, Guillem-Mesado A, Guerrero-Peral Á, Pareja JA, Arendt-Nielsen L. Catechol-O-Methyltransferase (COMT) rs4680 Val158Met Polymorphism is Associated With Widespread Pressure Pain Sensitivity and Depression in Women With Chronic, but not Episodic, Tension-Type Headache. *Clin J Pain* 2019; **35**: 345-352.
72. Ren X, Zhang L, Xiao Q, Huang D, Liu Q, Zhang Y. Association between COMT polymorphism, labor anxiety, and analgesia in pregnant women. *J Pain Res* 2019; **12**: 779-785.

73. Fernández-de-las-Peñas C, Ambite-Quesada S, Rivas-Martínez I, Ortega-Santiago R, de-la-Llave-Rincón AI, Fernández-Mayoralas DM, Pareja JA. Genetic contribution of catechol-O-methyltransferase polymorphism (Val158Met) in children with chronic tension-type headache. *Pediatr Res* 2011; **70**: 395-9.
74. Xu J, Umlauf A, Letendre S, Franklin D, Bush WS, Atkinson JH, Keltner J, Ellis RJ. Catechol-O-methyltransferase polymorphism Val158Met is associated with distal neuropathic pain in HIV-associated sensory neuropathy. *AIDS* 2019; **33**: 1575-1582.
75. Armero P, Muriel C, Santos J, Sánchez-Montero FJ, Rodríguez RE, González-Sarmiento R. COMT (Val158Met) polymorphism is not associated toneuropathic pain in a Spanish population. *Eur J Pain* 2005; **9**: 229-32.
76. Kolesnikov Y, Gabovits B, Levin A, Veske A, Qin L, Dai F, Belfer I. Chronic pain after lower abdominal surgery: do catechol-O-methyltransferase/opioidreceptor μ -1 polymorphisms contribute? *Mol Pain* 2013; **9**:19
77. Kim H, Dionne RA. Lack of influence of GTP cyclohydrolase gene (GCH1) variations on pain sensitivity in humans. *Mol Pain* 2007; **3**:6
78. Kishi T, Ichinose H, Yoshimura R, Fukuo Y, Kitajima T, Inada T, Kunugi H, Kato T, Yoshikawa T, Ujike H, Musso GM, Umene-Nakano W, Nakamura J, Ozaki N, Iwata N. GTP cyclohydrolase 1 gene haplotypes as predictors of SSRI response in Japanese patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* 2012; **142**: 315-22.
79. Panchagnula S, Sularz AK, Kahle KT. Familial Trigeminal Neuralgia Cases Implicate Genetic Factors in Disease Pathogenesis. *JAMA Neurol* 2019; **76**: 9-10.

80. Ueda H, Uchida H. Epigenetic modification in neuropathic pain. *Curr Pharm Des* 2015; **21**: 849-67.
81. Khangura RK, Bali A, Jaggi AS, Singh N. Histone acetylation and histone deacetylation in neuropathic pain: An unresolved puzzle? *Eur J Pharmacol* 2017; **795**: 36-42.
82. Lin R, Luo L, Gong Y, Zheng J, Wang S, Du J, Luo D. Immunohistochemical analysis of histone H3 acetylation in the trigeminal root entry zone in an animal model of trigeminal neuralgia. *J Neurosurg* 2018; **131**: 828-838.

TABLES

Table 1. Genotype and allele frequencies of Nav1.6 sodium ion channel (SCN8A, rs303810), BDNF (BDNF, rs6265/Val66Met), COMT (COMT, rs4680/Val158Met) and GCH1 (GCH1, rs8007267) genes between TN patients and controls.

Gene SNP			Control n = (48)	Patient n = (48)	p-value
Nav1.6 rs303810	Genotype	GG	23 (47,9%)	30 (62,5%)	0,349¹
		AG	22 (45,8%)	16 (33,3%)	
		AA	3 (6,3%)	2 (4,2%)	
	Allele frequencies	G	68 (70,8%)	76 (79,2%)	0,182²
		A	28 (29,2%)	20 (20,8%)	
BDNF rs6265/Val66Met	Genotype	GG	35 (72,9%)	32 (66,6%)	0,492¹
		AG	13 (27,1%)	14 (29,2%)	
		AA	0 (0%)	2 (4,2%)	
	Allele frequencies	G	83 (86%)	78 (81%)	0,326²
		A	13 (14%)	18 (19%)	
COMT rs4680/Val158Met	Genotype	GG	19 (39,6%)	18 (37,5%)	1,0²
		AG	23 (47,9%)	23 (47,9%)	
		AA	6 (12,5%)	7 (14,6%)	
	Allele frequencies	G	61 (63,5%)	59 (61,5%)	0,765²
		A	35 (36,5%)	37 (38,5%)	
GCH1 rs8007267	Genotype	CC	26 (54,2%)	33 (68,8%)	0,061¹
		CT	22 (45,8%)	13 (27%)	
		TT	0 (0%)	2 (4,2%)	
	Allele frequencies	C	74 (77,1%)	79 (82,3%)	0,369²
		T	22 (22,9%)	17 (17,7%)	

¹Fisher's exact test; ²Chi-square test.

Table 2. Association between pain intensity and genotype or allele frequencies of Nav1.6 sodium ion channel (SCN8A, rs303810), BDNF (BDNF, rs6265/Val66Met), COMT (COMT, rs4680/Val158Met) and GCH1 (GCH1, rs8007267) genes.

Gene SNP			VAS			p-value
			Mild	Moderate	Severe	
Nav1.6 rs303810	Genotype	GG	1 (50%)	2 (33,3%)	27 (67,5%)	0,219¹
		AG	1 (50%)	3 (50%)	12 (30%)	
		AA	0 (0%)	1 (16,7%)	1 (2,5%)	
	Allele frequencies	G	3 (75%)	7 (58,3%)	66 (82,5%)	0,141¹
		A	1 (25%)	5 (41,7%)	14 (17,5%)	
BDNF rs6265/Val66Met	Genotype	GG	1 (50%)	5 (83,3%)	26 (65%)	0,779¹
		AG	1 (50%)	1 (16,7%)	12 (30%)	
		AA	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	
	Allele frequencies	G	3 (75%)	11 (91,7%)	64 (80%)	0,538¹
		A	1 (25%)	1 (8,3%)	16 (20%)	
COMT rs4680/Val158Met	Genotype	GG	0 (0%)	4 (66,6%)	14 (35%)	0,275¹
		AG	2 (100%)	1 (16,7%)	20 (50%)	
		AA	0 (0%)	1 (16,7%)	6 (15%)	
	Allele frequencies	G	2 (50%)	9 (75%)	48 (60%)	0,548¹
		A	2 (50%)	3 (25%)	32 (40%)	
GCH1 rs8007267	Genotype	CC	2 (100%)	4 (67%)	27 (68%)	1,0¹
		CT	0 (0%)	2 (33%)	11 (27%)	
		TT	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	
	Allele frequencies	C	4 (100%)	10 (83%)	65 (81%)	1,0¹
		T	0 (0%)	2 (17%)	15 (19%)	

¹Fisher's exact te

APÊNDICE

APÊNDICE 01 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: “*DORES OROFACIAIS: CORRELAÇÃO ENTRE DOR, DOSAGEM SÉRICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E FATORES NEUROTRÓFICOS E POLIMORFISMOS DE GENES CODIFICADORES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS, FATORES NEUROTRÓFICOS E RECEPTORES, MOLÉCULAS DAS VIAS ADRENÉRGICA E SEROTONINÉRGICA, CANAIS IÔNICOS, ESTRÓGENO E RECEPTORES*”

Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

1) Introdução

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa que pretende estudar a associação entre alguns tipos de dores orofaciais e diversas substâncias químicas do nosso corpo e genes que podem estar associados a essas doenças. Sua participação envolverá exames físicos, preenchimento de questionários, entrevistas, coleta de sangue para avaliar as substâncias relacionadas à dor e coleta de raspado da parede interna de sua bochecha para estudo dos genes presentes em suas células.

Se decidir participar da pesquisa, é importante que leia estas informações sobre o estudo e o seu papel nesta pesquisa.

Você foi selecionado por estar em atendimento no Ambulatório de Dor Orofacial e Disfunção Temporomandibular do Centro de Especialização e Treinamento da Odontologia (CETRO)/BH ou no Ambulatório de Dor Orofacial da Clínica da Dor do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)/BH e por ter diagnóstico um dos seguintes diagnósticos: neuralgia trigeminal ou disfunção temporomandibular. Você também pode estar sendo selecionado como paciente controle e não possuir nenhum desses diagnósticos. A sua participação não é obrigatória e você pode não querer participar do estudo. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. É preciso entender a natureza e os riscos da sua participação e dar o seu consentimento livre e esclarecido por escrito.

2) Objetivo

O objetivo desse estudo é avaliar a associação entre a dor presente na neuralgia trigeminal ou nas disfunções temporomandibulares e mediadores químicos presentes no seu corpo, assim como genes em suas células, que podem estar associados a essas doenças.

3) Procedimentos do Estudo

Se concordar em participar deste estudo, você será solicitado a responder algumas perguntas e entrevistas, realizar exame físico para avaliar a doença, realizar a coleta de sangue e de raspado da bochecha.

4) Riscos e Desconfortos

Para a coleta do sangue, que será realizada por um profissional qualificado, serão respeitados todos os procedimentos técnicos-científicos e de biossegurança para o funcionamento e armazenamento do sangue, sem que a coleta ofereça risco. Caso aconteça algum desconforto ou você sinta algum mal estar, o professor responsável pela pesquisa intervirá e, se for necessário, o serviço de atendimento de urgência será acionado. O raspado da pele da parede interna da bochecha é realizado com uma espátula estéril, é um procedimento extremamente simples e não oferece nenhum risco para você.

5) Benefícios

A participação nessa pesquisa não acarretará gasto para você, sendo totalmente gratuita. As informações obtidas por meio desse estudo poderão ser importantes para o entendimento dos mecanismos da dor nas dores orofaciais, possibilitando, no futuro, avanços no diagnóstico e no tratamento da neuralgia trigeminal ou das disfunções temporomandibulares. O conhecimento que você adquirir a partir da sua participação na pesquisa poderá beneficiá-lo com informações e orientações futuras em relação à sua doença.

6) Custos/Reembolso

Você não terá nenhum gasto com a sua participação no estudo, da mesma forma que também não receberá pagamento pela sua participação. A sua avaliação e as coletas de sangue e raspado da bochecha acontecerão em um único momento por membros da equipe da pesquisa.

7) Caráter Confidencial dos Registros

Algumas informações obtidas a partir de sua participação neste estudo não poderão ser mantidas estritamente confidenciais. Além dos pesquisadores que vão fazer as perguntas dos questionários e aplicar os testes, os professores orientadores deste estudo e o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais podem precisar consultar seus registros. Você não será identificado quando o material de seu registro for utilizado, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. Ao assinar este consentimento informado, você autoriza as inspeções em seus registros.

8) Participação

É importante que você esteja consciente de que sua participação neste estudo é completamente voluntária e de que você pode recusar-se a participar do estudo, sem

penalidades ou perda de benefícios aos quais você tenha direito de outra forma. A recusa em participar do estudo não influenciará seus cuidados nesta instituição.

9) Para obter informações adicionais

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Caso você tenha mais perguntas sobre o estudo, por favor, entre em contato com os nomes abaixo.

Pesquisadores Responsáveis:

Camila Megale de Almeida Leite Telefone: 9191-7191

Grazielle Mara Ferreira Costa Telefone: 9987-5705

Roberta Maria Drumond F. B. Fonseca Telefone: 9538-7672

COEP: Comitê de Ética em Pesquisa / UFMG

Av. Antônio Carlos, 6.627. Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005

Telefone: (31) 3409-4592 / Email: coep@prpq.ufmg.br.

10) Declaração de Consentimento

Li ou alguém leu para mim as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro que fui informado sobre os objetivos do estudo. Declaro que tive tempo suficiente para ler e entender as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Autorizo a coleta de sangue e de raspado da bochecha e sua utilização neste projeto de pesquisa.

Confirmo também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para não participar do estudo, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (em letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, junto ao participante e/ou seu representante autorizado. Acredito que o participante e/ou seu

representante recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem adequada e compreensível e que ele/ela compreendeu a explicação.

Assinatura do pesquisador

Data