

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINAS, FATOR NEUOTRÓFICO  
DERIVADO DO CÉREBRO E MARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM PACIENTES COM FIBROMIALGIA**

ALINE RANZOLIN

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DE INTERLEUCINAS, FATOR NEUROTÓFICO  
DERIVADO DO CÉREBRO E MARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM PACIENTES COM FIBROMIALGIA**

ALINE RANZOLIN

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 05 de Dezembro de 2014.

### CIP - Catalogação na Publicação

Ranzolin, Aline

Avaliação de interleucinas, fator neurotrófico derivado do cérebro e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com fibromialgia / Aline Ranzolin. -- 2014.  
97 f.

Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. fibromialgia. 2. interleucinas. 3. fator neurotrófico derivado do cérebro. 4. estresse oxidativo. 5. depressão. I. Xavier, Ricardo Machado, orient. II. Título.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte – Serviço de Reumatologia da Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Claiton Viegas Brenol – Departamento de Medicina Interna da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Charles Lubianca Kohem – Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Profa. Dra. Inês Guimarães da Silveira – Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr – Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

---

**DEDICATÓRIA**

Tese dedicada às mulheres. Todas.

---

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não foi resultado do empenho isolado de uma pessoa, mas sim decorrência de um esforço coletivo. Manifesto minha gratidão de modo particular:

Ao **Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier**, pela competência e conselhos valiosos na execução de todas as etapas desta tese. Por continuar enxergando a fibromialgia com outros olhos e pela confiança em mim depositada.

À **Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte** por me receber no Serviço de Reumatologia em Recife, confiar e apoiar meu trabalho. Por ser um exemplo de mulher batalhadora que nunca almeja menos que o melhor.

A todos os **membros do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco**, que, chefiados pela Dra. Angela, buscam sempre a excelência em assistência, ensino e pesquisa.

Ao **Dr. Markus Bredemeier**, pela execução e discussão das análises estatísticas e pelas bem-vindas sugestões na elaboração do artigo.

Ao **Prof. Dr. Flávio Kapczinski** e sua equipe do Laboratório de Psiquiatria Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio imprescindível à realização deste trabalho. Agradeço, em especial, à farmacêutica **Bruna Maria Ascoli** e à biomédica **Bianca Wollenhaupt de Aguiar** por terem realizado e me ajudado a compreender todos os experimentos deste estudo e terem sido incansáveis na realização desta tarefa.

Ao bolsista **Cláudio Antônio da Costa Neto**, que foi fundamental na coleta e manuseio do material biológico das voluntárias deste estudo.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, pela oportunidade de qualificação e ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**, pela organização e estrutura que permitem que dezenas de profissionais da saúde alcancem alto grau de qualificação todos os anos.

A todas as **pacientes do Ambulatório de Fibromialgia** do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, que esperam, ansiosas, avanços nas pesquisas sobre a doença que lhes ajude a amenizar o sofrimento.

A meus pais, **Alírio Ranzolin** e **Teresinha Szupszynski**, que mais uma vez, podem orgulhar-se de outra etapa cumprida na minha realização profissional, sempre tão aplaudida por eles. Às minhas irmãs **Milene**, **Cristiane** e **Joseane**, e meu cunhado **Eliezer**, que me enxergam, carinhosamente, muito maior do que realmente sou e mesmo longe, estão sempre muito próximos. A meu marido, **Alexandre**, pela compreensão frente a tantas ausências necessárias. Aos filhos de todas as doutorandas, em especial, **Beatriz**, que foi a mais compreensiva, paciente e carinhosa de todas as meninas; esta tese também é dedicada a ti, minha linda.

*“ O que dá o verdadeiro sentido do encontro é a busca,  
e é preciso andar muito para se alcançar o que está perto.”*

*Todos os Nomes, José Saramago*

## RESUMO

**Base teórica:** Pacientes com alguns distúrbios psiquiátricos, como transtorno bipolar e depressão maior apresentam alteração de biomarcadores ligados à inflamação, estresse oxidativo e neurotrofinas. A relação entre estas substâncias tornou possível a criação de um Índice de Toxicidade Sistêmica (ITS) aplicável a algumas desordens psiquiátricas. Transtornos do humor são comuns em pacientes com fibromialgia (FM), despertando o interesse no estudo destes biomarcadores e do ITS nesta síndrome.

**Objetivos:** Determinar os níveis de citocinas (IL-6, IL-10, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), de *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF) e de marcadores de estresse oxidativo (carbonil e TBARS - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) em pacientes femininas com FM, relacionando com dados clínicos, níveis de depressão/qualidade de vida e comparando a mulheres saudáveis.

**Métodos:** Foram avaliados os níveis de IL-6, IL-10, IL-8, TNF- $\alpha$ , BDNF, carbonil e TBARS em um estudo transversal incluindo 69 pacientes femininas com FM e 61 mulheres saudáveis. Os níveis de interleucinas foram medidos por citometria de fluxo, as concentrações de BDNF foram avaliadas pelo método de ELISA, e os marcadores de estresse oxidativo foram estudados por espectrofotometria (TBARS) e determinação de grupos carbonil. Além disso, o grupo com FM foi avaliado pelo Questionário de Impacto da Fibromialgia – *Fibromyalgia Impact Questionnaire* (FIQ) e pelas escalas de depressão de Hamilton e de Beck.

**Resultados:** Os grupos tinham a mesma faixa etária ( $44,5 \pm 6,4$  anos no grupo FM e  $44,0 \pm 6,7$  no grupo saudável;  $p = 0,613$ ). As pacientes com FM tinham, caracteristicamente, longa duração de doença ( $8,5 \pm 6,5$  anos), importante impacto na qualidade de vida (FIQ  $70,2 \pm 17,8$ ) e a maior parte apresentou depressão em algum grau (82,6% pelo BDI e 87,0% pelo HDRS). Os níveis séricos de IL-10 foram significativamente maiores no grupo com FM ( $p = 0,006$ ), enquanto as demais citocinas, BDNF e marcadores de estresse oxidativo não diferiram entre os grupos. Não houve correlação significativa entre os diversos biomarcadores, tornando impossível o cálculo do ITS para pacientes com FM.

**Conclusão:** Este estudo foi o primeiro a testar um índice conjunto de biomarcadores, já avaliados isoladamente em estudos prévios, em pacientes com FM. No entanto, a ausência de correlação estatística entre os níveis séricos destas substâncias não permitiu o cálculo do ITS e sua aplicação em FM, tal como em distúrbios do humor. No entanto, observamos níveis significativamente maiores de IL-10 em pacientes fibromiálgicas, resultado que merece avaliação específica em pesquisas futuras.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fibromialgia, Interleucinas, BDNF, Estresse oxidativo, Depressão



## ABSTRACT

**Background:** Patients with certain psychiatric diseases, such as bipolar disorder and major depression present alteration of biomarkers related to inflammation, oxidative stress and neurotrophins. The relationship between these substances made possible the creation of a Systemic Toxicity Index (STI) applicable to some psychiatric disorders. Mood disorders are common in patients with fibromyalgia (FM), arousing the interest in the study of these biomarkers and STI in this syndrome.

**Objectives:** Determine the levels of cytokines (IL-6, IL-10, IL-8 and TNF- $\alpha$ ), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) and markers of oxidative stress (carbonyl and TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances) in female patients with FM, correlating with clinical data, levels of depression/quality of life and comparing to healthy women.

**Methods:** We evaluated the levels of IL-6, IL-10, IL-8, TNF- $\alpha$ , BDNF, TBARS and carbonyl in a cross-sectional study including 69 female FM patients and 61 healthy women. Interleukins levels were measured by flow cytometry, BDNF concentrations were tested by ELISA method, and oxidative stress markers were studied spectrophotometrically (TBARS) and by the determination of carbonyl groups. In addition, the FM patients were evaluated by the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) and Hamilton and Beck's depression scales.

**Results:** The groups had the same age range ( $44.5 \pm 6.4$  years in the FM group and  $44.0 \pm 6.7$  in the healthy group;  $p = 0.613$ ). The FM patients have characteristically long disease duration ( $8.5 \pm 6.5$  years), relevant impact on quality of life (FIQ  $70.2 \pm 17.8$ ) and most presented depression in some level (82.6% by BDI and 87.0% by HDRS). Serum levels of IL-10 were significantly higher in the FM women ( $p = 0.006$ ), while the other cytokines, BDNF and oxidative stress biomarkers did not differ between the groups. There was no significant correlation between the various biomarkers, making it impossible to calculate STI for patients with FM.

**Conclusion:** This study was the first to test an index of a biomarkers set, already evaluated in isolation in previous studies, in patients with FM. However, the absence of statistical correlation between serum levels of these substances did not allow the calculation of STI and its application in FM, such as in mood disorders. However, we observed significantly higher levels of IL-10 in FM patients, a result that deserves in-depth evaluation in future surveys.

**KEYWORDS:** Fibromyalgia, Interleukins, BDNF, Oxidative stress, Depression

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES, TABELAS E QUADROS

Figura 1. Correlações bivariadas entre biomarcadores periféricos em pacientes com distúrbio bipolar em episódio distímico, controles saudáveis e pacientes em sepse. ....	16
Figura 2. Índice de Toxicidade Sistêmica em eutimia, em episódio maníaco, em episódio depressivo, em pacientes em sepse e em controles saudáveis.....	17
Tabela 1. Resumo dos achados na literatura relacionados a alterações nos níveis de citocinas em pacientes com fibromialgia .....	26
Quadro 1. Principais marcadores de estresse oxidativo estudados em diversas patologias ....	41
Tabela 2. Alterações de biomarcadores de estresse oxidativo em fibromialgia .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – 5-hidroxitriptofano

ACR – *American College of Rheumatology*, Colégio Americano de Reumatologia

BDNF – *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CINC-1 – *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant 1*, Quimioatraente-1 de Neutrófilos Indutor de Citocinas

EDH – Escala de Depressão de Hamilton

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERN – Espécies Reativas ao Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas ao Oxigênio

FIQ – *Fibromyalgia Impact Questionnaire*, Questionário de Impacto da Fibromialgia

FM – Fibromialgia

G-CSF – Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos

GDNF – Fator Neurotrófico Derivado das Células da Glia

GM-CSF – Fator Estimulante de Colônia de Macrófago Granulócitos

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IL-1RA – Antagonista do Receptor da Interleucina 1

MCP – *Monocyte chemoattractant protein*, Proteína Quimiotática de Monócitos

MDA – Malondialdeído

MIP – *Macrophage Inflammatory Proteins*, Proteína Inflamatória de Macrófagos

NGF – *Nerve Growth Factor*, Fator de Crescimento do Nervo

NMDA – N-metil-D-aspartato

NT – Neurotrofina

OSI – *Oxidative Stress Index*, Índice de Estresse Oxidativo

p75NTR – Receptores de Neurotrofina de Baixa Afinidade p75

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cell*, Células Mononucleares de Sangue Periférico

PCC – *Protein carbonyl content*, Conteúdo carbonil proteico

PCR – Proteína C Reativa

PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids*, Ácidos Graxos Poli-insaturados

RT-PCR – Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase

SFC – Síndrome da Fadiga Crônica

sIL-1RA – Antagonista Solúvel do Receptor de IL-1

sIL-2R – Receptor Sérico de IL-2

sIL-6R – Receptor Solúvel de IL-6

SNC – Sistema Nervoso Central

TAS – *Total Antioxidant Status*, Estado Antioxidante Total

TBARS – *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TNF – *Tumoral Necrosis Factor*, Fator de Necrose Tumoral

TOS – *Total Oxidative Status*, Estado Oxidativo Total

TRAP – *Total reactive antioxidant potential*, Potencial antioxidante reativo total

trk – tirosina quinase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. ESTRATÉGIA DE LOCALIZAÇÃO/SELEÇÃO DE INFORMAÇÕES</b>	<b>13</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>14</b>
<b>3.1. DISTÚRBIOS PSIQUIÁTRICOS E BIOMARCADORES</b>	<b>14</b>
<b>3.2. FIBROMIALGIA</b>	<b>18</b>
<b>3.3. FISIOPATOGÊNESE DA FIBROMIALGIA</b>	<b>19</b>
<b>3.4. BIOMARCADORES EM FIBROMIALGIA</b>	<b>21</b>
3.4.1. Citocinas	22
3.4.1.1. Citocinas e dor crônica	23
3.4.1.2. Citocinas e fibromialgia	25
3.4.1.3. Citocinas, fibromialgia e sintomas associados	30
3.4.1.4. Citocinas, fibromialgia e resposta terapêutica	32
3.4.1.5. Citocinas e fibromialgia – considerações finais	34
3.4.2. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro - <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> (BDNF)	35
3.4.2.1. BDNF e dor	37
3.4.2.2. BDNF e fibromialgia	38
3.4.2.3. BDNF – considerações finais	39
3.4.3. Marcadores de Estresse Oxidativo	39
3.4.3.1. Estresse oxidativo, dor e fibromialgia	42
3.4.3.2. Estresse oxidativo, fibromialgia e resposta terapêutica	44
3.4.3.2. Estresse oxidativo – considerações finais	45
<b>4. JUSTIFICATIVA</b>	<b>47</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
5.1. Objetivo principal	47
5.2. Objetivos secundários	47
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>48</b>
<b>7. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS</b>	<b>58</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>80</b>
<b>9. APÊNDICES</b>	<b>82</b>
9.1. Protocolo de atendimento das pacientes com fibromialgia	82
9.2. Protocolo de atendimento das mulheres saudáveis	83
9.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	84
<b>10. ANEXOS</b>	<b>86</b>
10.1. Fibromyalgia Impact Questionnaire - Questionário de Impacto da Fibromialgia	86
10.2. Escala de Depressão de Hamilton	88
10.3. Escala de Depressão de Beck	92
10.4. Guideline Strobe para estudos observacionais	96

## 1. INTRODUÇÃO

A Fibromialgia (FM) é uma síndrome músculoesquelética caracterizada por dor difusa e crônica, associada a outros fatores clínicos, como fadiga, distúrbios do sono, parestesias, depressão e ansiedade. É reconhecida como um estado de saúde complexo e heterogêneo no qual há um distúrbio no processamento da dor. A busca do entendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos na FM tem sido um dos grandes desafios nos estudos envolvendo esse distúrbio e diversas hipóteses surgem neste contexto. Estudos têm demonstrado aumento sérico de algumas citocinas em pacientes com FM, no entanto ainda não há uniformidade ou consenso sobre esta hipótese. O estresse oxidativo também parece estar envolvido no processo etiopatogênico da FM e a participação das neurotrofinas é outro aspecto em investigação. Tanto as interleucinas, quanto as neurotrofinas e os biomarcadores de estresse oxidativo estão envolvidos na fisiopatogenia de doenças psiquiátricas, incluindo a depressão maior. Considerando que distúrbios psiquiátricos, especialmente a depressão e a ansiedade, ocorrem em 60-80% dos pacientes com FM, a investigação destes biomarcadores na síndrome fibromiálgica torna-se assunto de interesse. O objetivo desta tese foi avaliar a associação de FM com interleucinas, neurotrofinas e marcadores de estresse oxidativo, bem como, sua relação com parâmetros clínicos e níveis de depressão e impacto da doença nos pacientes fibromiálgicos.

## 2. ESTRATÉGIA DE LOCALIZAÇÃO/SELEÇÃO DE INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura foi focada nos aspectos relacionados aos seguintes biomarcadores em fibromialgia: interleucinas (IL), em especial, IL-6, IL-10, IL-8 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF) e indicadores de estresse oxidativo. Também foi buscada literatura a relação destes biomarcadores com qualidade de vida e sintomas de fibromialgia, em especial, a depressão. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed e banco de teses da CAPES, no período de 1960 a 2014. Foram realizadas buscas através dos termos “Fibromyalgia”, “Interleukin”, “BDNF”, “Oxidative Stress”, “Quality of life”, “Depression” e suas combinações.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. DISTÚRBIOS PSIQUIÁTRICOS E BIOMARCADORES

Os estudos com biomarcadores têm despertado grande interesse, em especial, nas doenças psiquiátricas, onde o diagnóstico depende, quase exclusivamente, da condição clínica e de questionários respondidos pelo paciente ou seus familiares e há escassez de marcadores diagnósticos e/ou prognósticos.

Muitas evidências demonstram que alvos relacionados a estresse oxidativo, neurotrofinas e inflamação possam atuar como mediadores de distúrbio cognitivo em doenças psiquiátricas, em especial os transtornos de humor. Em psiquiatria, processos inflamatórios estão implicados nos mecanismos fisiopatológicos das doenças, sendo que, alterações dos níveis de interleucinas vem sendo descritas. Este fenômeno já foi observado em várias psicopatias, como distúrbio bipolar (1, 2) e depressão (3, 4).

Há evidências da presença de inflamação em distúrbios do humor. Uma meta-análise de 2013 demonstrou a associação entre depressão maior e aumento de proteína C reativa (PCR) (3, 5). A ativação do sistema de resposta imune inflamatória é, também, bem documentada em pacientes com depressão maior (3, 6), sendo o perfil de citocinas o biomarcador mais comumente medido neste distúrbio. Duas meta-análises demonstraram que concentrações significativamente mais altas das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (6, 7) e TNF- $\alpha$  (7) são encontradas em pacientes com depressão maior, quando comparadas a pessoas saudáveis. Entretanto, os achados dos estudos diferem em relação aos níveis de outros marcadores de inflamação, como a PCR, IL-1 e antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1RA). Outra meta-análise, de estudos longitudinais, demonstrou associação entre IL-6 e sintomas depressivos, embora, após ajuste para variáveis confundidoras, a relação não tenha tido significância estatística (5). Em 2011, Hannestad conduziu outra meta-análise demonstrando que o tratamento antidepressivo em geral diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  e, especificamente, os inibidores seletivos de recaptção de serotonina reduziram IL-6 e TNF- $\alpha$  em pacientes com depressão maior (8). Diversas outras citocinas pró e anti-inflamatórias têm sido estudadas em depressão e, em geral, o sistema de resposta inflamatória parece estar ativado nesta doença; no entanto, os níveis de diferentes marcadores variam entre os estudos (3). Em distúrbio bipolar, por exemplo, foi demonstrado aumento de citocinas pró-inflamatórias, tanto em episódios maníacos (IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) como em depressivos (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) (9). Considera-se que, muito provavelmente, as alterações nos padrões de

citocinas em distúrbios psiquiátricos estão associadas à progressão da doença e não à sua etiologia (2).

Estudos recentes têm demonstrado que mecanismos pró-inflamatórios, em combinação com estresse oxidativo, atuam de forma importante no desenvolvimento de certas doenças associadas à idade, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (doenças de Parkinson e de Alzheimer). Estes biomarcadores também estão associados a desordens psiquiátricas, particularmente esquizofrenia, distúrbio bipolar e depressão (10). A relação entre estresse oxidativo e desordens afetivas provém do fato de o sistema nervoso ser particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido à alta utilização de oxigênio (resultando na produção de radicais livres), ao alto conteúdo lipídico como substrato para a oxidação, ao potencial redox de vários neurotransmissores, à ineficiente defesa antioxidante, além da alta concentração de metais íons (ferro, cobre), que estão envolvidos nas reações redox (10). Também é possível um elo entre o desequilíbrio oxidante e a produção de citocinas, já que o estresse oxidativo e nitrosativo podem alterar as estruturas químicas de várias moléculas e, conseqüentemente, originar uma variedade de novos epítomos modificados, que são imunogênicos, e podem gerar resposta imune-mediada (10). Diversas substâncias ligadas ao aumento do estresse oxidativo, como malondialdeído (MDA), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS) e carbonil têm se mostrado elevadas em pacientes com depressão (4). Outros indícios de ligação entre desequilíbrio oxidativo e doença psiquiátrica são inferidos em estudos onde foi observada a normalização dos parâmetros de estresse oxidativo após farmacoterapia em distúrbios afetivos. Adicionalmente, alguns antioxidantes exibem, também, propriedades antidepressivas (10).

Uma meta-análise de 2008 mostrou que medidas de TBARS e atividade de óxido nítrico, biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, foram significativamente aumentadas em distúrbio bipolar (11). Desfechos como elevação dos níveis séricos de TBARS e de outros marcadores de dano oxidativo, como carbonil, vem sendo persistentemente encontrados em pacientes com este transtorno (1, 2, 12).

Estudos avaliando neurotrofinas em doenças psiquiátricas também têm tido destaque na literatura, considerando-as como possíveis biomarcadores de doença. O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-derived Neurotrophic Factor*, BDNF), da família das neurotrofinas, também está alterado (diminuído) em distúrbio bipolar (episódio maníaco ou depressivo) (9, 12), e pacientes que experimentaram mais episódios distímicos têm mais baixos níveis sanguíneos desta substância (9). Além disso, a alteração deste marcador também foi associada a distúrbio cognitivo pós-primeiro surto psicótico, com mais altos índices de



BDNF associados à melhor performance cognitiva (13). Com relação ao tratamento, tem-se demonstrado que os estabilizadores de humor aumentam os níveis de BDNF (9).

Estudos em humanos e em modelos animais avaliando neurotrofinas em depressão indicam que o BDNF desempenha um papel no transtorno depressivo maior (14). Uma meta-análise de 2013 confirma a diminuição dos níveis séricos de BDNF em pacientes deprimidos e a normalização deste biomarcador com tratamento antidepressivo (15).

No contexto psiquiátrico, os biomarcadores periféricos, de uma forma geral, têm sido investigados individualmente. No entanto, alguns autores propõem que estas substâncias, devido às suas relações complexas, sejam estudadas em conjunto.

Para avaliar esses biomarcadores simultaneamente, Kapczinski e colaboradores realizaram, em pacientes psiquiátricos, a avaliação de um conjunto de alvos relacionados com estresse oxidativo (TBARS, potenciais antioxidantes reativos totais, conteúdo carbonil proteico), neurotrofinas (BDNF, neurotrofina-3) e inflamação (IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ), todos anteriormente descritos como biomarcadores individuais de transtornos de humor. Neste estudo, tais biomarcadores foram medidos em diferentes estados de humor agudo e em sujeitos saudáveis. Além disso, foram também avaliados em pacientes com sepse, que serviram como grupo controle “positivo”, com o objetivo de realçar a relevância das potenciais alterações entre os grupos. Os resultados demonstraram correlações significativas entre a maioria dos biomarcadores (figura 1) (16). Essas correlações foram sumarizadas estatisticamente com a formulação de um Índice de Toxicidade Sistêmica (ITS).

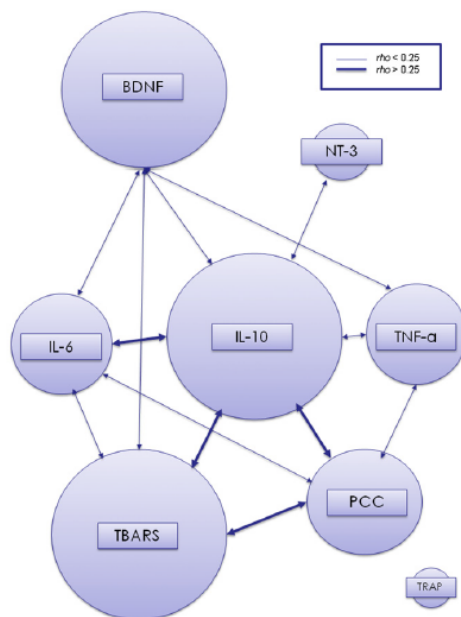


Figura 1. Adaptado de Kapczinski *et al*, 2011 (16) Correlações bivariadas entre biomarcadores periféricos em pacientes com distúrbio bipolar em episódio distímico, controles saudáveis e pacientes em sepse. A espessura das setas indica a significância da associação (Spearman's  $\rho$ ): setas mais espessas implicam associações mais fortes nesta amostra ( $n=155$ ). O tamanho dos círculos é meramente ilustrativo. TBARS = *thiobarbituric acid reactive substances*, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
IL-10 = interleucina-10  
PCC = *protein carbonyl content*, conteúdo carbonil proteico  
IL-6 = interleucina 6  
BDNF = *brain-derived neurotrophic factor*, fator neurotrófico derivado do cérebro  
TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral  
TRAP = *total reactive antioxidant potential*, potencial antioxidante reativo total  
NT-3 = neurotrofina-3

Pacientes em episódios maníacos e depressivos mostraram maior toxicidade sistêmica (medida pelo índice) do que pacientes eutímicos e controles saudáveis. Entretanto, mais baixa toxicidade sistêmica foi vista neste grupo de pacientes com distúrbio bipolar, quando comparados com pacientes com sepse (figura 2) (12).

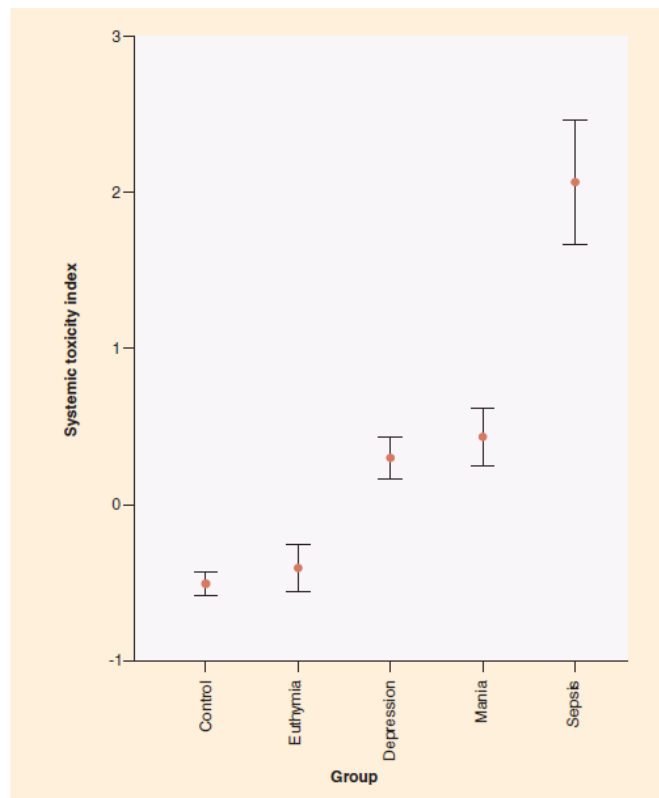


Figura 2. Extraído de Pfaffenseller *et al*, 2013 (9) Índice de Toxicidade Sistêmica em eutímia, em episódio maníaco, em episódio depressivo, em pacientes em sepse e em controles saudáveis.

O mais notável achado deste estudo foi a grande quantidade de dano oxidativo que pacientes com transtorno bipolar estão sujeitos durante episódios agudos de humor. Não só foi confirmado o dano de lipídios, que tem sido consistentemente encontrado (11), mas também foi verificado dano proteico, sendo, em alguns casos, um dano tão alto em transtorno bipolar como o que é visto em pacientes com sepse (16).

Mecanismos de toxicidade sistêmica parecem não ser exclusivos de distúrbio bipolar, podendo, também, estar presentes em outros transtornos psiquiátricos, apresentando alterações relacionadas à atividade da doença (em casos de episódios agudos seguidos de eutímia), como no transtorno depressivo maior ou esquizofrenia. No entanto, marcadores inflamatórios são distintos entre diferentes diagnósticos e populações, o que sugere meios peculiares de ativação da inflamação associada a transtornos específicos (9).

As doenças psiquiátricas podem estar associadas a diversas comorbidades e, em muitas delas, esta associação não só é frequente, como também interfere no comportamento da patologia. Na fibromialgia, por exemplo, há relevante coexistência de distúrbio cognitivo, transtorno de ansiedade e depressão.

Em resumo, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  foi observado na depressão. Devido à frequente sobreposição de sintomas, é possível que a depressão e a FM compartilhem mecanismos fisiopatogênicos semelhantes, justificando, assim, o estudo de biomarcadores, que podem ser comuns às duas patologias.

### 3.2. FIBROMIALGIA

A fibromialgia (FM) é uma das doenças reumatológicas mais prevalentes, sendo a dor musculoesquelética difusa e crônica sua característica principal. De acordo com os critérios diagnósticos utilizados, a prevalência da FM pode variar de 2-8% da população geral adulta (17), afetando principalmente pacientes do gênero feminino (18). Ocorre com maior frequência entre os 30 e 50 anos, tendo, por isso, implicações sociais e econômicas, já que é nesta faixa etária que o indivíduo tem maior produtividade laboral, social e pessoal. Seu quadro clínico também inclui fadiga, distúrbios do sono, rigidez matinal fugaz, parestesias inespecíficas, sensação subjetiva de edema, distúrbios cognitivos e diversos outros sintomas, entre eles, diagnósticos psiquiátricos (18).

Embora seja uma doença reconhecida há muito tempo, a FM tem sido seriamente estudada somente há três décadas. Em 1990, o *American College of Rheumatology* (ACR) publicou os critérios de classificação que foram usados para identificar pacientes com FM para inclusão em estudos clínicos. Estes critérios consistiam na presença de dor generalizada por, pelo menos, três meses e sensibilidade aumentada à palpação de 11 de 18 pontos dolorosos (*tender points*) pré-definidos (19). No entanto, estes critérios sozinhos não abrangiam a complexidade da FM, que se caracteriza pela presença de muitos outros sintomas (20). Em 2010, Wolfe e colaboradores desenvolveram novos critérios ACR para definição de FM, que excluía o exame dos *tender points* e incluía o Índice de Dor Generalizada e a Escala de Gravidade de Sintomas, levando em consideração não apenas a dor, mas também distúrbios cognitivos, padrões inadequados de sono, fadiga e uma série de sintomas somáticos (21).

Há evidências de que, quando detectada dentro dos dois primeiros anos de sintomas e manejada adequadamente, 24 meses depois, 50% dos pacientes não preenchem mais os critérios para FM (22). Ao contrário, num grupo de pacientes crônicos e estáveis, manejados em centros terciários, após dois anos de acompanhamento, 95% ainda preenchiam os critérios de FM de 1990, sem melhora (23).

Além da dor e de diversos sintomas somáticos, é frequente a associação de FM a comorbidades que contribuem para o sofrimento e a piora da qualidade de vida, como depressão e ansiedade. A prevalência de transtornos de humor e de ansiedade é mais do que três vezes maior em pacientes com FM do que na população geral. Transtorno depressivo é altamente prevalente em pacientes com FM, que apresentarão depressão em algum momento da vida em 62-86% dos casos. Além disso, durante os últimos anos, tem-se demonstrado que pacientes com FM têm mais altos índices de sintomas maníaco/hipomaníaco de transtorno bipolar quando comparados a controles saudáveis (24).

A associação entre FM e sintomas/comportamentos psiquiátricos pode resultar de gatilhos comuns a ambas as condições, como situações estressantes precocemente na vida ou trauma. Fatores cognitivos como catastrofização ou receio de que o movimento possa piorar a dor são fatores de pior prognóstico e muitos pacientes com FM respondem bem a intervenções simples como redução do estresse, melhora dos padrões de sono e aumento da atividade física (17).

Apesar da crescente literatura sobre a fisiopatologia e geração de dor, nosso conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos em FM e sua associação com distúrbios psiquiátricos ainda é limitado.

### **3.3. FISIOPATOGÊNESE DA FIBROMIALGIA**

A etiologia da dor crônica generalizada é apenas parcialmente compreendida e as conclusões de diferentes pesquisas conduziram a um grande número de hipóteses para tentar explicá-la. Como não se pôde, até o momento, detectar nenhuma alteração em tecidos periféricos que pudesse explicar os sintomas dolorosos, o conceito de alteração no processamento central da informação nociceptiva tem dominado a literatura sobre a fisiopatologia da FM. Muito provavelmente, a etiologia da dor na FM está relacionada a uma interação entre neurotransmissores, estressores externos, alterações de comportamento,

hormônios e sistema nervoso simpático, havendo intensa modulação em cada etapa do processo, reduzindo ou amplificando o estímulo doloroso (25, 26).

O conhecimento atual sobre a patogênese da FM aponta como sítios principais da modulação e amplificação da dor o corno posterior da medula, as vias nociceptivas medulares ascendentes e o cérebro, num complexo processo chamado sensibilização do sistema nervoso central (SNC) (17).

O limiar doloroso de pacientes com FM é mais baixo que o de indivíduos saudáveis e a área de dor relatada por estes pacientes também é maior, mesmo se submetidos a um mesmo estímulo. A substância P, um neuropeptídeo que diminui o limiar sináptico excitatório, permitindo a ativação interneurônios e a sensibilização do segundo neurônio, parece estar envolvida neste processo de sensibilização central, visto haver evidência de aumento dos níveis de substância P no líquido de pacientes com FM quando comparados a controles saudáveis (25).

O fenômeno de somação temporal ou *wind up* é um dos processos envolvidos na fisiopatogênese da FM e refere-se ao mecanismo medular onde a estimulação nociceptiva repetida, através das fibras amielínicas tipo C gerando aumento progressivo das descargas elétricas na sinapse (27), causa alterações nos neurônios nociceptivos, que amplificam o estado doloroso. Estudos têm demonstrado que o fenômeno *wind up* não é dependente apenas da estimulação de fibra C, sugerindo que a somação temporal é um processamento do SNC e não periférico (28). Em pacientes com FM, a dor sentida após uma série de estímulos nociceptivos é maior em magnitude, duração e frequência quando comparados a pessoas saudáveis (27).

Pacientes com FM também mostram evidência de diminuição da função da via inibitória da percepção de dor. A serotonina é usualmente reconhecida como inibidor da dor no SNC devido a seu papel na via antinociceptiva descendente e também na inibição da substância P. Os níveis do precursor da serotonina, 5-hidroxitriptofano (5-HT) e de seu maior metabólito, 5-hidroxi-indolacético, estão reduzidos no líquido de pacientes com FM, o que aponta para um cenário de dor crônica. A via dopaminérgica também está alterada, visto terem sido demonstradas anormalidades na liberação de dopamina no gânglio basal após estímulo doloroso em pacientes com FM, quando comparados a sujeitos saudáveis (25).

Outra parte da via inibitória da dor é o sistema opioide endógeno, que inclui endorfina e metencefalina. Evidências sugerem que este sistema pode estar hiperativado em pacientes com FM. Harris, usando tomografia computadorizada com emissão de pósitron demonstrou que o potencial de ligação nos receptores  $\mu$ -opioides nas áreas corticais relacionadas à

modulação de dor, como o núcleo accumbens, amígdala e cíngulo dorsal, está diminuído em pacientes com FM. O mesmo grupo de pesquisadores também demonstrou níveis aumentados de opioide endógeno no líquido destes pacientes. Portanto, parece que o sistema opioide é bem recrutado em pacientes com FM, mas, de alguma forma, é insuficiente para aliviar a dor (29).

Pacientes com doenças reumáticas, em que citocinas tenham um importante papel fisiopatológico, podem desenvolver quadro secundário de FM, com maior frequência que a população geral (30). Além disso, apesar de resultados contraditórios em pesquisas, tem sido proposto que a FM está relacionada à inflamação neurogênica induzida por uma resposta inflamatória a alérgenos, agentes infecciosos, substâncias irritantes, exposições químicas, ou estresse emocional (31).

Portanto, a fisiopatogênese da FM envolve anormalidades em múltiplos pontos do processamento da dor; cada um, com marcadores e substâncias específicas. Este fato amplia os possíveis alvos na pesquisa de biomarcadores em FM.

### **3.4. BIOMARCADORES EM FIBROMIALGIA**

Uma das principais limitações na pesquisa clínica em FM é a falta de marcadores objetivos para orientar o diagnóstico, prever o prognóstico ou prever a resposta ao tratamento. Biomarcadores válidos e confiáveis contribuiriam para padronizar o diagnóstico de FM, auxiliariam na monitorização da resposta ao tratamento e melhorariam a qualidade dos desfechos em pesquisa e atendimento clínico.

Um marcador biológico ou biomarcador é uma característica que pode ser objetivamente medida e avaliada como um indicador dos processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas para uma intervenção terapêutica (*National Institutes of Health Definition Working Group, 2001*) (32). O termo biomarcador geralmente indica algo que possa ser usado como indicador de uma doença (diagnóstico), de gravidade e progressão (prognóstico) e/ou de sua resposta ao tratamento (biomarcador) (33).

Os biomarcadores podem ser células específicas, enzimas, proteínas, hormônios, genes ou produtos genéticos que possam ser detectados e medidos no sangue, urina, líquido, tecidos ou outras partes do corpo (33). Também podem ser classificados como biomarcadores característicos morfológicos, identificadas com base em mecanismos biológicos ou fisiológicos (9). A descoberta de um biomarcador possibilita o reconhecimento precoce da doença ou do risco associado a ela, permitindo medidas que possam prevenir seu

desenvolvimento ou melhorar o prognóstico. Por isso, biomarcadores têm importante papel na abordagem clínica, no manejo de pacientes e também no campo da pesquisa. Entretanto, biomarcadores são frequentemente inespecíficos e difíceis de validar (33).

Tem-se demonstrado a alteração de vários marcadores objetivos em FM, alguns, até mesmo, com característica de biomarcador, estando alterados não só na presença da FM, mas também apresentando mudança conforme a alteração dos sintomas (20, 34).

Diferentes biomarcadores das mais diversas vias fisiopatológicas têm sido investigados no contexto da FM. Considerando-se a prevalência e importância de distúrbios psiquiátricos em FM, em especial, a depressão, é de interesse que biomarcadores relacionados a esta doença sejam, também, avaliados nos pacientes fibromiálgicos. Dentre os biomarcadores que já demonstraram associação com distúrbio psiquiátrico do humor e com FM, isoladamente, destacam-se as citocinas, neurotrofinas e marcadores de estresse oxidativo.

#### **3.4.1. Citocinas**

As citocinas são moléculas proteicas ou glicoproteicas secretadas durante a resposta a estímulos imunológicos, servindo como mensageiros químicos entre as células e envolvendo-se em processos como crescimento e diferenciação celulares, reparação e remodelamento teciduais, bem como na modulação das respostas imunes aguda e crônica. A maioria das citocinas são de baixo peso molecular (15-25kDa), têm meia-vida curta e agem através de receptores de superfície celular (35), sobre as próprias células que as secretam (ação autócrina), em células vizinhas (ação parácrina), ou, em alguns casos, em células distantes (ação endócrina) (36).

É comum diferentes tipos de células secretarem a mesma citocina ou uma única citocina agir em vários tipos de células, o que é conhecido como pleiotropia. Além disso, diferentes citocinas podem estimular funções similares, podendo ocorrer, inclusive, produção em cascata, quando uma citocina estimula suas células-alvo a produzirem citocinas adicionais (36).

As citocinas são sintetizadas por diversas populações específicas de células imunes amplamente distribuídas no organismo, predominantemente as células T helper e macrófagos (25). São geralmente classificadas por sua habilidade em promover ou inibir a resposta inflamatória ou de acordo com o grupo celular que as produz (4). Essas proteínas também podem ser produzidas no SNC e por tecido de nervo periférico durante processos fisiológicos ou patológicos; por macrófagos residentes e recrutados, mastócitos, células endoteliais e

células de Schwann (36). Por isso, a pesquisa e análise das citocinas pode ser feita a partir de diferentes locais, como soro, plasma, líquido e tecidos (25).

Além das funções já descritas, sugere-se que as citocinas estejam envolvidas no processamento da dor crônica (25), em especial, citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (36).

#### **3.4.1.1. Citocinas e dor crônica**

A ativação e regulação dos padrões de citocinas estão implicadas em uma variedade de doenças, como sepse, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, doença de Crohn e esclerose múltipla. A hipótese de que as citocinas possam estar envolvidas na geração da dor e hiperalgesia nas condições inflamatórias e neuropáticas tem sido proposta baseada em evidências de que as citocinas estabelecem a comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso, caracterizando múltiplos e complexos sistemas de regulação da dor (26). No entanto, eles não são totalmente compreendidos.

Têm-se demonstrado que algumas citocinas estão envolvidas na resposta nociceptiva. Citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 e IL-6, podem induzir a hiperalgesia, por exemplo, atuando no tecido cerebral e influenciando diretamente a capacidade de resposta neuronal nociceptiva (37).

A IL-6 tem papel central na reação de lesão neuronal, contribuindo para o desenvolvimento do comportamento de dor neuropática após uma lesão de nervo periférico. Além disso, a infusão intratecal de IL-6 induz alodinia tátil e hiperalgesia térmica em nervos intactos e danificados de ratos, respectivamente (36).

O TNF- $\alpha$  é outra citocina inflamatória com um papel-chave em alguns modelos de dor, atuando em diferentes vias de sinalização através de receptores de superfície celular (TNFR1 e TNFR2), presentes, também, nos neurônios e na glia. Além disso, tem sido demonstrado que esta citocina tem importante papel na hiperalgesia inflamatória e neuropática (36).

Há evidências de alteração de interleucinas em diversas patologias dolorosas. As citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são aumentadas em líquido de pacientes com síndrome da dor regional complexa (38), e níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  foram encontrados em células de Schwann de pacientes com neuropatias dolorosas (39), no sangue de pacientes com dor crônica (40) e no líquido de pacientes com cefaleia persistente (41). Níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 foram aumentados em pacientes com neuralgia periférica persistente (42) e dor crônica (40). Também neste contexto, a IL-8 foi aumentada em líquido de pacientes com dor ciática (43) e



neuralgia pós-herpética (44). No entanto, os resultados de pesquisa de citocinas em quadros de dor ainda são controversos e heterogêneos, visto outros estudos terem encontrado níveis normais de TNF- $\alpha$  e IL-6 no sangue e líquido de pacientes com neuropatias dolorosas (45) e com dor ciática (43).

Além da heterogeneidade de resultados, parece também haver diferença entre níveis líquidos e sanguíneos de citocinas. Um estudo avaliou sangue e líquido de pacientes com dor crônica moderada a grave e comparou a sujeitos saudáveis. No grupo com dor crônica, os níveis de IL-8 foram mais altos tanto no líquido, quanto no sangue, quando comparados a controles saudáveis. Apesar de não ter havido diferença significativa em qualquer dos níveis de TNF- $\alpha$  entre os grupos, sua concentração foi significativamente maior no sangue do que no líquido, o oposto do que ocorreu com IL-8, que teve mais altos níveis no líquido. Além disso, também foram mais altos, no grupo com dor, os níveis líquidos de IL-1 $\beta$  e os níveis sanguíneos de IL-6, não havendo correlação de nenhuma citocina com os níveis ou duração da dor (46).

Sabe-se que a síndrome da fadiga crônica (SFC) compartilha muitos dos sintomas da FM e, segundo alguns autores, inclusive, essas patologias não podem ser distinguidas entre si. Uma das hipóteses etiológicas para SFC é uma desregulação imune com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Um estudo investigou os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  em mulheres com SFC (com e sem FM) comparando a mulheres saudáveis, em vários momentos durante o sono. Uma vez que a literatura não indica qual a mais adequada metodologia para identificar anormalidades de citocinas em SFC e FM, a avaliação foi feita através de vários métodos. Não houve diferença dos níveis de qualquer das citocinas entre o grupo total de pacientes com SFC e controles. No entanto, ao subclassificar o grupo SFC, pacientes sem FM associada tiveram níveis de IL-10 (apenas em um dos métodos - Luminex) significativamente mais altos do que controles e pacientes com SFC e FM. No entanto, nenhum dos métodos usados para medir as citocinas se correlacionou, sugerindo que cada método captura diferentes aspectos das propriedades e funções das citocinas (47).

A IL-10 tem potentes propriedades anti-inflamatórias e, produzida por monócitos e macrófagos, reprime a expressão de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1. Além disso, IL-10 pode ativar anticitocinas endógenas e diminuir a atividade de receptores de citocinas pró-inflamatórias. Já foi relatado que a IL-10 possui efeitos antialodínico e antihiperálgico, através destes mecanismos de inibição de citocinas pró-inflamatórias (48). Logo, a IL-10 poderia contrarregular a produção e função de citocinas pró-inflamatórias em múltiplos níveis. Documentou-se que a administração de IL-10 suprime o desenvolvimento de

dor mediada medularmente em diversos modelos animais de dor neuropática tais como neurite periférica, lesão de medula espinhal e de nervo periférico (36). Alguns estudos em animais têm demonstrado que a diminuição de IL-10 está associada a hiperalgesia da dor neuropática, assim como seu aumento reduz o comportamento de dor (48).

#### **3.4.1.2. Citocinas e fibromialgia**

Níveis aumentados de citocinas têm sido associados a sintomas de dor, fadiga e distúrbios do humor, tornando plausível que alguns mediadores inflamatórios não específicos possam contribuir para a presença de sintomas de FM. Além disso, o desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias tem assumido importância na indução e manutenção da dor e vários autores têm investigado os níveis de citocinas em pacientes com FM, com resultados interessantes.

Em FM, o interesse nas citocinas como potenciais mediadores de sintomas começou quando Wallace, Margolin e Waller, em 1988, relataram o início agudo de sintomas de FM (dor, fadiga, distúrbios do sono e do humor) em pessoas com carcinoma terminal de células renais e melanoma que eram submetidas a tratamento com IL-2 (49).

Desde então, a relação entre citocinas, dor e FM vem sendo amplamente estudada, baseando-se na hipótese de associação entre estas variáveis. Sabe-se que as células cerebrais expressam receptores de citocinas e linfócitos expressam receptores opioides (50). O TNF- $\alpha$  promove o sono REM e alodinia, induz aminoácidos excitatórios produtores de dor, regula a expressão de substância P e está associado ao estresse (50). A IL-6 induz fadiga e dor em pessoas normais, diminui a função cognitiva, correlaciona-se com depressão e influencia a hiperalgesia da retirada de corticoide. Também, a liberação destas interleucinas é estimulada pela substância P, fortalecendo ainda mais a ligação entre estas moléculas e a FM. Em relação ao perfil de citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 pode bloquear a dor e diminuir a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  por monócitos (50). Por fim, todas estas interleucinas estão envolvidas no processo inflamatório: durante uma resposta inflamatória local. TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 são as principais citocinas liberadas por monócitos, juntamente com citocinas anti-inflamatórias como IL-10, que é liberada compensatoriamente mais tarde (51).

Outro indício do possível elo entre estas proteínas e FM é que imunoterapia com citocinas em pacientes com outros tipos de câncer e em pacientes infectados por vírus da hepatite C comumente está associada a sintomas somáticos e fadiga, além de dor crônica e depressão, que podem surgir após o início da terapia (52). Parece também haver inflamação,

demonstrada pela elevação de níveis de PCR em pacientes portadores de FM quando comparados a pessoas saudáveis (26, 53-55). Alguns destes estudos, inclusive, demonstraram associação deste marcador inflamatório com sintomas de depressão em FM (26, 55).

Diferentes metodologias têm sido aplicadas para a pesquisa de níveis de citocinas em FM, não havendo definição de um padrão-ouro; bem como diversos líquidos biológicos são usados para este fim, como soro, plasma e líquido. Alguns estudos foram feitos avaliando a produção de citocinas inflamatórias em cultura estimulada e não-estimulada de sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMC), baseados no fato de que os níveis *in vivo* das citocinas podem ser normais, mas o PBMC desses pacientes pode, em algumas circunstâncias, produzir aumento dos níveis dessas citocinas *in vitro*. Isso pode ser resultado de fatores associados com a fisiopatologia da FM afetando PBMC, mas de uma forma que torna-se manifesto apenas no ambiente artificial de cultura *in vitro* (56).

Os principais resultados dos estudos envolvendo citocinas em FM são demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos achados na literatura relacionado a alteração nos níveis de citocinas em pacientes com FM

<b>Primeiro autor, ano</b>	<b>Método</b>	<b>Meio onde foi feita a pesquisa</b>	<b>Citocinas aumentadas</b>	<b>Citocinas diminuídas</b>	<b>Sem diferença entre os níveis de citocinas</b>
Maes, 1999 <sup>(57)</sup>	ELISA	Soro	sIL-6R, sIL-1RA (nos pacientes com FM e depressão associada)	-	IL-6, sIL-6R, sIL-1RA (considerando todos os pacientes com FM)
Wallace, 2001 <sup>(50)</sup>	ELISA	Soro	IL-8 <sup>a</sup>	-	IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , sIL-2R, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-1Ra
	ELISA	PBMC estimulada e não estimulada	IL-6 <sup>a</sup> , IL-1Ra <sup>a</sup>	-	IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , sIL-2R, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-2
Gür, 2002 <sup>(37)</sup>	ELISA, IMMULITE (imunoensaio)	Soro	IL-8, IL-2r (somente em FM sem depressão)	-	IL-1, IL-6
Gür, 2002 <sup>(58)</sup>	IMMULITE (imunoensaio)	Soro	IL-2r, IL-8 <sup>b</sup>	-	IL-1, IL-6
Kashipaz, 2003 <sup>(56)</sup>	Citometria de fluxo	PBMC estimulada e não estimulada	-	-	IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10
Salemi, 2003 <sup>(59)</sup>	RT-PCR e imunohistoquímica	Biópsia de pele	IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$	-	-

Bazzichi, 2007 <sup>(26)</sup>	ELISA	Plasma	IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10 <sup>c</sup>	-	IL-6, IL-1
Wang, 2008 <sup>(31)</sup>	Bioplex®	Soro	TNF- $\alpha$ , IL-8	-	IL-6, IL-4, IL-10
Togo, 2009 <sup>(60)</sup>	Beadlyte Human Multi-Cytokine Detection System 2	Plasma	IL-10 (somente durante o sono)	-	IL-10 (em vigília), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$
Hesse-Husain, 2010 in <sup>(61)</sup>	Biochip array	PBMC estimulada	IL-2 (níveis maiores em sono pior)	-	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$
Blanco, 2010 <sup>(62)</sup>	Imuno-histoquímica	Biópsia de pele	-	-	TNF- $\alpha$
Ortega, 2010 <sup>(53)</sup>	ELISA	Soro	IL-8, IFN- $\gamma$	-	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IL-4, IL-10
Ang, 2011 <sup>(63)</sup>	Citometria de fluxo (Citometric Bead Array)	Plasma	IL-8	-	-
Topal, 2011 <sup>(64)</sup>	ELISA	Soro	TNF- $\alpha$	-	IL-6
Bote, 2012 <sup>(51)</sup>	ELISA	Soro	IL-8	-	-
Kadetoff, 2012 <sup>(65)</sup>	ELISA	Soro	IL-8	IL-1 $\beta$ , IL-5, TNF- $\alpha$	IL-6, IL-10
	ELISA	Líquor <sup>d</sup>	IL-8 <sup>e</sup>	-	IL-1 $\beta$
Ortega, 2012 <sup>(66)</sup>	ELISA	PBMC estimulada e não estimulada	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10	-	-
Malhotra, 2012 <sup>(52)</sup>	ELISA	Plasma	IL-4, IL-6	IL-2, IL-10, INF- $\gamma$	-
Behm, 2012 <sup>(67)</sup>	Imunoassay Multiplex Bed Array	Plasma	-	-	IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 MIP-1 $\beta$ , MCP-1, MIP1- $\alpha$
		PBMC	-	IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, MIP1- $\alpha$	IL-5
Xiao, 2013 <sup>(54)</sup>	ELISA	Soro	-	-	IL-6, IL-8
Bote, 2013 <sup>(68)</sup>	ELISA	Soro	IL-8	-	-

Sturgill, 2014 <sup>(69)</sup>	Bio-plex Pro- Human Cytokin 17-plex®	Plasma	-	IL-4, IL-5, IL-13	IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-17, G-CSF, GM- CSF, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-8
Wang, 2014 <sup>(70)</sup>	Bio-plex	Soro	TNF- $\alpha$ , IL-10	-	IL-4, IL-8
Üçeyler, 2014 <sup>(71)</sup>	RT-PCR	Biópsia de pele	-	-	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10

ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*

FM = fibromialgia

PBMC = *peripheral blood mononuclear cell*, células mononucleares de sangue periférico

RT-PCR = reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase

IL = interleucina

<sup>a</sup> diferença encontrada principalmente em pacientes com FM com mais de 2 anos de sintomas

<sup>b</sup> pacientes sem depressão tinham níveis séricos maiores de IL-8

<sup>c</sup> mais altos níveis em pacientes em depressão

<sup>d</sup> apenas os níveis líquóricos de IL-8 e IL-1 $\beta$  foram medidos; apenas nos pacientes com FM e comparados ao líquido de pacientes com doença neurológica não inflamatória

<sup>e</sup> níveis 3 vezes superiores aos níveis séricos

Um interessante estudo de 2001 avaliou o perfil de citocinas em pacientes com FM, considerando o tempo de sintomas. Os níveis séricos de IL-8 foram três vezes mais altos em FM do que em controles ( $p = 0,01$ ), sendo esta diferença devida, principalmente, aos altos níveis de IL-8 de pacientes com mais de dois anos de sintomas. Os níveis séricos de IL-6 e IL-1Ra (anticorpo contra o receptor de IL-1) foram similares entre os grupos. No entanto, quando da incubação em PBMC estimulada e não-estimulada, a produção de IL-6 e IL-1Ra foi significativamente elevada em comparação aos controles, em especial, nos pacientes com mais tempo sintomas ( $p = 0,01$ ). Não houve diferença entre os grupos com relação aos níveis séricos de outras citocinas (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , sIL-2R, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-2) (50).

Em 2003, Salemi e colaboradores demonstraram níveis significativos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em biópsias de pele em 30% dos pacientes com FM e em nenhum sujeito do grupo controle. A detecção de citocinas em pele de pacientes com FM poderia indicar presença de focos inflamatórios (inflamação neurogênica), sugerindo um componente inflamatório na indução da dor. A inflamação neurogênica pode ocorrer quando a substância P ou outros neuropeptídeos liberados das fibras nervosas sensitivas produzem uma resposta inflamatória. Mas, neste caso, não é claro se estes resultados podem ser parte de certas vias nociceptivas ou simplesmente epifenômenos (59). A expressão de TNF- $\alpha$  em pacientes com FM também foi investigada em biópsias de pele em outro estudo controlado, que não detectou sua presença (62). Estudo recente confirmou não haver diferença em biópsias de pele de pacientes com

fibromialgia, com depressão unipolar e controles saudáveis em relação à expressão de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  (71).

Um estudo de 2012 analisou simultaneamente inflamação sistêmica (PCR, IL-8) e a capacidade funcional de monócitos isolados (liberação de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-9, IL-18, MCP-1 e RANTES) em 25 mulheres com FM sem distúrbio psiquiátrico, comparadas a um grupo de mulheres saudáveis (n = 20). Os níveis circulantes de IL-8 e PCR foram significativamente mais altos no grupo com FM (p < 0,001 para ambas variáveis). Os monócitos de mulheres com FM liberaram constitutivamente mais IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-18 e MCP-1 do que controles saudáveis, não havendo diferença na liberação de IL-8 (51).

A avaliação de citocinas no líquido também produziu resultados interessantes, porém, não conclusivos. Em um estudo piloto, pacientes com FM tiveram concentrações líquóricas e séricas mais elevadas de IL-8 quando comparada a controles saudáveis e pacientes com cefaleia e a média da concentração líquórica de IL-8 foi três vezes mais alta que a média da concentração sérica do mesmo marcador, indicando uma resposta inflamatória central envolvendo IL-8. No grupo FM houve mais baixos níveis séricos de IL-1 $\beta$ , IL-5 e TNF- $\alpha$  e não houve diferença nas concentrações no soro de IL-6 e IL-10 e tampouco nenhuma correlação dos níveis de citocina com depressão (65). Estudos anteriores descrevem o aumento líquórico de IL-8 em pacientes com neuralgia pós-herpética (44, 72), osteoartrite (46) e dor pós-operatória (73).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-8) por células da glia pode ser desencadeada por estresse, ativação imune e carga aferente nociceptiva (74). Células da glia, bem como, neurônios, expressam receptores de IL-8 (75) e injeções no SNC de CINC-1 (o equivalente a IL-8 humano em ratos) induzem hiperalgesia e comportamento de dor em modelos animais (76). Além disso, tem-se demonstrado que a IL-8 estimula a produção astrocitária de fator de crescimento do nervo (*Nerve Growth Factor*, NGF) (44), cujas concentrações são elevadas em líquido de pacientes com FM, apoiando um envolvimento de glia ativada neste distúrbio (77). Não são conhecidos mecanismos de transporte específicos para IL-8 na barreira hematoencefálica, sendo provável que as concentrações elevadas de IL-8 no líquido de pacientes com FM dependam da produção dentro do SNC, mais provavelmente pela glia ativada (65).

Notavelmente, substância P, glutamato e BDNF podem ativar as células da glia através de receptores localizados na microglia e em astrócitos (74). Seguindo a ativação, as células da glia liberam citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, bem como BDNF, NGF, glutamato e a própria substância P (74, 78, 79). Desse modo, a ativação de células da

glia pode aumentar ainda mais a amplificação da dor e, portanto, poderia estar implicada em sua modulação em pacientes com FM (79).

Ainda em 2012, um estudo controlado de Behm avaliou a produção de citocinas por células imunes através de PBMC em pacientes com FM, bem como suas concentrações plasmáticas. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, MIP1- $\alpha$  entre os grupos. Já, em PBMC, com exceção de IL-5, todas as outras interleucinas foram diminuídas. Neste estudo, a presença de depressão não teve influência nos resultados (67).

Foram investigados também os níveis de citocinas em pacientes com FM e comparados a pacientes com osteoartrose, outra doença caracterizada por dor crônica. Após ajuste para a idade, não houve diferença nos níveis de IL-6, IL-8, IL-10, IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 entre os grupos. Ainda que este não tenha sido um estudo com grupo controle hígido, ambas as doenças demonstram, em estudos comparando a sujeitos saudáveis, aumento dos níveis de citocinas (80).

O papel das citocinas na indução e manutenção da dor é bem estabelecido nos estudos em animais e também em síndromes dolorosas. Portanto, a hipótese de que pacientes com FM possam ter um desequilíbrio inato ou adquirido na produção e secreção de citocinas é plausível. No entanto, ainda é discutível se essas alterações nos níveis de citocinas são a causa da dor em FM, sua consequência ou um epifenômeno. O mais provável é que o perfil de citocinas em FM seja apenas um dos vários fatores associados à dor crônica generalizada e, eventualmente, seus padrões de expressão poderiam ajudar no diagnóstico e orientar a abordagem de tratamento adequada. A maioria dos estudos de citocinas em FM tem divergências metodológicas, havendo pouca sobreposição de materiais e métodos utilizados, não permitindo, até o momento, conclusões definitivas.

#### **3.4.1.3. Citocinas, fibromialgia e sintomas associados**

Alguns estudos têm analisado uma conexão entre níveis de citocinas e certos sintomas de FM; no entanto, novamente, os resultados não demonstram um padrão consistente.

Um antigo estudo controlado de Maes e colaboradores analisou as relações entre dor, depressão e perfil de citocinas em pacientes com FM. Não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de IL-6, sIL-6R (receptor solúvel de IL-6) e sIL-1RA (antagonista solúvel do receptor de IL-1) em pacientes com FM e controles saudáveis. No entanto, em uma análise de subgrupo, comparando os pacientes com Escala de Depressão de Hamilton (EDH)

$\geq 16$  (identificado como estado depressivo moderado a grave), pacientes com EDH de 0–15 (sem depressão a depressão leve) e voluntários sadios, houve níveis significativamente mais elevados de sIL-6R ( $p = 0,003$ ) e sIL-1RA ( $p = 0,02$ ) em portadores de FM com depressão moderada a grave. A análise de regressão múltipla demonstrou que um escore de Hamilton  $\geq 16$ , e não a FM, foi o preditor mais importante dos níveis séricos de sIL-6R e sIL-1RA (57).

Dois estudos liderados por Gür em 2002 examinaram a relação entre os níveis de citocinas, a dor e a depressão (37, 58). Em ambos, não houve diferença entre os níveis de IL-1 e IL-6 entre fibromiálgicos e controles. Menor nível de depressão foi correlacionado com maiores níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-2r em FM; no entanto, nestes estudos foram excluídos pacientes com depressão maior (37, 58). Além disso, os níveis de IL-8 foram significativamente maiores em todas as pacientes com FM independente da presença de depressão (37, 58) e se correlacionaram positivamente com a intensidade da dor em um dos estudos (37).

Um estudo de 2007 demonstrou mais altos níveis de IL-8 e IL-10 em mulheres com FM, independente da presença de distúrbio psiquiátrico. Neste estudo, os níveis de IL-10 se correlacionaram positivamente com as concentrações de IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$  e os níveis de IL-6, adicionalmente, se correlacionaram com o escore de dor e o Questionário de Impacto da Fibromialgia – *Fibromyalgia Impact Questionnaire* (FIQ). Em uma análise de subgrupo de pacientes com FM diagnosticados com depressão, houve níveis mais altos de IL-10, quando da comparação com controles (26).

É possível que a IL-10 seja liberada como um mecanismo compensatório devido ao seu papel de citocina anti-inflamatória, embora este mecanismo possa ser ineficiente, devido à persistência dos sintomas observada em pacientes com FM. Entretanto, deve ser observado que o aumento dos níveis de IL-10 se correlacionou com níveis elevados de IL-6 e TNF- $\alpha$  e a IL-10, neste caso, indicaria doença crônica ao invés de ter um efeito anti-inflamatório compensatório positivo (26).

Outro estudo analisou os níveis plasmáticos de citocinas a cada 20 minutos, durante 24 horas em pacientes com FM ( $n = 7$ ) e em controles saudáveis ( $n = 9$ ). A concentração média de IL-10 durante o sono foi significativamente superior em pacientes FM comparado a controles saudáveis; enquanto as concentrações médias de IL-10 durante a vigília e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  (sono e vigília) não diferiram entre os grupos (60). A coleta de amostras repetidas ao longo do tempo e usando um método de ensaio que permite a determinação de múltiplas citocinas possibilita determinar se citocinas pró-inflamatórias são secretadas simultânea ou separadamente a citocinas anti-inflamatórias. O



achado de que a secreção é simultânea sugere que há comunicação celular entre os sistemas (60). Citocinas pró-inflamatórias são conhecidas por terem efeitos promotores do sono, enquanto citocinas anti-inflamatórias agem interrompendo-o. Pessoas saudáveis têm aumento compensatório de citocinas pró-inflamatórias quando picos de secreção de IL-10 ocorrem; esse equilíbrio permite um sono normal e reparador. Ao contrário do que ocorre em pessoas saudáveis, os pacientes com FM têm aumento da IL-10 durante a noite, ausência de picos de citocinas pró-inflamatórias para compensar os picos noturnos de IL-10 e redução da proporção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em relação a controles, mesmo durante o dia (60).

Um estudo piloto de 2011, demonstrou elevação dos níveis de IL-8 correlacionados com piora da dor em pacientes com FM. Entretanto, as variáveis depressão, obesidade e uso de medicamentos não foram relacionadas com os marcadores imunes (63).

Outro estudo (não controlado) procurou caracterizar a relação entre sintomas de FM, biomarcadores e estado funcional em 50 mulheres com FM usando um cenário psiconeuroimunológico. Neste estudo transversal e de correlação, foram avaliados estresse, dor, fadiga, depressão, ansiedade e o estado funcional, além da análise de níveis plasmáticos de 17 citocinas (ensaio BioPlex®). Não houve correlação de ansiedade ou estado funcional com qualquer das citocinas. A escala de estresse demonstrou correlações negativas com proteína quimiotática de monócitos (MCP) e IL-1 $\beta$ . Ao mesmo tempo, a intensidade de dor se correlacionou positivamente com a proteína inflamatória de macrófagos (MIP) e negativamente com a IL-1 $\beta$ . Também houve correlação negativa entre a fadiga e IL-1 $\beta$ , IL-10 e fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF). As relações entre o estresse percebido e sintomas suportaram a hipótese de um cenário psiconeuroimunológico em FM. Níveis de depressão se correlacionaram somente com PCR neste estudo (55).

#### **3.4.1.4. Citocinas, fibromialgia e resposta terapêutica**

Um estudo controlado de 2008 avaliou a cinética de citocinas prospectivamente em pacientes com FM, avaliando, também, a resposta clínica a um tratamento medicamentoso e biopsicossocial. Antes da terapia, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-8 foram significativamente maiores em pacientes com FM, enquanto os níveis de IL-6, IL-4 e IL-10 não diferiram do grupo controle em nenhum momento do estudo. No período de tratamento, os níveis séricos de IL-8 e TNF- $\alpha$  diminuíram de forma significativa ( $p = 0,013$  e  $p = 0,005$ , respectivamente) e ao

término do estudo, os níveis circulantes de IL-8 se correlacionaram com a dor, o que não ocorreu em nenhum outro momento da pesquisa (31).

Os níveis de IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  medidos pela expressão de mRNA em leucócitos, foi analisada por Light e colaboradores antes e após exercício físico em pacientes com SFC com e sem FM. Em pacientes com SFC, a expressão de IL-10 aumentou logo após e até 48 horas depois da execução de 25 minutos de atividade física moderada, o que não ocorreu com os controles saudáveis. Não houve diferença na expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Nesta amostra (n = 19), 68% dos pacientes também preenchem critérios para FM, não permitindo distinguir se as alterações encontradas eram relacionadas à SFC ou à FM. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ . Neste estudo, os níveis séricos das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-13 aumentaram 8 horas pós-exercício apenas nos pacientes com SFC relatando maior e mais prolongado aumento da fadiga e da dor. No entanto, esses pacientes também mostraram aumento em citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12 e IL-6, sugerindo ativação imune em geral (81).

Ortega e colaboradores realizaram um estudo piloto em 14 mulheres com FM que foram submetidas a um programa de exercícios aquáticos em piscina aquecida três vezes por semana durante quatro meses e comparadas a um grupo controle de mulheres saudáveis. As pacientes com FM mostraram mais altos níveis circulantes de IL-8, IFN- $\gamma$  e PCR no início do estudo. Após a intervenção, houve uma significativa diminuição de IL-8 e PCR em FM, juntamente com uma melhora da percepção da dor corporal e qualidade de vida sugerindo um efeito anti-inflamatório dos exercícios aquáticos. Outras citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-4) não foram diferentes entre os grupos (53).

Outro estudo do mesmo grupo avaliou exercícios aquáticos em piscina aquecida por oito meses e demonstrou que a produção de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  de pacientes com FM diminuiu em relação a seu estado basal, com níveis semelhantes ao grupo controle. Ao mesmo tempo, foi demonstrada maior produção de IL-10, confirmando os efeitos anti-inflamatórios do exercício para esta patologia (66).

Recentemente, um estudo controlado do grupo de Ortega e Bote demonstrou aumento basal dos níveis de IL-8 em pacientes com FM. Após uma única sessão de exercício moderado em bicicleta ergométrica, houve redução dos níveis de IL-8 nos pacientes com FM e aumento destes níveis em sujeitos saudáveis, demonstrando que a resposta ao exercício provavelmente é diferente em fibromiálgicos. Outros dados deste estudo também demonstram que a resposta ao estresse é um forte candidato para explicar esta alteração de IL-8 (68).

Em 2014, o mesmo grupo espanhol avaliou os efeitos de exercícios nos níveis de IL-8 e noradrenalina em pacientes com FM. Vinte mulheres com FM foram selecionadas para o estudo e 10 destas foram submetidas a um programa de exercícios aquáticos regulares por oito meses e a outra metade serviu como grupo controle. Após quatro meses de exercícios, não houve modificação dos biomarcadores; entretanto, após oito meses, uma adaptação foi observada e houve redução dos níveis de IL-8 e noradrenalina, o que não ocorreu no grupo controle. Este fenômeno pode demonstrar um rearranjo anti-inflamatório que poderia estar contribuindo para os benefícios sintomáticos atribuídos aos exercícios aquáticos regulares em FM, demonstrados, neste estudo, pela melhora concomitante do FIQ (82).

#### **3.4.1.5. Citocinas e fibromialgia – considerações finais**

Resultados de estudos que avaliam a associação dos níveis de citocinas com FM e seus sintomas não demonstram um padrão consistente, o que pode ser atribuído a várias limitações.

A primeira dificuldade das análises de citocinas em pesquisa clínica é a sua variabilidade biológica inerente, que manifesta grandes amplitudes e largos desvios-padrão para seus valores. Muitos fatores como o estresse, a variação diurna, a atividade física, alterações de dieta, presença de depressão e medicações afetam os níveis de citocinas. Por isso, uma grande variação entre-sujeitos é frequentemente encontrada, dificultando sua análise. A FM é um distúrbio complexo que pode apresentar-se com uma grande variação fenotípica, o que também poderia explicar a grande variação nos resultados dos estudos.

O tempo desde o diagnóstico é outro potencial cofator relacionado à inconsistência dos achados entre citocinas e sintomas de FM, significando que, em alguns indivíduos, poderá haver “acomodação” do sistema imune, contribuindo para a variação na resposta de citocinas pró e anti-inflamatória, conforme o tempo de sintomas (26).

Uma questão importante, também, é que não há padrão ouro em relação ao método que melhor reflete a produção e o nível de citocinas. Como diversificados métodos têm sido usados para analisar diferentes citocinas em materiais diversos, uma comparação direta dos resultados é quase impossível. Outro fator complicador deste tipo de análise é a meia-vida curta das citocinas quando ligadas aos seus receptores.

Ainda, a maior parte das pesquisas envolvendo citocinas em FM não foi especificamente dirigida de acordo com uma hipótese, mas seguindo o pressuposto geral que "citocinas podem desempenhar um papel na fisiopatogenia da FM". Portanto, a maioria dos estudos exhibe uma grande variedade de citocinas sem uma hipótese clara para cada uma delas.

Estudos avaliando citocinas em FM devem ser criteriosos e diversas variáveis devem ser cuidadosamente analisadas. Não havendo padronização de método, as medidas poderiam ser realizadas por, ao menos, dois métodos diferentes. Os fatores ambientais e hábitos de vida dos pacientes devem sempre ser levados em consideração. As características clínicas da FM, como duração da doença e padrão de sintomas, devem ser incluídas como variáveis e a formulação de uma hipótese clara baseada na literatura deve ser justificada. A expressão sistêmica e local de citocinas deve ser investigada com métodos apropriados e comparadas individualmente. Baseado no que foi exposto, torna-se promissora a realização de estudos prospectivos avaliando níveis de citocinas em FM de forma longitudinal, considerando todas as possíveis variáveis.

### **3.4.2. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro - *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF)**

Fatores neurotróficos, ou família das neurotrofinas, são proteínas que atuam em uma gama de funções biológicas dentro do SNC. O Fator de Crescimento do Nervo (*Nerve Growth Factor* - NGF) foi a primeira neurotrofina a ser identificada (1966), seguida por várias outras: BDNF, fator neurotrófico derivado das células da glia (GDNF), neurotrofinas 3 (NT-3) e neurotrofina 45 (NT-45). Todas estas proteínas têm papel importante na plasticidade sináptica, arborização dendrítica e conectividade neuronal (9).

As neurotrofinas interagem com duas categorias de receptores de superfície celular: a família tirosina quinase (trk) dos receptores de alta afinidade da tirosina quinase e os receptores de neurotrofina de baixa afinidade p75 (p75NTR). O BDNF, a mais abundante e amplamente distribuída neurotrofina no SNC se liga, especificamente, aos receptores tirosina quinase B (trkB) (83, 84).

A expressão de BDNF começa precocemente no desenvolvimento e continua ao longo da vida adulta. No embrião, funções conhecidas do BDNF incluem a diferenciação de células-tronco do SNC e a regulação do desenvolvimento do tubo neural e das vias dopaminérgicas. No cérebro adulto, o BDNF contribui para a formação de aprendizagem e memória e regula a atividade locomotora e o apetite (84).

Fatores neurotróficos, que originalmente têm um conhecido papel no desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso, têm atraído a atenção devido a sua importante função em situações patológicas, incluindo muitas condições de dor crônica (83). Em particular, o BDNF

e o NGF desempenham papel significativo na nocicepção, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (85).

O NGF é considerado mediador periférico da dor, particularmente, em estados de dor inflamatória. Também tem papel na dor central, visto ser, em nível de nociceptores, um regulador da expressão de BDNF, que atua como um modulador central da dor. Além disso, moléculas neutralizadoras de NGF são analgésicos eficazes em muitos modelos de dor persistente (86, 87).

O BDNF também é sintetizado nos neurônios de gânglios da raiz dorsal, sendo armazenado em vesículas sinápticas na porção terminal destes neurônios que também contêm peptídeo relacionados ao gene da calcitonina e substância P (84). O BDNF sintetizado no gânglio da raiz dorsal é transportado para os terminais centrais das vias aferentes primárias e liberado no corno posterior da medula, se ligando ao seu receptor *trkB* no segundo neurônio. Por isso, sugere-se que o BDNF tenha função neuromodeladora da transmissão sináptica e nocicepção medular, já que o corno posterior da medula é um ponto importante de integração e processamento da informação nociceptiva e a ligação do BDNF aos seus receptores pode ativar cascatas de sinalização (83). Além disso, a liberação de BDNF no interior da medula espinhal resulta em fosforilação e potencialização dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) em neurônios medulares e isto representa um possível mecanismo pelo qual o BDNF media a sensibilização central, já que os receptores NMDA são ativados por glutamato e seu agonista endógeno, NMDA; permitindo, entre outras coisas, a transmissão da dor (83). A liberação de BDNF no gânglio da raiz dorsal induz alodinia mecânica em ratos normais semelhante a alodinia produzida por transecção isquiática. Além disso, a inibição da transdução de sinal do BDNF pode inibir a sensibilização central da dor (85).

O BDNF afeta o crescimento e a reparação neuronais e está envolvido na regulação da plasticidade sináptica dependente de atividade; como na resposta protetora ao estresse, promovendo plasticidade sináptica, o que, geralmente, é considerada a base da aprendizagem e memória. Semelhante à aprendizagem, a dor pode ser interpretada como resultado de mudanças neuroplásticas no SNC geradas pela descarga nociceptiva periférica e/ou mal funcionamento do sistema de inibição de dor descendente. Portanto, a expressão contínua de BDNF pode ser importante no desenvolvimento de estágios latentes de dor crônica (85).

### 3.4.2.1. BDNF e dor

A fisiopatologia da dor envolve os conceitos de neuroplasticidade em todos os níveis do neuroeixo. Entre os numerosos mecanismos moduladores da dor, está a alteração de BDNF como modulação central da neuroplasticidade. Estes mecanismos estão envolvidos na percepção da dor e fenômenos comportamentais e emocionais associados a ela (88). Recentemente, o papel do BDNF em estados de dor tem recebido mais atenção como um neuromediador de hiperalgesia e sensibilização central na coluna.

Um estudo demonstrou aumento significativo de BDNF sérico em pacientes com migrânea e cefaleia em *cluster*, quando comparados a pacientes com cefaleia tensional e controles saudáveis, sendo verificado, inclusive, que durante as crises de migrânea, os níveis de BDNF sérico foram significativamente maiores do que em pacientes fora de crise ou controles saudáveis (87).

De um ponto de vista fisiopatológico, enxaqueca crônica e FM são consideradas consequências de um estado de excitabilidade aumentada e de alterações neuroplásticas nos neurônios do corno posterior da medula e do núcleo caudal trigeminal, respectivamente, e, talvez, de estruturas cerebrais envolvidas no processamento da dor, resultando em dor espontânea e limiar reduzido para ativação (77).

Os efeitos do BDNF dentro do sistema nociceptivo parecem ser múltiplos. Um efeito antinociceptivo é sugerido nas vias centrais, que é suportado por estudos em animais demonstrando analgesia após administração intracerebroventricular de BDNF. Por outro lado, o BDNF media a alodinia em modelos experimentais de dor neuropática. Estes resultados contraditórios são parcialmente explicados pelo efeito dose-dependente do BDNF com baixas doses causando hiperalgesia, enquanto altas concentrações podem levar à analgesia, um efeito que pode ser induzido pela ativação de diferentes vias intracelulares (87).

Há evidências de que o BDNF também está envolvido nos estados de hipersensibilidade e dor visceral, visto ter sido encontrado aumento significativo da expressão de BDNF em biópsias de cólon de pacientes com síndrome do cólon irritável, quando comparado a controles saudáveis. Esse aumento de expressão, inclusive, se correlacionou significativamente com a gravidade e a frequência da dor/desconforto abdominal nos pacientes com a doença (89).

Sugere-se, portanto, que a dor persistente possa ser um reflexo da plasticidade neuronal, que estaria relacionada a uma excessiva neurotransmissão, sinalização intracelular anormal e disfunção dos neurônios inibitórios na medula espinhal e supraespinhal (90).

Níveis elevados de BDNF no líquido também foram encontrados em pacientes com enxaqueca crônica em comparação a controles saudáveis (77), tendo sido já evidenciado também níveis séricos maiores deste biomarcador durante a crise de enxaqueca do que em período livre de dor (91).

#### **3.4.2.2. BDNF e fibromialgia**

O BDNF e a serotonina (5-hidroxitriptamina) se corregulam entre si e têm importante papel na sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica no SNC. Estudos sugerem um envolvimento do BDNF na patogênese da depressão maior (92, 93), que é frequentemente associada a síndromes dolorosas. Além disso, o BDNF é um mediador da dor no sistema nervoso periférico (88). Tais fatos aumentam o interesse em analisar as concentrações séricas de BDNF em pacientes com FM com e sem depressão.

Resultados de estudos com neurotrofinas demonstraram que pacientes com FM têm aumento dos níveis de BDNF no soro e no líquido cefalorraquidiano.

Um estudo de 2007 demonstrou aumento dos níveis séricos médios de BDNF em pacientes com FM quando comparados a controles saudáveis, independentemente da duração da doença, idade, gênero, presença de depressão maior ou uso de medicamentos antidepressivos em dose analgésica (88). Estes resultados estão em acordo com estudo prévio que demonstrou concentrações líquóricas aumentadas de outra neurotrofina (NGF) em pacientes com FM (94).

Sarchielli e colaboradores, também em 2007, encontraram níveis líquóricos significativamente mais altos de NGF, BDNF e glutamato em pacientes com enxaqueca e FM quando comparados a controles saudáveis. Todos os biomarcadores se correlacionaram positivamente e, adicionalmente, o BDNF se associou à duração da doença (77).

Um estudo controlado de 2010 investigou mulheres com FM e demonstrou que a concentração plasmática de BDNF foi significativamente maior, sem correlação com idade, duração de doença, intensidade de dor, depressão e uso de antidepressivos, tanto em dose analgésicas quanto em doses antidepressivas (14).

Outro trabalho, em 2013, avaliou a correlação entre BDNF sérico em pacientes com FM, com a intensidade da depressão e da ansiedade. Pacientes com FM tiveram mais altos níveis de BDNF quando comparados a controles saudáveis e houve correlação positiva entre os níveis de BDNF e os escores de depressão (mas não de ansiedade) (95).

Por fim, também em 2013, Bazzicchi e colaboradores avaliaram os efeitos da balneoterapia ou banho de lama no tratamento de pacientes com FM. Além da redução da dor e melhora do FIQ, houve redução significativa das concentrações de BDNF após 12 semanas de tratamento em ambos os grupos (96).

#### **3.4.2.3. BDNF – considerações finais**

Doenças onde a dor crônica é o cerne dos sintomas, tal como a FM, são caracterizadas por uma complexa alteração nas vias nociceptivas centrais e periféricas. Elevação dos níveis centrais e periféricos de BDNF em FM e outras condições de dor crônica apontam para um possível papel desta neurotrofina nestas situações. Pode-se considerar que a regulação do BDNF é uma faceta do mecanismo adaptativo para a defesa contra a dor que, a longo prazo, poderia se converter em atividade neuroplástica exacerbada dentro da 'matriz da dor', desenvolvendo e mantendo os sintomas (85).

#### **3.4.3. Marcadores de Estresse Oxidativo**

O dano ou estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio persistente entre a produção de radicais livres e mecanismos de defesa antioxidante, levando a um nível aumentado de oxidantes (1).

Radicais livres são moléculas que contém elétrons não pareados que podem pertencer a espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas ao nitrogênio (ERN) e constituem a principal fonte de estresse oxidativo em seres vivos. Os organismos desenvolveram uma vasta gama de sistemas antioxidantes para limitar a produção de radicais livres, inativando-os e reparando o dano celular causado por eles (97).

A produção de ERO sob condições fisiológicas é essencial para a manutenção da vida e, neste contexto, as mitocôndrias são uma importante fonte de radicais livres, produzidos em complexas cadeias de transporte de elétrons (9, 98). Em baixas concentrações, as ERO funcionam como moléculas sinalizadoras, com importante papel na resposta imunológica, além de estarem envolvidas na atividade bactericida dos fagócitos, transdução de sinal, regulação do crescimento celular e variadas atividades celulares, como a mitose (10, 98).

Entretanto, altas concentrações de ERO, indicando um desequilíbrio em favor de agentes oxidantes, resultará em um estado de estresse oxidativo e consequente dano à maior parte dos componentes celulares, incluindo proteínas (enzimas, receptores), lipídios,



carboidratos e ácidos nucleicos (DNA) e, por fim, levando à apoptose (9, 10). As principais ERO incluem: radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (10).

A peroxidação lipídica, um dos principais mecanismos de dano oxidativo, reflete a reação em cadeia entre ácidos graxos poli-insaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA) e ERO produzindo peróxidos lipídicos e polímeros de carbono, que são, ambos, altamente tóxicos para a célula. Também, a oxidação proteica é um indicador precoce de dano tecidual e a formação de derivados proteicos carbonil é associada a condições patológicas em humanos e em modelos animais (99).

O sistema antioxidante é a principal linha de defesa contra o estresse oxidativo, neutralizando o excesso de ERO. Os antioxidantes podem fazer parte do sistema enzimático, compreendendo as enzimas-chave superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase ou do sistema não-enzimático, que inclui, entre muitos outros, ácido ascórbico, alfatocoferol e sua mais importante substância, a glutathione, que é o antioxidante dominante do cérebro (9, 100).

O estresse oxidativo é um dos mecanismos de lesão celular que ocorre em várias condições, como câncer, estados inflamatórios e degeneração neurológica (101). Altos níveis de estresse oxidativo têm sido implicados como o evento primário e/ou secundário em numerosas doenças como a artrite reumatoide, doenças de Parkinson e de Alzheimer, arteriosclerose, doenças cardiovasculares e diabetes (98). O nível aumentado de estresse oxidativo neuronal produz efeitos deletérios na transdução de sinal, plasticidade estrutural e resiliência celular, na maioria das vezes, por induzir a peroxidação de lipídios de membrana e dano direto a proteínas e genes (101).

Devido às ERO terem meias-vidas extremamente curtas, são difíceis de serem medidas. Por isso, é necessária a pesquisa de marcadores indiretos de estresse oxidativo e, neste sentido, várias formas de medi-lo têm sido desenvolvidas. Um indicador da intensidade de estresse oxidativo pode ser o nível ou atividade dos principais removedores (enzimáticos e não enzimáticos) de oxidantes ou os marcadores de peroxidação (dano) de lipídios, proteínas ou DNA (10). No quadro 1, estão demonstrados alguns dos marcadores de estresse oxidativo mais comumente pesquisados (4, 64, 99-104).

Quadro 1. Principais marcadores de estresse oxidativo estudados em diversas patologias

OXIDANTES	
Malondialdeído	Produto final da peroxidação de lipídios da membrana celular.
8-hidroxi-2'-deoxiguanosina	Biomarcador de dano oxidativo ao DNA.
Isoprostanos (8-iso-PGF2 $\alpha$ )	Componentes semelhantes à prostaglandinas produzidos por peroxidação (lipídica) não-enzimática do ácido araquidônico.
TBARS	Produtos secundários da peroxidação de lipídios.
Carbonil	Produto da peroxidação proteica.
PUFA	Ácidos gordurosos poli-insaturados atacados pelas ERO na membrana lipídica (peroxidação lipídica), resultando em perda da fluidez, alteração dos potenciais de membrana e, eventualmente, ruptura.
ANTIOXIDANTES	
Superóxido dismutase	Enzima que catalisa a conversão do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. É o mais importante antioxidante produzido pelo corpo.
Glutaciona peroxidase	Enzima que catalisa a redução de hidroxiperóxido por glutaciona. A principal função é proteger contra o efeito nocivo dos hidroxiperóxidos formados endogenamente.
Glutaciona redutase	Enzima que reduz glutaciona dissulfeto a glutaciona sulfidril, que é antioxidante.
Glutaciona reduzida	Medida do estado glutaciona.
Coenzima Q10	Potente antioxidante presente na membrana de todas as células do corpo e carreador de elétrons; fundamental na produção de ATP e na cadeia respiratória mitocondrial. Poderoso removedor de radicais livres.
Catalase	Enzima que catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio em água.
Ubiquinol-10	Uma das formas (reduzida) de coenzima Q10.

TBARS = *thiobarbituric acid reactive substances* - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúric

PUFA = *polyunsaturated fatty acids* – ácidos graxos poli-insaturados

ERO = espécies reativas ao oxigênio

Além dos métodos isolados citados acima, alguns autores têm utilizado a combinação de biomarcadores para estimar dano oxidativo. Dentre estes, destacam-se: o potencial antioxidante total, o estado oxidativo total e o índice de estresse oxidativo. Ainda, outra forma de medir a atividade de enzimas antioxidantes é avaliar polimorfismos dos genes que codificam estas enzimas (104).

Tal como ocorre com as citocinas, vários fatores podem influenciar a avaliação do estresse oxidativo, como estilo de vida, hábitos (dieta, tabagismo) e condições estressantes físicas e psicológicas (102).

#### **3.4.3.1. Estresse oxidativo, dor e fibromialgia**

Estudos têm mostrado que o estresse oxidativo também pode causar sensibilização periférica e central e alterar a nocicepção, gerando hiperalgesia mediada por mecanismos oxidante local e espinhal. O radical superóxido tem um importante papel no desenvolvimento da dor, por um lado alterando a nocicepção no SNC e por outro, ativando várias citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 (98). Assim, existem mecanismos pelos quais o estresse oxidativo pode contribuir para uma condição de dor crônica, como a FM.

O papel do metabolismo oxidante-antioxidante tem sido demonstrado em alguns transtornos, que também são frequentes em pacientes com FM. Os estudos sobre depressão, inclusive, elucidam a possível ligação entre esta doença e a peroxidação lipídica. Células do SNC são particularmente vulneráveis aos efeitos tóxicos dos radicais livres, quando comparadas com as de outros órgãos, porque há alta taxa de atividade metabólica oxidativa, baixo nível de enzimas antioxidantes protetoras, alto índice de área de superfície de membrana para volume citoplasmático, uma rede anatômica neuronal vulnerável a rompimento e altas concentrações de PUFAs de membrana facilmente oxidáveis (105). Além da depressão, a fadiga também parece estar associada a desequilíbrio oxidativo. Vecchiet demonstrou correlação significativa entre fadiga, aumento de estresse oxidativo e diminuição da defesa antioxidante em pacientes com SFC (106).

Há pouca informação precisa sobre a associação de estresse oxidativo e FM, mas evidências de desequilíbrio em favor de atividade oxidante têm sido demonstradas através de diferentes biomarcadores. Já, outros estudos pesquisam evidências de estresse oxidativo em modelos celulares, visto ser, este, o lugar onde a ativação e o controle da produção de ERO ocorrem. Um resumo dos resultados destes estudos pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2. Alterações de biomarcadores de estresse oxidativo em fibromialgia

<b>Primeiro autor, ano</b>	<b>Antioxidantes diminuídos</b>	<b>Oxidantes aumentados</b>
Bagis, 2005 <sup>(100)</sup>	superóxido dismutase	MDA
Altindag, 2006 <sup>(107)</sup>	capacidade antioxidante total	nível peróxido total
Ozgoçmen, 2006 <sup>(102)</sup>		TBARS
Akkuş, 2009 <sup>(108)</sup>	vitamina A vitamina E	TBARS
Sendur, 2009 <sup>(109)</sup>	glutathiona peroxidase catalase	
Cordero, 2009 <sup>(110)</sup>		TBARS Carbonil
Cordero, 2010 <sup>(111)</sup>	coenzima Q <sub>10</sub>	peroxidação lipídica
Naziroğlu, 2010 <sup>(112)</sup>		peroxidação lipídica
Topal, 2011 <sup>(64)</sup>		8-iso-PGF <sub>2α</sub>
Cordero, 2011 <sup>(113)</sup>		TBARS
Neyal, 2013 <sup>(114)</sup>	TAS	TOS OSI
Castro-Marrero, 2013 <sup>(115)</sup>	coenzima Q <sub>10</sub>	peroxidação lipídica
Miyamae, 2013 <sup>(116)</sup>	Ubiquinol-10 PUFA coenzima Q <sub>10</sub>	
La Rubia, 2013 <sup>(99)</sup>	Capacidade antioxidante total Zinco Superoxido desmutase Peroxidase glutathiona Catalase	Carbonil 8-hidroxi-2-deoxiguanosina
Bozkurt, 2014 <sup>(117)</sup>		TOS OSI
Sarifakioğlu, 2014 <sup>(118)</sup>	catalase	TBARS carbonil
<b>MODELOS CELULARES</b>		
Cordero, 2010 <sup>(111)</sup>		peróxido de hidrogênio      neutrófilos  superóxido mitocondrial      monócitos peroxidação

		lipídica	
Cordero, 2010 <sup>(110)</sup>	coenzima Q <sub>10</sub>	ERO mitocondriais	monócitos
Cordero, 2011 <sup>(113)</sup>		TBARS	monócitos
TOS = <i>total oxidative status</i> (estado oxidativo total) OSI = <i>oxidative stress index</i> (índice de estresse oxidativo) TAS = <i>total antioxidant status</i> (estado antioxidante total) ERO = espécies reativas ao oxigênio MDA = malondialdeído TBARS = <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)			

Alguns destes estudos abordam aspectos peculiares da relação entre FM e estresse oxidativo.

A FM provavelmente compartilha fisiopatogenia semelhante a outras patologias dolorosas e/ou relacionadas a ela. Dois índices criados para avaliar estresse oxidativo (TOS - *total oxidative status* e OSI – *oxidative stress index*) foram significativamente maiores em pacientes com FM e com cefaleia tensional em relação a um grupo controle ( $p = 0,001$  para ambas), sem diferença entre as patologias. No mesmo estudo, foi demonstrada diminuição do estado antioxidante total (*total antioxidant status* – TAS) nos pacientes com FM e cefaleia tensional, indicando que estados de dor crônica podem compartilhar fisiopatogenias semelhantes no que se refere ao estresse oxidativo (114). Um outro estudo avaliou, concomitantemente, FM e SFC e demonstrou que, quando comparadas a pessoas saudáveis, pacientes com ambas as doenças têm aumento de dano oxidativo (115).

A associação de FM e estresse oxidativo aparece não só em adultos, visto que Miyamae e colaboradores demonstraram diminuição de substâncias antioxidantes no plasma de pacientes com FM juvenil quando comparados a controles saudáveis (116).

Também já foi avaliada a relação entre estresse oxidativo e intensidade de sintomas em FM. O grupo de Cordero observou correlação entre marcadores de estresse oxidativo e dor, fadiga, FIQ, sono não-reparador, ansiedade e, principalmente, depressão (113).

Apesar das diversas evidências de envolvimento de estresse oxidativo na fisiopatogênese da FM, não é possível ainda confirmar esta hipótese, já que muitos outros estudos (ou partes de estudos) não demonstraram esta associação (99, 104, 117, 119).

### 3.4.3.2. Estresse oxidativo, fibromialgia e resposta terapêutica

Uma possível ligação entre FM e estresse oxidativo possibilita aventar que a suplementação antioxidante (vitaminas, omega-3, omega-6, os ácidos graxos, etc.) pode ter

valor no tratamento desta patologia. Esta hipótese baseia-se em dados de que o uso de dietas à base de plantas ou ômega-3/ácidos graxos têm sido sugeridas como causa de melhora sérica dos produtos de peroxidação, escores de dor, rigidez, depressão e qualidade do sono em pacientes com FM (105). No entanto, em um estudo de Ozgocmen em 2006, onde tratamento medicamentoso foi aplicado, houve melhora significativa dos parâmetros clínicos, mas não dos níveis de TBARS, indicando que os mecanismos associados ao estresse oxidativo podem não servir como parâmetro terapêutico ou prognóstico em FM (102).

Outro estudo, em 2010, demonstrou que, após a suplementação de vitaminas C e E e/ou exercícios, houve redução dos parâmetros de peroxidação lipídica e aumento da glutathiona reduzida e da atividade da glutathiona peroxidase, sem haver, entretanto, melhora dos sintomas de FM (112).

Recentemente, foram avaliados os efeitos de exercícios aeróbicos e de força nos níveis de estresse oxidativo em pacientes com FM e, após intervenção de 12 semanas, houve melhora dos escores clínicos de dor, FIQ e depressão, bem como, houve melhora de todos os parâmetros de estresse oxidativo (TBARS, carbonil, óxido nítrico, catalase) (118).

Apesar dos achados discordantes, recentemente, alguns estudos têm demonstrado resultados animadores em relação à terapêutica antioxidante em FM, em especial a coenzimaQ10. A coenzimaQ10 é considerada um elemento vital na cadeia respiratória mitocondrial, onde sua principal função é o transporte de elétrons entre os complexos I/II/III, além de regular o acoplamento de proteínas, o poro de transição e a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, o que a torna um importante antioxidante (98).

Cordero observou melhora significativa da cefaleia, dos sintomas clínicos e dos marcadores de estresse oxidativo após suplementação de coenzimaQ10 em pacientes com FM (103). Em FM juvenil, houve melhora dos índices de fadiga (mas não de dor) após suplementação com ubiquinol-10, uma das formas da coenzimaQ10 (116).

Um estudo randomizado controlado com placebo que utilizou coenzimaQ10 por 24 semanas em pacientes com FM evidenciou melhora dos parâmetros de estresse oxidativo, da dor, do índice FIQ e da depressão (120).

#### **3.4.3.2. Estresse oxidativo – considerações finais**

Os resultados dos estudos de estresse oxidativo em FM são consistentes com a hipótese de que existe um desequilíbrio entre a produção de ERO e o sistema de defesa antioxidante. O estresse oxidativo pode desempenhar um papel na fisiopatologia da FM, no

entanto, ainda não está claro se estas alterações são causas, consequências ou associações da doença. Tratamentos antioxidantes poderiam ser avaliados em subgrupos de pacientes com diferentes características, relacionando parâmetros clínicos e marcadores de estresse oxidativo.

O papel do estresse oxidativo na FM, do ponto de vista fisiológico, ainda não está claro e o mecanismo por que altos níveis de radicais livres, níveis baixos de antioxidantes ou ambos os processos simultaneamente podem ter efeitos sobre o agravamento dos sintomas é ainda desconhecido.

## 4. JUSTIFICATIVA

A fibromialgia tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, principalmente no que diz respeito à sua fisiopatogenia. A busca do entendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos na FM tem sido um dos grandes desafios nos estudos envolvendo esse distúrbio. Há, ainda, muita controvérsia quanto ao envolvimento de biomarcadores neste processo fisiopatogênico e esforços devem ser feitos para buscar o entendimento de seu papel na FM.

A medida de alguns biomarcadores, como citocinas, neurotrofinas e marcadores de estresse oxidativo ainda não tem um papel definido na FM. O índice de toxicidade sistêmica (ITS), que utiliza os valores séricos destas substâncias na composição de um escore único, pode ser usado como biomarcador em distúrbios psiquiátricos do humor. O ITS nunca foi medido em pacientes com FM e pode ser um potencial novo rumo nas pesquisas com este distúrbio.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo principal

O objetivo primário deste estudo foi comparar pacientes femininas com fibromialgia a mulheres saudáveis pareadas por idade quanto aos níveis séricos de interleucinas (IL-6, IL-10, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), BDNF e marcadores de estresse oxidativo (TBARS e carbonil). Dentro deste contexto, se possível, seria calculado o Índice de Toxicidade Sistêmica.

### 5.2. Objetivos secundários

Secundariamente, foram avaliadas as associações destes biomarcadores com os seguintes dados clínicos das pacientes.

- Epidemiológicos e ambientais: idade, tempo de sintomas de FM, tabagismo
- Terapêuticos: atividade física, uso de drogas antidepressivas em diversas doses e de analgésicos e anti-inflamatórios
- Depressão: presença e grau de sintomas depressivos



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Frey BN, Andreazza AC, Houenou J, Jamain S, Goldstein BI, Frye MA, et al. Biomarkers in bipolar disorder: a positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*. 2013;47(4):321-32.
2. Stertz L, Magalhaes PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Current opinion in psychiatry*. 2013;26(1):19-26.
3. Muller N. Immunology of major depression. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21(2-3):123-30.
4. Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2014;48:102-11.
5. Valkanova V, Ebmeier KP, Allan CL. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Journal of affective disorders*. 2013;150(3):736-44.
6. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosomatic medicine*. 2009;71(2):171-86.
7. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*. 2010;67(5):446-57.
8. Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2011;36(12):2452-9.
9. Pfaffenseller B, Fries GR, Wollenhaupt-Aguiar B, Colpo GD, Stertz L, Panizzutti B, et al. Neurotrophins, inflammation and oxidative stress as illness activity biomarkers in bipolar disorder. *Expert review of neurotherapeutics*. 2013;13(7):827-42.
10. Siwek M, Sowa-Kucma M, Dudek D, Styczen K, Szewczyk B, Kotarska K, et al. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(6):1558-71.
11. Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *Journal of affective disorders*. 2008;111(2-3):135-44.
12. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Molecular psychiatry*. 2010;15(8):784-6.
13. Ruiz de Azua S, Matute C, Stertz L, Mosquera F, Palomino A, de la Rosa I, et al. Plasma brain-derived neurotrophic factor levels, learning capacity and cognition in patients with first episode psychosis. *BMC psychiatry*. 2013;13:27.

14. Haas L, Portela LV, Bohmer AE, Oses JP, Lara DR. Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in patients with fibromyalgia. *Neurochemical research*. 2010;35(5):830-4.
15. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BA, Penninx BW, Elzinga BM. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Molecular psychiatry*. 2014;19(7):791-800.
16. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *Journal of psychiatric research*. 2011;45(2):156-61.
17. Clauw DJ. Fibromyalgia: a clinical review. *Jama*. 2014;311(15):1547-55.
18. Heymann RE, Paiva Edos S, Helfenstein M, Jr., Pollak DF, Martinez JE, Provenza JR, et al. Brazilian consensus on the treatment of fibromyalgia. *Revista brasileira de reumatologia*. 2010;50(1):56-66.
19. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis and rheumatism*. 1990;33(2):160-72.
20. Auvinet B, Chaleil D. Identification of subgroups among fibromyalgia patients. *Reumatismo*. 2012;64(4):250-60.
21. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis care & research*. 2010;62(5):600-10.
22. Kennedy M, Felson DT. A prospective long-term study of fibromyalgia syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(4):682-5.
23. Wolfe F, Anderson J, Harkness D, Bennett RM, Caro XJ, Goldenberg DL, et al. Health status and disease severity in fibromyalgia: results of a six-center longitudinal study. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(9):1571-9.
24. Alciati A, Sgiarovello P, Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Psychiatric problems in fibromyalgia: clinical and neurobiological links between mood disorders and fibromyalgia. *Reumatismo*. 2012;64(4):268-74.
25. Paiva ES, da Costa ED, Scheinberg M. Fibromyalgia: an update and immunological aspects. *Current pain and headache reports*. 2008;12(5):321-6.
26. Bazzichi L, Rossi A, Massimetti G, Giannaccini G, Giuliano T, De Feo F, et al. Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. *Clinical and experimental rheumatology*. 2007;25(2):225-30.

27. Staud R. Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(3):208.
28. Staud R, Weyl EE, Riley JL, 3rd, Fillingim RB. Slow temporal summation of pain for assessment of central pain sensitivity and clinical pain of fibromyalgia patients. *PLoS one*. 2014;9(2):e89086.
29. Harris RE, Clauw DJ, Scott DJ, McLean SA, Gracely RH, Zubieta JK. Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(37):10000-6.
30. Uceyler N, Valenza R, Stock M, Schedel R, Sprotte G, Sommer C. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(8):2656-64.
31. Wang H, Moser M, Schiltenwolf M, Buchner M. Circulating cytokine levels compared to pain in patients with fibromyalgia -- a prospective longitudinal study over 6 months. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(7):1366-70.
32. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
33. Bhide AA, Cartwright R, Khullar V, Digesu GA. Biomarkers in overactive bladder. *International urogynecology journal*. 2013;24(7):1065-72.
34. Ablin JN, Buskila D, Clauw DJ. Biomarkers in fibromyalgia. *Current pain and headache reports*. 2009;13(5):343-9.
35. Wallace DJ. Is there a role for cytokine based therapies in fibromyalgia. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(1):17-22.
36. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*. 2007;45(2):27-37.
37. Gur A, Karakoc M, Nas K, Remzi, Cevik, Denli A, et al. Cytokines and depression in cases with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2002;29(2):358-61.
38. Alexander GM, van Rijn MA, van Hilten JJ, Perreault MJ, Schwartzman RJ. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain*. 2005;116(3):213-9.
39. Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, et al. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology*. 2001;56(10):1371-7.
40. Koch A, Zacharowski K, Boehm O, Stevens M, Lipfert P, von Giesen HJ, et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2007;56(1):32-7.

41. Rozen T, Swidan SZ. Elevation of CSF tumor necrosis factor alpha levels in new daily persistent headache and treatment refractory chronic migraine. *Headache*. 2007;47(7):1050-5.
42. Backonja MM, Coe CL, Muller DA, Schell K. Altered cytokine levels in the blood and cerebrospinal fluid of chronic pain patients. *Journal of neuroimmunology*. 2008;195(1-2):157-63.
43. Brisby H, Olmarker K, Larsson K, Nutu M, Rydevik B. Proinflammatory cytokines in cerebrospinal fluid and serum in patients with disc herniation and sciatica. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2002;11(1):62-6.
44. Kotani N, Kudo R, Sakurai Y, Sawamura D, Sessler DI, Okada H, et al. Cerebrospinal fluid interleukin 8 concentrations and the subsequent development of postherpetic neuralgia. *The American journal of medicine*. 2004;116(5):318-24.
45. Ludwig J, Binder A, Steinmann J, Wasner G, Baron R. Cytokine expression in serum and cerebrospinal fluid in non-inflammatory polyneuropathies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2008;79(11):1268-73.
46. Lundborg C, Hahn-Zoric M, Biber B, Hansson E. Glial cell line-derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid but decreased in blood during long-term pain. *Journal of neuroimmunology*. 2010;220(1-2):108-13.
47. Nakamura T, Schwander SK, Donnelly R, Ortega F, Togo F, Broderick G, et al. Cytokines across the night in chronic fatigue syndrome with and without fibromyalgia. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17(4):582-7.
48. Lee BS, Jun IG, Kim SH, Park JY. Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. *Journal of Korean medical science*. 2013;28(2):308-14.
49. Wallace DJ, Margolin K, Waller P. Fibromyalgia and interleukin-2 therapy for malignancy. *Annals of internal medicine*. 1988;108(6):909.
50. Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hallegua D, Silverman S, Silver D, Weisman MH. Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology*. 2001;40(7):743-9.
51. Bote ME, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. Inflammatory/stress feedback dysregulation in women with fibromyalgia. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(6):343-51.
52. Malhotra D, Saxena AK, Dar SA, Kumar V, Nasare N, Tripathi AK, et al. Evaluation of Cytokine Levels in Fibromyalgia Syndrome Patients and its Relationship to the Severity of Chronic Pain. *Journal of Musculoskeletal Pain*. 2012;20(3):164-9.

53. Ortega E, Garcia JJ, Bote ME, Martin-Cordero L, Escalante Y, Saavedra JM, et al. Exercise in fibromyalgia and related inflammatory disorders: known effects and unknown chances. *Exercise immunology review*. 2009;15:42-65.
54. Xiao Y, Haynes WL, Michalek JE, Russell IJ. Elevated serum high-sensitivity C-reactive protein levels in fibromyalgia syndrome patients correlate with body mass index, interleukin-6, interleukin-8, erythrocyte sedimentation rate. *Rheumatology international*. 2013;33(5):1259-64.
55. Menzies V, Lyon DE, Elswick RK, Jr., Montpetit AJ, McCain NL. Psychoneuroimmunological relationships in women with fibromyalgia. *Biological research for nursing*. 2013;15(2):219-25.
56. Amel Kashipaz MR, Swinden D, Todd I, Powell RJ. Normal production of inflammatory cytokines in chronic fatigue and fibromyalgia syndromes determined by intracellular cytokine staining in short-term cultured blood mononuclear cells. *Clinical and experimental immunology*. 2003;132(2):360-5.
57. Maes M, Libbrecht I, Van Hunsel F, Lin AH, De Clerck L, Stevens W, et al. The immune-inflammatory pathophysiology of fibromyalgia: increased serum soluble gp130, the common signal transducer protein of various neurotrophic cytokines. *Psychoneuroendocrinology*. 1999;24(4):371-83.
58. Gur A, Karakoc M, Erdogan S, Nas K, Cevik R, Sarac AJ. Regional cerebral blood flow and cytokines in young females with fibromyalgia. *Clinical and experimental rheumatology*. 2002;20(6):753-60.
59. Salemi S, Rethage J, Wollina U, Michel BA, Gay RE, Gay S, et al. Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2003;30(1):146-50.
60. Togo F, Natelson BH, Adler GK, Ottenweller JE, Goldenberg DL, Struzik ZR, et al. Plasma cytokine fluctuations over time in healthy controls and patients with fibromyalgia. *Experimental biology and medicine*. 2009;234(2):232-40.
61. Menzies V, Lyon DE. Integrated review of the association of cytokines with fibromyalgia and fibromyalgia core symptoms. *Biological research for nursing*. 2010;11(4):387-94.
62. Blanco I, Beritze N, Arguelles M, Carcaba V, Fernandez F, Janciauskiene S, et al. Abnormal overexpression of mastocytes in skin biopsies of fibromyalgia patients. *Clinical rheumatology*. 2010;29(12):1403-12.
63. Ang DC, Moore MN, Hilligoss J, Tabbey R. MCP-1 and IL-8 as pain biomarkers in fibromyalgia: a pilot study. *Pain medicine*. 2011;12(8):1154-61.
64. Topal G, Donmez A, Dogan BS, Kucur M, Cengiz DT, Berkoz FB, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels are increased in patients with fibromyalgia: correlation with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and 8-iso-prostaglandin F(2alpha) (8-iso-PGF(2alpha)). *Clinical biochemistry*. 2011;44(5-6):364-7.

65. Kadetoff D, Lampa J, Westman M, Andersson M, Kosek E. Evidence of central inflammation in fibromyalgia-increased cerebrospinal fluid interleukin-8 levels. *Journal of neuroimmunology*. 2012;242(1-2):33-8.
66. Ortega E, Bote ME, Giraldo E, Garcia JJ. Aquatic exercise improves the monocyte pro- and anti-inflammatory cytokine production balance in fibromyalgia patients. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2012;22(1):104-12.
67. Behm FG, Gavin IM, Karpenko O, Lindgren V, Gaitonde S, Gashkoff PA, et al. Unique immunologic patterns in fibromyalgia. *BMC clinical pathology*. 2012;12:25.
68. Bote ME, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. Fibromyalgia: anti-inflammatory and stress responses after acute moderate exercise. *PloS one*. 2013;8(9):e74524.
69. Sturgill J, McGee E, Menzies V. Unique cytokine signature in the plasma of patients with fibromyalgia. *Journal of immunology research*. 2014;2014:938576.
70. Wang H, Weber A, Schiltenswolf M, Amelung D. [Attachment style and cytokine levels in patients with fibromyalgia : A prospective longitudinal study]. *Schmerz*. 2014;28(5):504-12.
71. Uceyler N, Kewenig S, Kafke W, Kittel-Schneider S, Sommer C. Skin cytokine expression in patients with fibromyalgia syndrome is not different from controls. *BMC neurology*. 2014;14(1):185.
72. Kikuchi A, Kotani N, Sato T, Takamura K, Sakai I, Matsuki A. Comparative therapeutic evaluation of intrathecal versus epidural methylprednisolone for long-term analgesia in patients with intractable postherpetic neuralgia. *Regional anesthesia and pain medicine*. 1999;24(4):287-93.
73. Buvanendran A, Kroin JS, Berger RA, Hallab NJ, Saha C, Negrescu C, et al. Upregulation of prostaglandin E2 and interleukins in the central nervous system and peripheral tissue during and after surgery in humans. *Anesthesiology*. 2006;104(3):403-10.
74. Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(1):23-36.
75. Yamamoto J, Nishiyori A, Takami S, Ohtani Y, Minami M, Satoh M. A hyperalgesic effect of intracerebroventricular cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in the rat paw pressure test. *European journal of pharmacology*. 1998;363(2-3):131-3.
76. Ahn DK, Lee KR, Lee HJ, Kim SK, Choi HS, Lim EJ, et al. Intracisternal administration of chemokines facilitated formalin-induced behavioral responses in the orofacial area of freely moving rats. *Brain research bulletin*. 2005;66(1):50-8.
77. Sarchielli P, Mancini ML, Floridi A, Coppola F, Rossi C, Nardi K, et al. Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(9):737-45.

78. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annual review of neuroscience*. 2001;24:1217-81.
79. Watkins LR, Maier SF. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. *Journal of internal medicine*. 2005;257(2):139-55.
80. Imamura M, Targino RA, Hsing WT, Imamura S, Azevedo RS, Boas LS, et al. Concentration of cytokines in patients with osteoarthritis of the knee and fibromyalgia. *Clinical interventions in aging*. 2014;9:939-44.
81. Light AR, White AT, Hughen RW, Light KC. Moderate exercise increases expression for sensory, adrenergic, and immune genes in chronic fatigue syndrome patients but not in normal subjects. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009;10(10):1099-112.
82. Bote ME, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. An exploratory study of the effect of regular aquatic exercise on the function of neutrophils from women with fibromyalgia: role of IL-8 and noradrenaline. *Brain, behavior, and immunity*. 2014;39:107-12.
83. Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neuroscience research*. 2006;55(1):1-10.
84. Frias B, Allen S, Dawbarn D, Charrua A, Cruz F, Cruz CD. Brain-derived neurotrophic factor, acting at the spinal cord level, participates in bladder hyperactivity and referred pain during chronic bladder inflammation. *Neuroscience*. 2013;234:88-102.
85. Nugraha B, Karst M, Engeli S, Gutenbrunner C. Brain-derived neurotrophic factor and exercise in fibromyalgia syndrome patients: a mini review. *Rheumatology international*. 2012;32(9):2593-9.
86. Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annual review of neuroscience*. 2006;29:507-38.
87. Fischer M, Wille G, Klien S, Shanib H, Holle D, Gaul C, et al. Brain-derived neurotrophic factor in primary headaches. *The journal of headache and pain*. 2012;13(6):469-75.
88. Laske C, Stransky E, Eschweiler GW, Klein R, Wittorf A, Leyhe T, et al. Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants. *Journal of psychiatric research*. 2007;41(7):600-5.
89. Joo YE. Increased Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor in Irritable Bowel Syndrome and Its Correlation With Abdominal Pain (*Gut* 2012;61:685-694). *Journal of neurogastroenterology and motility*. 2013;19(1):109-11.
90. Yamamoto S, Kishishita Y, Yoshida M, Miura D, Suzuki H, Ishikawa K, et al. Activation of different signals identified with glia cells contribute to the progression of hyperalgesia. *Cellular and molecular neurobiology*. 2013;33(2):167-74.

91. Tanure MT, Gomez RS, Hurtado RC, Teixeira AL, Domingues RB. Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor during migraine attacks: a pilot study. *The journal of headache and pain*. 2010;11(5):427-30.
92. Angelucci F, Mathe AA, Aloe L. Neurotrophic factors and CNS disorders: findings in rodent models of depression and schizophrenia. *Progress in brain research*. 2004;146:151-65.
93. Laske C, Eschweiler GW. [Brain-derived neurotrophic factor: from nerve growth factor to modulator of brain plasticity in cognitive processes and psychiatric diseases]. *Der Nervenarzt*. 2006;77(5):523-37.
94. Giovengo SL, Russell IJ, Larson AA. Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(7):1564-9.
95. Nugraha B, Korallus C, Gutenbrunner C. Serum level of brain-derived neurotrophic factor in fibromyalgia syndrome correlates with depression but not anxiety. *Neurochemistry international*. 2013;62(3):281-6.
96. Bazzichi L, Da Valle Y, Rossi A, Giacomelli C, Sernissi F, Giannaccini G, et al. A multidisciplinary approach to study the effects of balneotherapy and mud-bath therapy treatments on fibromyalgia. *Clinical and experimental rheumatology*. 2013;31(6 Suppl 79):S111-20.
97. Iqbal R, Mughal MS, Arshad N, Arshad M. Pathophysiology and antioxidant status of patients with fibromyalgia. *Rheumatology international*. 2011;31(2):149-52.
98. Cordero MD. [Oxidative stress in fibromyalgia: pathophysiology and clinical implications]. *Reumatologia clinica*. 2011;7(5):281-3.
99. La Rubia M, Rus A, Molina F, Del Moral ML. Is fibromyalgia-related oxidative stress implicated in the decline of physical and mental health status? *Clinical and experimental rheumatology*. 2013;31(6 Suppl 79):S121-7.
100. Bagis S, Tamer L, Sahin G, Bilgin R, Guler H, Ercan B, et al. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatology international*. 2005;25(3):188-90.
101. Pedrini M, Massuda R, Fries GR, de Bittencourt Pasquali MA, Schnorr CE, Moreira JC, et al. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *Journal of psychiatric research*. 2012;46(6):819-24.
102. Ozgocmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O, Ardicoglu O, Yildizhan H. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide in fibromyalgia: etiologic and therapeutic concerns. *Rheumatology international*. 2006;26(7):598-603.
103. Cordero MD, Cano-Garcia FJ, Alcocer-Gomez E, De Miguel M, Sanchez-Alcazar JA. Oxidative stress correlates with headache symptoms in fibromyalgia: coenzyme Q(1)(0) effect on clinical improvement. *PloS one*. 2012;7(4):e35677.



104. Akbas A, Inanir A, Benli I, Onder Y, Aydogan L. Evaluation of some antioxidant enzyme activities (SOD and GPX) and their polymorphisms (MnSOD2 Ala9Val, GPX1 Pro198Leu) in fibromyalgia. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2014;18(8):1199-203.
105. Ozgocmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O. Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide. *Rheumatology international*. 2006;26(7):585-97.
106. Vecchiet J, Cipollone F, Falasca K, Mezzetti A, Pizzigallo E, Bucciarelli T, et al. Relationship between musculoskeletal symptoms and blood markers of oxidative stress in patients with chronic fatigue syndrome. *Neuroscience letters*. 2003;335(3):151-4.
107. Altindag O, Celik H. Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia. *Redox report : communications in free radical research*. 2006;11(3):131-5.
108. Akkus S, Naziroglu M, Eris S, Yalman K, Yilmaz N, Yener M. Levels of lipid peroxidation, nitric oxide, and antioxidant vitamins in plasma of patients with fibromyalgia. *Cell biochemistry and function*. 2009;27(4):181-5.
109. Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, Yenisey C, Serter M. Serum antioxidants and nitric oxide levels in fibromyalgia: a controlled study. *Rheumatology international*. 2009;29(6):629-33.
110. Cordero MD, Moreno-Fernandez AM, deMiguel M, Bonal P, Campa F, Jimenez-Jimenez LM, et al. Coenzyme Q10 distribution in blood is altered in patients with fibromyalgia. *Clinical biochemistry*. 2009;42(7-8):732-5.
111. Cordero MD, De Miguel M, Moreno Fernandez AM, Carmona Lopez IM, Garrido Maraver J, Cotan D, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(1):R17.
112. Naziroglu M, Akkus S, Soyupek F, Yalman K, Celik O, Eris S, et al. Vitamins C and E treatment combined with exercise modulates oxidative stress markers in blood of patients with fibromyalgia: a controlled clinical pilot study. *Stress*. 2010;13(6):498-505.
113. Cordero MD, Alcocer-Gomez E, Cano-Garcia FJ, De Miguel M, Carrion AM, Navas P, et al. Clinical symptoms in fibromyalgia are better associated to lipid peroxidation levels in blood mononuclear cells rather than in plasma. *PLoS one*. 2011;6(10):e26915.
114. Neyal M, Yimenicioglu F, Aydeniz A, Taskin A, Saglam S, Cekmen M, et al. Plasma nitrite levels, total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with tension-type headache and fibromyalgia. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2013;115(6):736-40.
115. Castro-Marrero J, Cordero MD, Saez-Francas N, Jimenez-Gutierrez C, Aguilar-Montilla FJ, Aliste L, et al. Could mitochondrial dysfunction be a differentiating marker between chronic fatigue syndrome and fibromyalgia? *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(15):1855-60.

116. Miyamae T, Seki M, Naga T, Uchino S, Asazuma H, Yoshida T, et al. Increased oxidative stress and coenzyme Q10 deficiency in juvenile fibromyalgia: amelioration of hypercholesterolemia and fatigue by ubiquinol-10 supplementation. *Redox report : communications in free radical research*. 2013;18(1):12-9.
117. Bozkurt M, Caglayan M, Oktayoglu P, Em S, Batmaz I, Sariyildiz MA, et al. Serum prolidase enzyme activity and oxidative status in patients with fibromyalgia. *Redox report : communications in free radical research*. 2014;19(4):148-53.
118. Sarifakioglu B, Guzelant AY, Guzel EC, Guzel S, Kiziler AR. Effects of 12-week combined exercise therapy on oxidative stress in female fibromyalgia patients. *Rheumatology international*. 2014;34(10):1361-7.
119. Chung CP, Titova D, Oeser A, Randels M, Avalos I, Milne GL, et al. Oxidative stress in fibromyalgia and its relationship to symptoms. *Clinical rheumatology*. 2009;28(4):435-8.
120. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Effect of oral coenzyme Q10 supplementation on clinical symptoms and oxidative stress in fibromyalgia patients: a randomized trial. *Ann Rheum Dis* 2014;73:288-89.

## 7. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

### **EVALUATION OF CYTOKINES, OXIDATIVE STRESS MARKERS AND BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR IN PATIENTS WITH FIBROMYALGIA – A CONTROLLED CROSS-SECTIONAL STUDY**

**Aline Ranzolin,<sup>1,2</sup> MD, PhD; Angela Luzia Branco Pinto Duarte,<sup>2</sup> MD, PhD; Markus Bredemeier,<sup>3</sup> MD, PhD; Cláudio Antônio da Costa Neto,<sup>2</sup> Medical Student; Bruna Maria Ascoli,<sup>4</sup> Pharmacist, MSc; Bianca Wollenhaupt-Aguiar,<sup>4</sup> Biomedical Scientist, MSc; Flávio Kapczinski,<sup>4</sup> MD, PhD; Ricardo Machado Xavier<sup>1</sup>, MD, PhD.**

<sup>1</sup>Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Division of Rheumatology of the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

<sup>3</sup>Division of Rheumatology of the Hospital Nossa Senhora da Conceição – Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Bipolar Disorders Program and INCT Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Supported in part by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

Address correspondence to Aline Ranzolin, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350 sala 645, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

Telephone number: 55 51 33598340. Fax number: 55 51 33313834

E-mail address: [aliranzolin@hotmail.com](mailto:aliranzolin@hotmail.com)

## ABSTRACT

**Background.** Altered biomarkers of inflammation/oxidative stress and high neurotrophins levels are associated with mood disturbance. The relationship between these substances made possible the creation of a Systemic Toxicity Index (STI) in psychiatric disorders. Mood disturbance, especially depression is found in most of the patients with fibromyalgia (FM).

**Objective.** Investigate the levels of serum cytokines (IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$ ), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and stress oxidative biomarkers (carbonyl and thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) in FM women, compare to age-matched healthy female controls and calculate the STI, if possible.

**Methods.** A cross-sectional study evaluated 69 FM patients and 61 controls. Blood samples were analyzed quantitatively for serum concentrations of cytokines IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  by flow cytometry; BDNF was measured with commercial sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits; TBARS were determined spectrophotometrically and the oxidative damage to proteins was measured by the determination of carbonyl groups (protein carbonyl content). Additionally, in the FM group, we applied the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), the Beck Depression Inventory (BDI) and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) to verify the relation between the biomarkers and the level of quality of life and depression in this group. Statistical tests for correlation among the biomarkers were conducted to estimate the STI.

**Results.** Age was similar between groups ( $44.5 \pm 6.4$  years in FM and  $44.0 \pm 6.7$  in controls;  $p = 0.613$ ). The FM patients had long disease duration ( $8.5 \pm 6.5$  years) and the impact on quality of life, measured by FIQ, was significant ( $70.2 \pm 17.8$ ) in this sample. Most of the FM patients had depression in certain level (82.6% in BDI and 87.0% in HDRS). The serum IL-10 levels were significantly higher in FM patients ( $p = 0.006$ ), but other cytokines, BDNF and oxidative stress biomarkers did not differ between the groups. However, there was no correlation between any of the biomarkers tested, and therefore it was not possible to calculate the STI.

**Conclusion.** We observed no significant association between biomarkers and FM, except for higher levels of IL-10, a finding that deserves further evaluation. The absence of correlation between the biomarkers did not allow the calculation of the systemic toxicity index in patients with FM. The variability of the findings among studies involving biomarkers in FM indicates that this is a disease with complex pathophysiology and additional research is needed with larger number of patients and biomarkers to homogenize the evidence.

**Keywords:** Fibromyalgia, Interleukins, BDNF, Oxidative stress, Depression

## INTRODUCTION

Fibromyalgia (FM) is a common disease, affecting 2-8% of general population (17), but with a complex and not completely known pathophysiology. Apart from the pain, the cornerstone symptom of FM, many other features are frequently present in the disease context, such as fatigue, sleep disturbance, anxiety and depression.

Studies investigating peripheral biomarkers in mood disorders have demonstrated that depression, as well as other psychiatric diseases, are associated with alterations in the cytokines profile, neurotrophins and oxidative stress markers (9). The relationship between these biomarkers has also been studied and it was possible to create a Systemic Toxicity Index (STI) for mood disorders, especially bipolar one. As these peripheral markers cluster together, the authors extracted an index from the variance shared by inflammation, oxidative stress and neurotrophins. This systemic summary variable sharply differentiated patients with mania or depression from healthy control subjects. (121) Considering that mood disturbances are found in most patients with FM, searching these biomarkers in this context of widespread chronic pain is relevant.

The lack of reliable biomarkers in FM is one of the limitations of the studies in this disorder. However, several recent scientific findings have examined the association of many different isolated biomarkers with FM. Alterations in some pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were observed in the blood of FM patients, including interleukins (IL), such as IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, IL-2 and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) (31, 51, 63-66, 68, 70). Increase of neurotrophins levels, mainly brain-derived neurotrophic factor (BDNF), was found in blood and cerebrospinal fluid (CSF) of FM patients (14, 77, 88, 95, 96). Finally, there is a lot of evidence of increased oxidative stress in FM, measured by serum biomarkers like protein carbonyl content and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) (99, 102, 108, 110, 113, 118).

In the present study we investigated whether concentrations of cytokines (IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$ ), BDNF and stress oxidative biomarkers (carbonyl and TBARS) are altered in peripheral blood of patients with FM and compared their levels to those observed in age-matched healthy controls. The relationship between these substances, not yet evaluated in earlier studies, was tested for the purpose of calculating the STI for patients with FM.

Additionally, we applied the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), the Beck Depression Inventory (BDI) and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) to verify the relation between the biomarkers and the level of quality of life and depression, respectively, in FM patients.

## **PATIENTS AND METHODS**

**Study design and participants.** A controlled cross-sectional study was conducted in the Rheumatology Departments at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The period of patients recruitment and blood sample and data collection was between Sep/2011 and Nov/2012.

The patients were consecutively selected from the outpatient clinic specialized in attendance of fibromyalgia patients at the HC/UFPE, where all subjects have the diagnosis of FM according to the American College of Rheumatology 1990 and 2010 criteria (19, 21). Subjects in the FM group were required to be women with age between 30 and 55 years, and were not selected if they had any of the following exclusion criteria: 1) current pregnancy or nursing; 2) presence of any concomitant autoimmune, inflammatory or infectious disease; and 3) diagnosed psychiatric illnesses, except depression and/or anxiety.

Control women, recruited among the hospital's employees of HC/UFPE and could not have any kind of chronic or acute pain. The controls were selected among the volunteers to form a group that matches the mean age of the patients. The control group had to follow the same exclusion criteria of FM patients, except that they could not have depression and/or anxiety.

The samples were all analyzed at the Molecular Psychiatry Laboratory at HCPA in Feb/2013. Written informed consent was obtained from each subject before their participation and all experimental procedures were performed in accordance with and approved by the local ethics committee in both institutions (HC/UFPE and HCPA).

**Study protocol and blood sample collection.** Each FM group subject was evaluated in two sequential stages during a single visit. First, an interviewer carried out the specific procedure of the study protocol, registering demographic, clinical and therapeutic aspects of the patient and the disease. After that, the same interviewer completed the FIQ, and BDI questionnaires, which are validated for application to Brazilian patients (122, 123), and HDRS (124). For the control group, a brief interview and a simple clinical exam were done to evaluate the inclusion and exclusion criteria.

After these procedures, for each subject of the study, the blood samples were collected (10mL) into an anticoagulant-free vacuum tube. All serum samples were collected in the afternoon, between 01:00 p.m. and 02:00 p.m. The blood was centrifuged (4000 rpm for 10 minutes) for separation of serum, and the specimens were immediately aliquoted, frozen and stored at -80°C. All samples were tested in a single run to reduce interassay variability.

**Cytokines assays.** The concentration of serum cytokines was determined by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Enhanced Sensitivity Flex Sets for Human IL-10, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  (BD Biosciences, San Diego, CA). Sample processing and data analysis were performed according to the manufacturer's instructions. Data were acquired by using a FACSCalibur flow cytometer™ (BD Biosciences, San Diego, CA) and results were generated by using the BD CBA Analysis Software FCAP Array™ (BD Biosciences, San Diego, CA). The results are expressed in fg/mL.

**Measurement of BDNF serum concentration.** The BDNF was measured in serum samples with commercial sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Chemicon, USA) according to the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 450nm and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg/mL of BDNF. The results are expressed in ng/mL.

**Measurement of oxidative stress biomarkers (carbonyl, TBARS).** The levels of lipid peroxidation were measured by the method of TBARS, using TBARS assay kit (Cayman Company, Ann Arbor), according to the manufacturer's instructions. In this method, the quantification of lipid peroxidation products is performed by serum formation of substances reacting to 2-thiobarbituric acid (TBA), which is the analysis of the final products of lipid peroxidation (lipid peroxides, malondialdehyde and other aldehydes of low molecular weight) that react with TBA to form Schiff bases. These complexes exhibit color and its concentration can be determined spectrophotometrically at 535nm. The results are expressed in  $\mu$ M of malondialdehyde (MDA).

The oxidative damage to proteins was measured by the determination of carbonyl groups (protein carbonyl content; PCC) based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described (125).

**Statistical analysis.** All results are expressed as numbers and percentages for categorical variables, while continuous variables were presented as means  $\pm$  standard deviation (SD) and/or median and interquartile range (IQR). The unpaired Student's t test (variables with normal distribution) or Mann-Whitney test (non-normal variables) were used to evaluate the statistical significance of differences between groups. For correlation among biomarkers

themselves and between biomarkers and clinical parameters, Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ) or Pearson correlation coefficient ( $r$ ) were used. The level of statistical significance was set at  $p < 0,05$ . When a statistically significant  $p$  value was found, Bonferroni correction considering the number of substances tested was applied.

In the original psychiatric study the peripheral markers (interleukins, neurotrophins and oxidative stress markers) clustered together and the STI was extracted from the shared variance by these biomarkers correlated with mood episodes in bipolar disorder as a proxy of systemic toxicity. To this end, it was done a principal component analysis (PCA) in an exploratory characteristic and the STI was the measure of the correlation derived empirically from the variables (12, 121).

## RESULTS

Among 130 women included in the study, 69 were FM patients. Age was similar between groups ( $44.5 \pm 6.4$  years in FM and  $44.0 \pm 6.7$  in controls;  $p = 0.613$ ). The clinical data of FM patients can be found in Table 1. The FM patient had long disease duration (more than 8 years in average) and almost half were using antidepressant drugs. The overall impact of FM on quality of life, measured by FIQ was high (mean  $70.2 \pm 17.8$ , where values between 50 to 70 indicates moderate impact and values  $> 70$  indicates severe impact of the FM) in this sample. Most of FM patients had depression in some level (82.5% by BDI and 87.0% by HDRS) and a considerable percentage of FM patients had moderate or severe/extreme depression (46.3% by BDI and 58% by HDRS).

Table 1. Clinical characteristics of fibromyalgia group

	Fibromyalgia group (n=69)
Age, mean $\pm$ SD years	$44.5 \pm 6.4$
Duration of FM, mean $\pm$ SD years	$8.5 \pm 6.5$
FIQ, mean $\pm$ SD years	$70.2 \pm 17.8$
Regular physical activity	19 (27.5%)
Antiinflammatory drugs use	8 (11.6%)
Active smoking	7 (10.1%)
Antidepressive use	31 (44.9%)
Level of depression (n, %)	



BDI	
Normal	12 (17.4%)
Mild mood disturbance	14 (20.3%)
Borderline clinical depression	11 (15.9%)
Moderate depression	18 (26.0%)
Severe depression	10 (14.5%)
Extreme depression	4 (5.8%)
HDRS	
Normal	9 (13.0%)
Mild depression	20 (29.0%)
Moderate depression	16 (23.2%)
Severe depression	12 (17.4%)
Very severe depression	12 (17.4%)

SD = standard deviation

FIQ = Fibromyalgia Impact Questionnaire

BDI = Beck Depression Inventory

HDRS = Hamilton Depression Rating Scale

The comparison of the levels of the biomarkers analyzed in this study is demonstrated in Table 2. The IL-10 levels were significantly higher in FM patients, but other cytokines, BDNF and oxidative stress biomarkers did not differ between the groups. As additional information, the mean  $\pm$  standard deviation (SD) are shown in additional table.

Table 2. Comparison of oxidative stress markers, BDNF and cytokines in FM patients and healthy controls

	FM patients (n=69)	Healthy controls (n=61)	p value*
	median (IQR)	median (IQR)	
Oxidative stress biomarkers			
TBARS ( $\mu$ M of MDA)	13.2 (9.8, 20.5)	14.4 (8.7, 29.2)	0.808
Carbonyl (nmol/mg)	0.019 (0.015, 0.022)	0.021 (0.015, 0.027)	0.132
BDNF (ng/mL)	30.8 (21.8, 37.1)	30.7 (21.1, 35.4)	0.595
Cytokines (fg/mL)			
IL-6	1498.7 (743.5, 2595.6)	1077.1 (720.0, 2119.1)	0.128
IL-10	593.5 (348.4, 890.2)	441.4 (266.6, 569.8)	0.006

IL-8	5937.7 (3957.8, 9071.9)	6318.0 (4303.2, 9213.2)	0.803
TNF- $\alpha$	187.3 (145.7, 670.3)	187.3 (76.1, 352.9)	0.255

\*Mann-Whitney test; the p value is not adjusted for multiple comparisons. The Bonferroni corrected P value is 0.041 considering the performance of 7 independent test.

IQR: interquartile range

FM: fibromyalgia

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

MDA: malondialdehyde

IL: interleukins

TNF: tumor necrosis factor

There was no significant correlation between the biomarkers' level between themselves and therefore, the calculation of the STI was not possible. Also there was no correlation between any of the studied biomarkers with therapeutic or clinical data, life habits, such as exercise practice, smoking and use of anti-inflammatory drugs, nor with the FIQ and the Hamilton and Beck's depression scales.

## DISCUSSION

Fibromyalgia must be recognized as a complex and heterogeneous condition characterized by a disorder in the pain processing associated with other defined secondary symptoms and worse quality of life (18). The prevalence of mood disturbance in FM is over three times higher than in general population (24) and major depressive disorder has a lifetime prevalence in FM of 62-86% (126). The mean value of FIQ in patients was 70.2, demonstrating that our FM group had a moderate impact on quality of life, despite the treatment. Moderate and/or severe/extreme depression were found in a significant percentage (46.3% by BDI and 58% by HDSR) of our patients, demonstrating the disabling profile of the disease in patients attended at tertiary centers of rheumatology.

Mood diturbance has been related to altered levels of some biomarkers in previous studies. Two meta-analysis showed that significant higher concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  are found in patients with major depression (6, 7). Several substances linked to an increase of oxidative stress have been shown to be altered in depression (4), as well as the BDNF, a neurotrophin involved in essential functions in central nervous system (15). Some authors have proposed that these substances could be studied at the same time, considering their complex relationship. Kapczinski and colleagues conducted, in patients with mood disorders,

an *en bloc* assesment of a set of targets related to oxidative stress, neurotrophins and inflammation. The results demonstrated significant correlations among most biomarkers, which were then used to extract a score composed of multiple biomarkers, called Systemic Toxicity Index (STI). In bipolar disturbance, patients with maniac or depressive episodes showed higher systemic toxicity than euthymic patients and healthy controls; but lower systemic toxicity was seen when compared with patients with sepsis ('positive' control group) (16).

The substances included in this STI (cytokines, neurotrophins, stress oxidative biomarkers) have been shown individually altered in FM patients. Although the data are controversial, many pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were demonstrated to present increased levels in FM patients, especially TNF- $\alpha$  (26, 31, 64, 66, 70), IL-10 (26, 66, 70), IL-8 (26, 31, 51, 53, 63, 65, 68), IL-4 (52) and IL-6 (52, 66). In the context of altered cytokines profile, some clinical FM characteristics seem to be relevant. Patients with long disease duration (more than 2 years) had higher IL-6 production (in peripheral blood mononucleated cell culture) and serum IL-8 when compared with subjects with shorter duration of FM (50). Mean IL-10 concentration during sleep was significantly higher in FM patients than healthy controls, while levels of IL-10 during the awake state did not differ between groups (60). In the current context, it's plausible to suspect that depression is a relevant variable in interleukin studies with FM patients. However, data about cytokines in patients with FM and associated depression are still scarce and inconclusive. Interestingly, some studies have shown a decrease of some cytokines in FM patients in response to therapeutic approach (31, 53, 66, 82).

Our results demonstrated significant ( $p = 0.006$ ) elevated levels of serum IL-10 in FM female patients when compared to healthy women. Other tested cytokines (IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ) did not differ between groups.

It is possible that IL-10 is released as a compensatory mechanism due to its role as an anti-inflammatory cytokine (indicating a profile of chronic disease), although this mechanism can be inefficient, given the persistence of symptoms observed in patients with FM in all studies. The IL-10 has anti-allodynnic and anti-hyperalgesic properties, through the mechanisms that supress the expression of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 (48) and it is recognized as a cytokine that blocks pain (52). Some studies documented that the administration of IL-10 suppresses the development of spinally-mediated pain in several animal models of neuropathic pain (36). Although some studies show increased (26,

60, 66, 70) or decreased (52, 67) levels of IL-10 in patients with FM, most failed to demonstrate significant differences when compared to healthy controls.

Some aspects limit the interleukin studies in FM, because many features can influence the concentration of the cytokines, like their inherent biological variability, life habits (physical activity, diet), presence of depression, duration of disease or medication use. However, in our study there was no correlation between interleukin levels and any clinical or therapeutic feature, mainly depression that was evaluated with specific instruments. It is possible that the cytokine pattern in FM patients with psychiatric symptoms is similar to those FM patients taken as a whole and different from patients with isolated depression. Another relevant question is that there is no gold standard method to measure cytokines, and many different techniques have been used with this objective, making the studies heterogeneous.

Studies with BDNF have demonstrated its role as a modulator of central pain and hyperalgesia. Although our data did not show any difference in BDNF levels between patients and controls, previous reports have demonstrated interesting results. Laske (88) and Hass (14) showed increased BDNF levels in serum and Sarchielli (77) higher levels in liquor in FM subjects (14, 77, 88) independently of clinical characteristics, including depression. Nugraha *et al* demonstrated a significant positive correlation of serum BDNF concentration and depression score (95). Recently, Bazzicchi and colleagues have evaluated the effects of balneotherapy or mud-bath in treating patients with FM. In addition to pain reduction and improvement of FIQ, there was significant reduction of BDNF concentrations after 12 weeks of treatment in both groups (96). Like other neurotrophins, the BDNF is a substance that must continue to be studied in FM, considering the divergent results of studies and its probable role in the pathophysiology of pain.

The oxidative stress is implicated in pathophysiology of numerous diseases and it has been recently shown increased in pain disorders, including FM. Many studies testing different oxidative stress biomarkers demonstrate the imbalance of oxidants and antioxidants in FM patients (99, 110, 115, 117, 118). Our data do not point to enhanced oxidative activity in FM patients, nor demonstrate any correlation between oxidative damage with clinical aspects. However, Cordero observed correlation between markers of oxidative stress and pain, fatigue, FIQ, non-refreshing sleep, anxiety and depression in FM patients (113). A possible link between FM and oxidative stress allows one to assume that antioxidants may have value in the treatment of this disorder. The supplementation of coenzymeQ10, a potent antioxidant element, demonstrated, in different studies, significant improvement in fatigue, headache, pain and depression (103, 116, 120, 127).

There are many previous studies testing biomarkers separately in FM and we tried, for the first time, to find a correlation between serum levels of interleukins, BDNF and oxidative stress markers in this complex disease. Unfortunately, it was not possible to FM, as it had been demonstrated in mood disturbance before. It is possible that the pathophysiology of depression can be different in individuals with or without FM, and this aspect should be better evaluated in future studies.

## CONCLUSION

Although it is not classified as an immune disease by nature, alterations in cytokine concentrations have been reported by many authors in fibromyalgia. We showed significant increase of IL-10 levels, although it has not been possible to demonstrate association of biomarkers with any clinical features. Our results do not support a hypothesis of an alteration in the levels of IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , oxidative stress markers or BDNF in FM. And it has not been possible to find a significant correlation between these substances, not allowing the calculation of the systemic toxicity index in patients with FM. The variability of the findings among studies involving biomarkers in FM indicates that it is a disease with complex pathophysiology and additional research is needed with a larger number of patients and biomarkers to homogenize the evidence.

## REFERENCES

1. Frey BN, Andreazza AC, Houenou J, Jamain S, Goldstein BI, Frye MA, et al. Biomarkers in bipolar disorder: a positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force. *The Australian and New Zealand journal of psychiatry*. 2013;47(4):321-32.
2. Stertz L, Magalhaes PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Current opinion in psychiatry*. 2013;26(1):19-26.
3. Muller N. Immunology of major depression. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21(2-3):123-30.
4. Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2014;48:102-11.
5. Valkanova V, Ebmeier KP, Allan CL. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Journal of affective disorders*. 2013;150(3):736-44.

6. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosomatic medicine*. 2009;71(2):171-86.
7. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*. 2010;67(5):446-57.
8. Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2011;36(12):2452-9.
9. Pfaffenseller B, Fries GR, Wollenhaupt-Aguiar B, Colpo GD, Stertz L, Panizzutti B, et al. Neurotrophins, inflammation and oxidative stress as illness activity biomarkers in bipolar disorder. *Expert review of neurotherapeutics*. 2013;13(7):827-42.
10. Siwek M, Sowa-Kucma M, Dudek D, Styczen K, Szewczyk B, Kotarska K, et al. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacological reports : PR*. 2013;65(6):1558-71.
11. Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *Journal of affective disorders*. 2008;111(2-3):135-44.
12. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Molecular psychiatry*. 2010;15(8):784-6.
13. Ruiz de Azua S, Matute C, Stertz L, Mosquera F, Palomino A, de la Rosa I, et al. Plasma brain-derived neurotrophic factor levels, learning capacity and cognition in patients with first episode psychosis. *BMC psychiatry*. 2013;13:27.
14. Haas L, Portela LV, Bohmer AE, Oses JP, Lara DR. Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in patients with fibromyalgia. *Neurochemical research*. 2010;35(5):830-4.
15. Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BA, Penninx BW, Elzinga BM. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Molecular psychiatry*. 2014;19(7):791-800.
16. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *Journal of psychiatric research*. 2011;45(2):156-61.
17. Clauw DJ. Fibromyalgia: a clinical review. *Jama*. 2014;311(15):1547-55.
18. Heymann RE, Paiva Edos S, Helfenstein M, Jr., Pollak DF, Martinez JE, Provenza JR, et al. Brazilian consensus on the treatment of fibromyalgia. *Revista brasileira de reumatologia*. 2010;50(1):56-66.

19. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis and rheumatism*. 1990;33(2):160-72.
20. Auvinet B, Chaleil D. Identification of subgroups among fibromyalgia patients. *Reumatismo*. 2012;64(4):250-60.
21. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis care & research*. 2010;62(5):600-10.
22. Kennedy M, Felson DT. A prospective long-term study of fibromyalgia syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(4):682-5.
23. Wolfe F, Anderson J, Harkness D, Bennett RM, Caro XJ, Goldenberg DL, et al. Health status and disease severity in fibromyalgia: results of a six-center longitudinal study. *Arthritis and rheumatism*. 1997;40(9):1571-9.
24. Alciati A, Sgiarovello P, Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Psychiatric problems in fibromyalgia: clinical and neurobiological links between mood disorders and fibromyalgia. *Reumatismo*. 2012;64(4):268-74.
25. Paiva ES, da Costa ED, Scheinberg M. Fibromyalgia: an update and immunological aspects. *Current pain and headache reports*. 2008;12(5):321-6.
26. Bazzichi L, Rossi A, Massimetti G, Giannaccini G, Giuliano T, De Feo F, et al. Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. *Clinical and experimental rheumatology*. 2007;25(2):225-30.
27. Staud R. Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(3):208.
28. Staud R, Weyl EE, Riley JL, 3rd, Fillingim RB. Slow temporal summation of pain for assessment of central pain sensitivity and clinical pain of fibromyalgia patients. *PLoS one*. 2014;9(2):e89086.
29. Harris RE, Clauw DJ, Scott DJ, McLean SA, Gracely RH, Zubieta JK. Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(37):10000-6.
30. Uceyler N, Valenza R, Stock M, Schedel R, Sprotte G, Sommer C. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(8):2656-64.
31. Wang H, Moser M, Schiltenwolf M, Buchner M. Circulating cytokine levels compared to pain in patients with fibromyalgia -- a prospective longitudinal study over 6 months. *The Journal of rheumatology*. 2008;35(7):1366-70.

32. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
33. Bhide AA, Cartwright R, Khullar V, Digesu GA. Biomarkers in overactive bladder. *International urogynecology journal*. 2013;24(7):1065-72.
34. Ablin JN, Buskila D, Clauw DJ. Biomarkers in fibromyalgia. *Current pain and headache reports*. 2009;13(5):343-9.
35. Wallace DJ. Is there a role for cytokine based therapies in fibromyalgia. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(1):17-22.
36. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*. 2007;45(2):27-37.
37. Gur A, Karakoc M, Nas K, Remzi, Cevik, Denli A, et al. Cytokines and depression in cases with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2002;29(2):358-61.
38. Alexander GM, van Rijn MA, van Hilten JJ, Perreault MJ, Schwartzman RJ. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain*. 2005;116(3):213-9.
39. Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, et al. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology*. 2001;56(10):1371-7.
40. Koch A, Zacharowski K, Boehm O, Stevens M, Lipfert P, von Giesen HJ, et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2007;56(1):32-7.
41. Rozen T, Swidan SZ. Elevation of CSF tumor necrosis factor alpha levels in new daily persistent headache and treatment refractory chronic migraine. *Headache*. 2007;47(7):1050-5.
42. Backonja MM, Coe CL, Muller DA, Schell K. Altered cytokine levels in the blood and cerebrospinal fluid of chronic pain patients. *Journal of neuroimmunology*. 2008;195(1-2):157-63.
43. Brisby H, Olmarker K, Larsson K, Nutu M, Rydevik B. Proinflammatory cytokines in cerebrospinal fluid and serum in patients with disc herniation and sciatica. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2002;11(1):62-6.
44. Kotani N, Kudo R, Sakurai Y, Sawamura D, Sessler DI, Okada H, et al. Cerebrospinal fluid interleukin 8 concentrations and the subsequent development of postherpetic neuralgia. *The American journal of medicine*. 2004;116(5):318-24.
45. Ludwig J, Binder A, Steinmann J, Wasner G, Baron R. Cytokine expression in serum and cerebrospinal fluid in non-inflammatory polyneuropathies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2008;79(11):1268-73.



46. Lundborg C, Hahn-Zoric M, Biber B, Hansson E. Glial cell line-derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid but decreased in blood during long-term pain. *Journal of neuroimmunology*. 2010;220(1-2):108-13.
47. Nakamura T, Schwander SK, Donnelly R, Ortega F, Togo F, Broderick G, et al. Cytokines across the night in chronic fatigue syndrome with and without fibromyalgia. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17(4):582-7.
48. Lee BS, Jun IG, Kim SH, Park JY. Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. *Journal of Korean medical science*. 2013;28(2):308-14.
49. Wallace DJ, Margolin K, Waller P. Fibromyalgia and interleukin-2 therapy for malignancy. *Annals of internal medicine*. 1988;108(6):909.
50. Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hallegua D, Silverman S, Silver D, Weisman MH. Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology*. 2001;40(7):743-9.
51. Bote ME, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. Inflammatory/stress feedback dysregulation in women with fibromyalgia. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(6):343-51.
52. Malhotra D, Saxena AK, Dar SA, Kumar V, Nasare N, Tripathi AK, et al. Evaluation of Cytokine Levels in Fibromyalgia Syndrome Patients and its Relationship to the Severity of Chronic Pain. *Journal of Musculoskeletal Pain*. 2012;20(3):164-9.
53. Ortega E, Garcia JJ, Bote ME, Martin-Cordero L, Escalante Y, Saavedra JM, et al. Exercise in fibromyalgia and related inflammatory disorders: known effects and unknown chances. *Exercise immunology review*. 2009;15:42-65.
54. Xiao Y, Haynes WL, Michalek JE, Russell IJ. Elevated serum high-sensitivity C-reactive protein levels in fibromyalgia syndrome patients correlate with body mass index, interleukin-6, interleukin-8, erythrocyte sedimentation rate. *Rheumatology international*. 2013;33(5):1259-64.
55. Menzies V, Lyon DE, Elswick RK, Jr., Montpetit AJ, McCain NL. Psychoneuroimmunological relationships in women with fibromyalgia. *Biological research for nursing*. 2013;15(2):219-25.
56. Amel Kashipaz MR, Swinden D, Todd I, Powell RJ. Normal production of inflammatory cytokines in chronic fatigue and fibromyalgia syndromes determined by intracellular cytokine staining in short-term cultured blood mononuclear cells. *Clinical and experimental immunology*. 2003;132(2):360-5.
57. Maes M, Libbrecht I, Van Hunsel F, Lin AH, De Clerck L, Stevens W, et al. The immune-inflammatory pathophysiology of fibromyalgia: increased serum soluble gp130, the common signal transducer protein of various neurotrophic cytokines. *Psychoneuroendocrinology*. 1999;24(4):371-83.

58. Gur A, Karakoc M, Erdogan S, Nas K, Cevik R, Sarac AJ. Regional cerebral blood flow and cytokines in young females with fibromyalgia. *Clinical and experimental rheumatology*. 2002;20(6):753-60.
59. Salemi S, Rethage J, Wollina U, Michel BA, Gay RE, Gay S, et al. Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2003;30(1):146-50.
60. Togo F, Natelson BH, Adler GK, Ottenweller JE, Goldenberg DL, Struzik ZR, et al. Plasma cytokine fluctuations over time in healthy controls and patients with fibromyalgia. *Experimental biology and medicine*. 2009;234(2):232-40.
61. Menzies V, Lyon DE. Integrated review of the association of cytokines with fibromyalgia and fibromyalgia core symptoms. *Biological research for nursing*. 2010;11(4):387-94.
62. Blanco I, Beritze N, Arguelles M, Carcaba V, Fernandez F, Janciauskiene S, et al. Abnormal overexpression of mastocytes in skin biopsies of fibromyalgia patients. *Clinical rheumatology*. 2010;29(12):1403-12.
63. Ang DC, Moore MN, Hilligoss J, Tabbey R. MCP-1 and IL-8 as pain biomarkers in fibromyalgia: a pilot study. *Pain medicine*. 2011;12(8):1154-61.
64. Topal G, Donmez A, Dogan BS, Kucur M, Cengiz DT, Berkoz FB, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels are increased in patients with fibromyalgia: correlation with tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and 8-iso-prostaglandin F(2alpha) (8-iso-PGF(2alpha)). *Clinical biochemistry*. 2011;44(5-6):364-7.
65. Kadetoff D, Lampa J, Westman M, Andersson M, Kosek E. Evidence of central inflammation in fibromyalgia-increased cerebrospinal fluid interleukin-8 levels. *Journal of neuroimmunology*. 2012;242(1-2):33-8.
66. Ortega E, Bote ME, Giraldo E, Garcia JJ. Aquatic exercise improves the monocyte pro- and anti-inflammatory cytokine production balance in fibromyalgia patients. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2012;22(1):104-12.
67. Behm FG, Gavin IM, Karpenko O, Lindgren V, Gaitonde S, Gashkoff PA, et al. Unique immunologic patterns in fibromyalgia. *BMC clinical pathology*. 2012;12:25.
68. Bote ME, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. Fibromyalgia: anti-inflammatory and stress responses after acute moderate exercise. *PloS one*. 2013;8(9):e74524.
69. Sturgill J, McGee E, Menzies V. Unique cytokine signature in the plasma of patients with fibromyalgia. *Journal of immunology research*. 2014;2014:938576.
70. Wang H, Weber A, Schiltenswolf M, Amelung D. [Attachment style and cytokine levels in patients with fibromyalgia : A prospective longitudinal study]. *Schmerz*. 2014;28(5):504-12.

71. Uceyler N, Kewenig S, Kafke W, Kittel-Schneider S, Sommer C. Skin cytokine expression in patients with fibromyalgia syndrome is not different from controls. *BMC neurology*. 2014;14(1):185.
72. Kikuchi A, Kotani N, Sato T, Takamura K, Sakai I, Matsuki A. Comparative therapeutic evaluation of intrathecal versus epidural methylprednisolone for long-term analgesia in patients with intractable postherpetic neuralgia. *Regional anesthesia and pain medicine*. 1999;24(4):287-93.
73. Buvanendran A, Kroin JS, Berger RA, Hallab NJ, Saha C, Negrescu C, et al. Upregulation of prostaglandin E2 and interleukins in the central nervous system and peripheral tissue during and after surgery in humans. *Anesthesiology*. 2006;104(3):403-10.
74. Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(1):23-36.
75. Yamamoto J, Nishiyori A, Takami S, Ohtani Y, Minami M, Satoh M. A hyperalgesic effect of intracerebroventricular cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in the rat paw pressure test. *European journal of pharmacology*. 1998;363(2-3):131-3.
76. Ahn DK, Lee KR, Lee HJ, Kim SK, Choi HS, Lim EJ, et al. Intracisternal administration of chemokines facilitated formalin-induced behavioral responses in the orofacial area of freely moving rats. *Brain research bulletin*. 2005;66(1):50-8.
77. Sarchielli P, Mancini ML, Floridi A, Coppola F, Rossi C, Nardi K, et al. Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(9):737-45.
78. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annual review of neuroscience*. 2001;24:1217-81.
79. Watkins LR, Maier SF. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. *Journal of internal medicine*. 2005;257(2):139-55.
80. Imamura M, Targino RA, Hsing WT, Imamura S, Azevedo RS, Boas LS, et al. Concentration of cytokines in patients with osteoarthritis of the knee and fibromyalgia. *Clinical interventions in aging*. 2014;9:939-44.
81. Light AR, White AT, Hughen RW, Light KC. Moderate exercise increases expression for sensory, adrenergic, and immune genes in chronic fatigue syndrome patients but not in normal subjects. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009;10(10):1099-112.
82. Bote ME, Garcia JJ, Hinchado MD, Ortega E. An exploratory study of the effect of regular aquatic exercise on the function of neutrophils from women with fibromyalgia: role of IL-8 and noradrenaline. *Brain, behavior, and immunity*. 2014;39:107-12.
83. Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neuroscience research*. 2006;55(1):1-10.

84. Frias B, Allen S, Dawbarn D, Charrua A, Cruz F, Cruz CD. Brain-derived neurotrophic factor, acting at the spinal cord level, participates in bladder hyperactivity and referred pain during chronic bladder inflammation. *Neuroscience*. 2013;234:88-102.
85. Nugraha B, Karst M, Engeli S, Gutenbrunner C. Brain-derived neurotrophic factor and exercise in fibromyalgia syndrome patients: a mini review. *Rheumatology international*. 2012;32(9):2593-9.
86. Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annual review of neuroscience*. 2006;29:507-38.
87. Fischer M, Wille G, Klien S, Shanib H, Holle D, Gaul C, et al. Brain-derived neurotrophic factor in primary headaches. *The journal of headache and pain*. 2012;13(6):469-75.
88. Laske C, Stransky E, Eschweiler GW, Klein R, Wittorf A, Leyhe T, et al. Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants. *Journal of psychiatric research*. 2007;41(7):600-5.
89. Joo YE. Increased Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor in Irritable Bowel Syndrome and Its Correlation With Abdominal Pain (*Gut* 2012;61:685-694). *Journal of neurogastroenterology and motility*. 2013;19(1):109-11.
90. Yamamoto S, Kishishita Y, Yoshida M, Miura D, Suzuki H, Ishikawa K, et al. Activation of different signals identified with glia cells contribute to the progression of hyperalgesia. *Cellular and molecular neurobiology*. 2013;33(2):167-74.
91. Tanure MT, Gomez RS, Hurtado RC, Teixeira AL, Domingues RB. Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor during migraine attacks: a pilot study. *The journal of headache and pain*. 2010;11(5):427-30.
92. Angelucci F, Mathe AA, Aloe L. Neurotrophic factors and CNS disorders: findings in rodent models of depression and schizophrenia. *Progress in brain research*. 2004;146:151-65.
93. Laske C, Eschweiler GW. [Brain-derived neurotrophic factor: from nerve growth factor to modulator of brain plasticity in cognitive processes and psychiatric diseases]. *Der Nervenarzt*. 2006;77(5):523-37.
94. Giovengo SL, Russell IJ, Larson AA. Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(7):1564-9.
95. Nugraha B, Korallus C, Gutenbrunner C. Serum level of brain-derived neurotrophic factor in fibromyalgia syndrome correlates with depression but not anxiety. *Neurochemistry international*. 2013;62(3):281-6.
96. Bazzichi L, Da Valle Y, Rossi A, Giacomelli C, Sernissi F, Giannaccini G, et al. A multidisciplinary approach to study the effects of balneotherapy and mud-bath therapy treatments on fibromyalgia. *Clinical and experimental rheumatology*. 2013;31(6 Suppl 79):S111-20.

97. Iqbal R, Mughal MS, Arshad N, Arshad M. Pathophysiology and antioxidant status of patients with fibromyalgia. *Rheumatology international*. 2011;31(2):149-52.
98. Cordero MD. [Oxidative stress in fibromyalgia: pathophysiology and clinical implications]. *Reumatologia clinica*. 2011;7(5):281-3.
99. La Rubia M, Rus A, Molina F, Del Moral ML. Is fibromyalgia-related oxidative stress implicated in the decline of physical and mental health status? *Clinical and experimental rheumatology*. 2013;31(6 Suppl 79):S121-7.
100. Bagis S, Tamer L, Sahin G, Bilgin R, Guler H, Ercan B, et al. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatology international*. 2005;25(3):188-90.
101. Pedrini M, Massuda R, Fries GR, de Bittencourt Pasquali MA, Schnorr CE, Moreira JC, et al. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *Journal of psychiatric research*. 2012;46(6):819-24.
102. Ozgocmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O, Ardicoglu O, Yildizhan H. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide in fibromyalgia: etiologic and therapeutic concerns. *Rheumatology international*. 2006;26(7):598-603.
103. Cordero MD, Cano-Garcia FJ, Alcocer-Gomez E, De Miguel M, Sanchez-Alcazar JA. Oxidative stress correlates with headache symptoms in fibromyalgia: coenzyme Q(1)(0) effect on clinical improvement. *PloS one*. 2012;7(4):e35677.
104. Akbas A, Inanir A, Benli I, Onder Y, Aydogan L. Evaluation of some antioxidant enzyme activities (SOD and GPX) and their polymorphisms (MnSOD2 Ala9Val, GPX1 Pro198Leu) in fibromyalgia. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2014;18(8):1199-203.
105. Ozgocmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O. Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide. *Rheumatology international*. 2006;26(7):585-97.
106. Vecchiet J, Cipollone F, Falasca K, Mezzetti A, Pizzigallo E, Bucciarelli T, et al. Relationship between musculoskeletal symptoms and blood markers of oxidative stress in patients with chronic fatigue syndrome. *Neuroscience letters*. 2003;335(3):151-4.
107. Altindag O, Celik H. Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia. *Redox report : communications in free radical research*. 2006;11(3):131-5.
108. Akkus S, Naziroglu M, Eris S, Yalman K, Yilmaz N, Yener M. Levels of lipid peroxidation, nitric oxide, and antioxidant vitamins in plasma of patients with fibromyalgia. *Cell biochemistry and function*. 2009;27(4):181-5.
109. Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, Yenisey C, Serter M. Serum antioxidants and nitric oxide levels in fibromyalgia: a controlled study. *Rheumatology international*. 2009;29(6):629-33.

110. Cordero MD, Moreno-Fernandez AM, deMiguel M, Bonal P, Campa F, Jimenez-Jimenez LM, et al. Coenzyme Q10 distribution in blood is altered in patients with fibromyalgia. *Clinical biochemistry*. 2009;42(7-8):732-5.
111. Cordero MD, De Miguel M, Moreno Fernandez AM, Carmona Lopez IM, Garrido Maraver J, Cotan D, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(1):R17.
112. Naziroglu M, Akkus S, Soyupek F, Yalman K, Celik O, Eris S, et al. Vitamins C and E treatment combined with exercise modulates oxidative stress markers in blood of patients with fibromyalgia: a controlled clinical pilot study. *Stress*. 2010;13(6):498-505.
113. Cordero MD, Alcocer-Gomez E, Cano-Garcia FJ, De Miguel M, Carrion AM, Navas P, et al. Clinical symptoms in fibromyalgia are better associated to lipid peroxidation levels in blood mononuclear cells rather than in plasma. *PLoS one*. 2011;6(10):e26915.
114. Neyal M, Yimenicioglu F, Aydeniz A, Taskin A, Saglam S, Cekmen M, et al. Plasma nitrite levels, total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with tension-type headache and fibromyalgia. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2013;115(6):736-40.
115. Castro-Marrero J, Cordero MD, Saez-Francas N, Jimenez-Gutierrez C, Aguilar-Montilla FJ, Aliste L, et al. Could mitochondrial dysfunction be a differentiating marker between chronic fatigue syndrome and fibromyalgia? *Antioxidants & redox signaling*. 2013;19(15):1855-60.
116. Miyamae T, Seki M, Naga T, Uchino S, Asazuma H, Yoshida T, et al. Increased oxidative stress and coenzyme Q10 deficiency in juvenile fibromyalgia: amelioration of hypercholesterolemia and fatigue by ubiquinol-10 supplementation. *Redox report : communications in free radical research*. 2013;18(1):12-9.
117. Bozkurt M, Caglayan M, Oktayoglu P, Em S, Batmaz I, Sariyildiz MA, et al. Serum prolidase enzyme activity and oxidative status in patients with fibromyalgia. *Redox report : communications in free radical research*. 2014;19(4):148-53.
118. Sarifakioglu B, Guzelant AY, Guzel EC, Guzel S, Kiziler AR. Effects of 12-week combined exercise therapy on oxidative stress in female fibromyalgia patients. *Rheumatology international*. 2014;34(10):1361-7.
119. Chung CP, Titova D, Oeser A, Randels M, Avalos I, Milne GL, et al. Oxidative stress in fibromyalgia and its relationship to symptoms. *Clinical rheumatology*. 2009;28(4):435-8.
120. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Effect of oral coenzyme Q10 supplementation on clinical symptoms and oxidative stress in fibromyalgia patients: a randomized trial. *Ann Rheum Dis* 2014;73:288-89.
121. Magalhaes PV, Jansen K, Pinheiro RT, Klamt F, Teixeira AL, da Silva RA, et al. Systemic toxicity in early-stage mood disorders. *Journal of psychiatric research*. 2011;45(10):1407-9.

122. Marques AP, Santos AMB, Assumpção A, Matsutani LA, Lage LV, Pereira CAB. Validation of the Brazilian version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ). *Revista brasileira de reumatologia*. 2006;46(1):24-31.
123. Gorenstein C, Andrade L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(4):453-7.
124. Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurosurg Psychiatry*. 1960;23:50-5.
125. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1990;186:464-78.
126. Gracely RH, Ceko M, Bushnell MC. Fibromyalgia and depression. *Pain research and treatment*. 2012;2012:486590.
127. Cordero MD, Cotan D, del-Pozo-Martin Y, Carrion AM, de Miguel M, Bullon P, et al. Oral coenzyme Q10 supplementation improves clinical symptoms and recovers pathologic alterations in blood mononuclear cells in a fibromyalgia patient. *Nutrition*. 2012;28(11-12):1200-3.

Additional table. Comparison of oxidative stress markers, BDNF and cytokines in FM patients and healthy controls through mean and standard deviation.

	FM patients (n=69)	Healthy controls (n=61)
	mean (SD)	mean (SD)
Oxidative stress biomarkers		
TBARS ( $\mu$ M of MDA)	19.1 (18.1)	24.6 (30.1)
Carbonyl (nmol/mg)	0.020 (0.011)	0.023 (0.013)
BDNF (ng/mL)	28.3 (11.8)	27.3 (12.0)
Cytokines (fg/mL)		
IL-6	1909.9 (1487.0)	1800.1 (1990.4)
IL-10	941.4 (1315.5)	569.6 (792.6)
IL-8	7779.2 (8174,6)	7369.5 (4732.4)
TNF- $\alpha$	452.0 (626.6)	390.8 (652.0)

SD: standard deviation

FM: fibromyalgia

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

MDA: malondialdehyde

IL: interleukins

TNF: tumor necrosis factor



## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fibromialgia é um distúrbio prevalente na população geral, afetando mulheres jovens, de forma particular. Por ser responsável por relevante impacto na qualidade de vida e capacidade funcional de forma individual e por afetar, de forma coletiva, relacionamentos interpessoais e de trabalho, a fibromialgia ganha destaque entre as doenças a serem estudadas com maior profundidade, a fim de que novos conhecimentos tragam melhorias nas condições de vida dos pacientes.

Dentre os temas pesquisados em fibromialgia, a busca por biomarcadores vem sendo amplamente estudada, visto trazer a perspectiva de que algumas substâncias possam estar relacionadas à doença em si e/ou a seus principais sintomas.

Nosso estudo teve o objetivo de buscar evidências de alteração de alguns biomarcadores que já haviam sido descritos como anormais no processo da fibromialgia em pesquisas prévias. De forma inédita e usando tais biomarcadores, tentamos calcular um Índice de Toxicidade Sistêmica (ITS) para a doença. A criação deste índice pela equipe do Dr. Flávio Kapczinski surgiu a partir de achados anormais de interleucinas, BDNF e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com transtornos de humor, em especial, distúrbio bipolar. Devido às relações significativas entre os biomarcadores, foi possível a criação de um índice conjunto (ITS) que mostrou-se alterado significativamente em pacientes com doença bipolar, em especial em episódios de mania ou depressão, diferenciando-os de sujeitos saudáveis.

Sendo a depressão uma comorbidade frequente em fibromialgia e já tendo sido demonstrada alteração de interleucinas, BDNF e marcadores de estresse oxidativo isoladamente em portadores da doença, tornou-se motivo de interesse a pesquisa destas substâncias e, conseqüentemente, do ITS em pacientes fibromiálgicos.

Conseguimos demonstrar elevação significativa dos níveis de IL-10 em pacientes com fibromialgia, achado que merece pesquisas adicionais. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória reconhecidamente envolvida no processo nociceptivo, e a alteração deste, é o cerne da etiopatogênese da fibromialgia. No entanto, os estudos envolvendo IL-10 e fibromialgia ainda não demonstram resultados homogêneos e há a necessidade de uma investigação específica do papel desta citocina no distúrbio nociceptivo.

Outras interleucinas (IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), o BDNF e os marcadores de estresse oxidativo (TBARS e carbonil) não foram diferentes entre fibromiálgicos e controles saudáveis. Além disso, as análises estatísticas demonstraram ausência de correlação entre todas as variáveis, não possibilitando o cálculo do ITS no caso da fibromialgia.

É possível que os distúrbios psiquiátricos associados ao processo da fibromialgia, especialmente a depressão, tenham um comportamento fisiopatológico diferente da apresentação isolada. Estudos envolvendo fibromialgia e depressão ainda merecem nossa atenção e nosso empenho, a fim de que maiores esclarecimentos possam beneficiar médicos e pacientes que lidam diariamente com estas doenças.

## 9. APÊNDICES

### 9.1. Protocolo de atendimento das pacientes com fibromialgia

PROTOCOLO DE ATENDIMENTO - PACIENTES COM FIBROMIALGIA  
 PESQUISA DE FIBROMIALGIA E BIOMARCADORES  
 Responsável Dra. Aline Ranzolin (8848 5569)

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Reg: \_\_\_\_\_ Telefones contato: \_\_\_\_\_

Ano de início dos sintomas de FM: \_\_\_\_\_ Tempo de FM: \_\_\_\_\_ anos

Comorbidades: \_\_\_\_\_

Medicações em uso:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Preenche critérios de FM ACR 1990 ( ) sim

Dor difusa? ( ) sim

Número de tender points positivos: \_\_\_\_\_

Preenche critérios de FM ACR 2010 ( ) sim

IDG: \_\_\_\_\_

EGS: \_\_\_\_\_

**RESULTADO DO FIQ (\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_): \_\_\_\_\_**

**QUESTIONÁRIO HAMILTON** (somar os pontos obtidos em todos os itens, exceto 18A)

1. HUMOR DEPRIMIDO: \_\_\_\_\_

12. SINTOMAS SOMÁTICOS TGI: \_\_\_\_\_

2. SENTIMENTOS DE CULPA: \_\_\_\_\_

13. SINTOMAS SOMÁTICOS GERAL: \_\_\_\_\_

3. SUICÍDIO: \_\_\_\_\_

14. SINTOMAS GENITAIS: \_\_\_\_\_

4. INSÔNIA INICIAL: \_\_\_\_\_

15. HIPOCONDRIA: \_\_\_\_\_

5. INSÔNIA INTERMEDIÁRIA: \_\_\_\_\_

16. PERDA DE PESO: \_\_\_\_\_

6. INSÔNIA TARDIA: \_\_\_\_\_

17. CONSCIÊNCIA: \_\_\_\_\_

7. TRABALHO E ATIVIDADES: \_\_\_\_\_

18. VARIAÇÃO DIURNA: \_\_\_\_\_

8. RETARDO: \_\_\_\_\_

19. DESPERS./ PERDA NOÇÃO REALIDADE: \_\_\_\_\_

9. AGITAÇÃO: \_\_\_\_\_

20. SINTOMAS PARANÓIDES: \_\_\_\_\_

10. ANSIEDADE PSÍQUICA: \_\_\_\_\_

21. SINT. OBSESSIVOS COMPULSIVOS: \_\_\_\_\_

11. ANSIEDADE SOMÁTICA: \_\_\_\_\_

**CONTAGEM TOTAL: \_\_\_\_\_ (0-62)**

**QUESTIONÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK: \_\_\_\_\_**

01. \_\_\_\_\_ 04. \_\_\_\_\_ 07. \_\_\_\_\_ 10. \_\_\_\_\_ 13. \_\_\_\_\_ 16. \_\_\_\_\_ 19. \_\_\_\_\_

02. \_\_\_\_\_ 05. \_\_\_\_\_ 08. \_\_\_\_\_ 11. \_\_\_\_\_ 14. \_\_\_\_\_ 17. \_\_\_\_\_ 20. \_\_\_\_\_

03. \_\_\_\_\_ 06. \_\_\_\_\_ 09. \_\_\_\_\_ 12. \_\_\_\_\_ 15. \_\_\_\_\_ 18. \_\_\_\_\_ 21. \_\_\_\_\_

Aplicado por: \_\_\_\_\_

## 9.2. Protocolo de atendimento das mulheres saudáveis

PROTOCOLO DE ATENDIMENTO – MULHERES SAUDÁVEIS  
 PESQUISA DE FIBROMIALGIA E BIOMARCADORES  
 Responsável Dra. Aline Ranzolin (8848 5569)

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Reg: \_\_\_\_\_

Telefones contato: \_\_\_\_\_

Comorbidades: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Medicações em uso:

Dor em alguma parte do corpo há mais de 3 meses?

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

( ) não ( ) sim

PESO: \_\_\_\_\_

ALTURA: \_\_\_\_\_

PA: \_\_\_\_\_

AUSCULTA PULMONAR ( ) normal ( ) \_\_\_\_\_

AUSCULTA CARDÍACA ( ) normal ( ) \_\_\_\_\_

ABDOMEN ( ) normal ( ) \_\_\_\_\_

ARTICULAÇÕES ( ) normal ( ) \_\_\_\_\_

SINTOMAS OU DIAGNÓSTICO DE DEPRESSÃO? ( ) não

OBSERVAÇÕES: ( ) nenhuma

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Aplicado por: \_\_\_\_\_

### 9.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar como voluntário(a) do estudo *Marcadores biológicos e Índice de Toxicidade Sistêmica em pacientes com Fibromialgia*. Você foi convidado a participar deste estudo porque tem fibromialgia e faz seu acompanhamento no ambulatório deste hospital.

#### **POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?**

A fibromialgia é uma doença que ainda não tem toda a sua origem explicada e estudos devem ser feitos para esclarecer suas causas e alterações laboratoriais associadas.

Este estudo está sendo realizado para identificar a presença de marcadores inflamatórios (biomarcadores) no sangue de pacientes com fibromialgia e tentar elucidar seu papel nesta síndrome.

#### **DE QUE CONSTA O ESTUDO?**

Ele consta de uma consulta (com entrevista e exame físico), do preenchimento de um questionário, que é feito por você ou pelo seu médico, e a coleta de exame de sangue para análise dos biomarcadores. O uso sangue coletado para qualquer outra finalidade é proibido.

#### **QUAIS SÃO OS POTENCIAIS BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DESTES ESTUDO?**

##### PACIENTES COM FIBROMIALGIA

1. Avaliar a presença dos biomarcadores e contribuir para o progresso dos estudos em fibromialgia.
2. Ter uma consulta adicional à sua consulta de rotina, onde será feita a avaliação e poderão ser esclarecidas dúvidas e tratadas queixas que, por acaso, existirem.

##### PACIENTES SEM FIBROMIALGIA (CONTROLES)

1. Contribuir para o avanço dos estudos em fibromialgia
2. Ser submetido a uma avaliação básica de saúde através da entrevista médica que será realizada.

### **QUAIS SÃO OS POTENCIAIS RISCOS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?**

1. Comparecer ao hospital em uma consulta adicional.
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue (coleta simples), podendo aparecer dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma).

### **DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE**

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificá-lo em hipótese alguma.
- B. Sua participação no estudo é voluntária, ou seja, você é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no seu acompanhamento no Ambulatório, na Emergência ou na Internação do Hospital das Clínicas de Pernambuco.
- D. Você é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

### ***COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO***

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, escreva SIM ou NÃO para a questão abaixo:

Autorizo o uso dos dados da entrevista, do exame físico e dos exames coletados para o estudo dos biomarcadores na fibromialgia: \_\_\_\_\_ (sim ou não)

Paciente: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Recife, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Pesquisador responsável: Aline Ranzolin telefones: (081) 8848 5569 / (81) 2126 3576  
 Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco  
 Av. Prof. Moraes Rego s/n Recife-PE, CEP: 50670-901, Tel: (81) 2126 8588  
 Comitê de Ética em Pesquisa em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
 Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003 sala 2227, Tel: (51) 3359-7640

## 10. ANEXOS

### 10.1. *Fibromyalgia Impact Questionnaire* - Questionário de Impacto da Fibromialgia

Para os itens de 1 a 10, circule a resposta que melhor descreve como você se sentiu nos últimos 7 dias. Se não for algo que faça normalmente, simplesmente não responda à pergunta..

Com que frequência você consegue:	sempre	quase sempre	de vez em quando	nunca
1 - Fazer compras	0	1	2	3
2 - Lavar roupa	0	1	2	3
3 - Cozinhar	0	1	2	3
4 - Lavar louça	0	1	2	3
5 - Limpar a casa (varrer, passar pano etc.)	0	1	2	3
6 - Arrumar a cama	0	1	2	3
7 - Andar vários quarteirões	0	1	2	3
8 - Visitar parentes ou amigos	0	1	2	3
9 - Cuidar do quintal ou jardim	0	1	2	3
10 - Dirigir carro ou andar de ônibus	0	1	2	3
<b>SOMA TOTAL DAS RESPOSTAS</b>	/ 10 = _____ x 3,33 =			

11 - Nos últimos sete dias, em quantos dias você se sentiu bem?

0 1 2 3 4 5 6 7

Escore (invertido): \_\_\_\_\_ x 1,43 = \_\_\_\_\_

12 - Por causa da fibromialgia, quantos dias você faltou ao trabalho (ou deixou de trabalhar em casa)?

0 1 2 3 4 5 6 7

Escore: \_\_\_\_\_ x 1,43 = \_\_\_\_\_

13 - Quanto a fibromialgia interferiu na capacidade de fazer seu serviço:

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
 Não interferiu Atrapalhou muito

14- Quanta dor você sentiu?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
 Nenhuma Muita dor

15 - Você sentiu cansaço?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
 Não Sim, muito

16 - Como você se sentiu ao se levantar de manhã?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
Descansado/a Muito cansado/a

17 - Você sentiu rigidez (ou o corpo travado)?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
Não Sim, muita

18 - Você se sentiu nervoso/a ou ansioso/a?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
Não, nem um pouco Sim, muito

19 - Você se sentiu deprimido/a ou desanimado/a?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
Não, nem um pouco Sim, muito



## 10.2. Escala de Depressão de Hamilton

### ESCALA DE HAMILTON PARA DEPRESSÃO

Todos os itens devem ser preenchidos. Assinalar o número apropriado.

#### 1. HUMOR DEPRIMIDO (Tristeza, desesperança, desamparo, inutilidade)

0. Ausente.
1. Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido.
2. Sentimentos relatados espontaneamente com palavras.
3. Comunica os sentimentos não com palavras, isto é, com a expressão facial, a postura, a voz e a tendência ao choro.
4. Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não-verbal do paciente.

#### 2. SENTIMENTOS DE CULPA

0. Ausente
1. Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros.
2. Idéias de culpa ou ruminção sobre erros passados ou más ações.
3. A doença atual é um castigo.
4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras.

#### 3. SUICÍDIO

0. Ausente.
1. Sente que a vida não vale a pena.
2. Desejaria estar morto ou pensa na probabilidade de sua própria morte.
3. Idéias ou gestos suicidas.
4. Tentativa de suicídio (qualquer tentativa séria, marcar 4).

#### 4. INSÔNIA INICIAL

0. Sem dificuldades para conciliar o sono.
1. Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora.
2. Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites.

#### 5. INSÔNIA INTERMEDIÁRIA

0. Sem dificuldades.
1. O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite.
2. Acorda à noite (qualquer saída da cama marcar 2, exceto para urinar).

#### 6. INSÔNIA TARDIA

0. Sem dificuldades.
1. Acorda de madrugada, mas volta a dormir
2. Incapaz de voltar a conciliar o sono se deixar a cama.

#### 7. TRABALHO E ATIVIDADES

0. Sem dificuldades.
1. Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionada a atividades, trabalho ou passatempos.
2. Perda de interesse por atividades (passatempos ou trabalho) quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade).
3. Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos 3 horas por dia em atividades externas (trabalho hospitalar ou passatempo).

4. Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem ajuda.

### **8. RETARDO (lentidão de idéias e fala; dificuldade de concentração; atividade motora diminuída)**

0. Pensamento e fala normais.
1. Leve retardo à entrevista.
2. Retardo óbvio à entrevista.
3. Entrevista difícil.
4. Estupor completo.

### **9. AGITAÇÃO**

0. Nenhuma.
1. Inquietude.
2. Brinca com as mãos, com os cabelos, etc.
3. Mexe-se, não consegue sentar quieto.
4. Torce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios.

### **10. ANSIEDADE PSÍQUICA**

0. Sem dificuldade.
1. Tensão e irritabilidade subjetivas.
2. Preocupação com trivialidades.
3. Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala.
4. Medos expressos sem serem inquiridos.

### **11. ANSIEDADE SOMÁTICA**

Concomitantes fisiológicos de ansiedade, tais como:  
 Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructação;  
 Cardiovasculares: palpitações, cefaléia;  
 Respiratórios: hiperventilação, suspiros; Freqüência urinária; Sudorese

0. Ausente
1. Leve
2. Moderada
3. Grave
4. Incapacitante

### **12. SINTOMAS SOMÁTICOS GASTROINTESTINAIS**

0. Nenhum
1. Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente. Sensações de peso no abdomen
2. Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos.

### **13. SINTOMAS SOMÁTICOS EM GERAL**

0. Nenhum
1. Peso nos membros, nas costas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaléia, mialgias. Perda de energia e cansaço.
2. Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2.

### **14. SINTOMAS GENITAIS**

- Sintomas como: perda da libido, distúrbios menstruais
0. Ausentes
  1. Leves
  2. Intensos

**15. HIPOCONDRIA**

- 0. Ausente
- 1. Auto-observação aumentada (com relação ao corpo)
- 2. Preocupação com a saúde
- 3. Queixas freqüentes, pedidos de ajuda, etc.
- 4. Idéias delirantes hipocondríacas.

**16. PERDA DE PESO (Marcar A ou B)**

A - Quando avaliada pela história clínica

- 0. Sem perda de peso.
- 1. Provável perda de peso associada à moléstia atual.
- 2. Perda de peso definida (de acordo com o paciente)
- 3. Não avaliada.

B - Avaliada semanalmente pelo psiquiatra responsável, quando são medidas alterações reais de peso

- 0. Menos de 0,5 Kg de perda por semana.
- 1. Mais de 0,5 Kg de perda por semana.
- 2. Mais de 1 Kg de perda por semana.
- 3. Não avaliada.

**17. CONSCIÊNCIA**

- 0. Reconhece que está deprimido e doente.
- 1. Reconhece a doença, mas atribui-lhe a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, à necessidade de repouso, etc.
- 2. Nega estar doente.

**18. VARIAÇÃO DIURNA**

A - Observar se os sintomas são piores pela manhã ou à tarde. Caso NÃO haja variação, marcar "nenhuma".

- 0. Nenhuma
- 1. Pior de manhã.
- 2. Pior à tarde.

B - Quando presente, marcar a gravidade da variação. Marcar "nenhuma" caso NÃO haja variação.

- 0. Nenhuma.
- 1. Leve
- 2. Grave

**NOTA:** Caso haja variação diurna, só a contagem referente à sua gravidade (1 ou 2 pontos no ítem 18B) é que deve ser incluída na contagem final. O ítem 18 A não deve ser computado.

**19. DESPERSONALIZAÇÃO E PERDA DE NOÇÃO DE REALIDADE**

Tais como: sensações de irrealidade, idéias niilistas

- 0. Ausente
- 1. Leve
- 2. Moderadas
- 3. Graves
- 4. Incapacitantes

**20. SINTOMAS PARANÓIDES**

- 0. Nenhum.
- 1. Desconfiança.
- 2. Idéias de referência.
- 3. Delírio de referência e perseguição.

**21. SINTOMAS OBSESSIVOS E COMPULSIVOS**

- 0. Nenhum.
- 1. Leves.
- 2. Graves.

**SOMAR OS PONTOS OBTIDOS EM TODOS OS ÍTENS (EXCETO 18 A)**

**CONTAGEM TOTAL: \_\_\_\_ (0-62)**

### 10.3. Escala de Depressão de Beck

#### Inventário de Depressão de Beck

Nome \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Data de aplicação: \_\_\_\_\_ Pontuação: \_\_\_\_\_

#### Instruções

Neste questionário existem grupos de afirmações. Por favor leia cuidadosamente cada uma delas. A seguir selecione a afirmação, em cada grupo, que melhor descreve como se sentiu NA SEMANA QUE PASSOU, INCLUINDO O DIA DE HOJE. Desenhe um círculo em torno do número ao lado da afirmação seleccionada. Se escolher dentro de cada grupo várias afirmações, faça um círculo em cada uma delas. Certifique-se que leu todas as afirmações de cada grupo antes de fazer a sua escolha.

1.

0 Não me sinto triste.

1 Sinto-me triste.

2 Sinto-me triste o tempo todo e não consigo evitá-lo.

3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.

2.

0 Não estou particularmente desencorajado(a) em relação ao futuro.

1 Sinto-me desencorajado(a) em relação ao futuro.

2 Sinto que não tenho nada a esperar.

3 Sinto que o futuro é sem esperança e que as coisas não podem melhorar.

3.

0 Não me sinto fracassado(a).

1 Sinto que falhei mais do que um indivíduo médio.

2 Quando analiso a minha vida passada, tudo o que vejo é uma quantidade de fracassos.

3 Sinto que sou um completo fracasso.

4.

0 Eu tenho tanta satisfação nas coisas, como antes.

1 Não tenho satisfações com as coisas, como costumava ter.

2 Não consigo sentir verdadeira satisfação com alguma coisa.

3 Estou insatisfeito(a) ou entediado(a) com tudo.

5.

- 0 Não me sinto particularmente culpado(a).
- 1 Sinto-me culpado(a) grande parte do tempo.
- 2 Sinto-me bastante culpado(a) a maior parte do tempo.
- 3 Sinto-me culpado(a) durante o tempo todo.

6.

- 0 Não me sinto que esteja a ser punido(a).
- 1 Sinto que posso ser punido(a).
- 2 Sinto que mereço ser punido(a).
- 3 Sinto que estou a ser punido(a).

7.

- 0 Não me sinto desapontado(a) comigo mesmo(a).
- 1 Sinto-me desapontado(a) comigo mesmo(a).
- 2 Sinto-me desgostoso(a) comigo mesmo(a).
- 3 Eu odeio-me.

8.

- 0 Não me sinto que seja pior que qualquer outra pessoa.
- 1 Critico-me pelas minhas fraquezas ou erros.
- 2 Culpo-me constantemente pelas minhas faltas.
- 3 Culpo-me de todas as coisas más que acontecem

9.

- 0 Não tenho qualquer ideia de me matar.
- 1 Tenho ideias de me matar, mas não sou capaz de as concretizar.
- 2 Gostaria de me matar.
- 3 Matar-me-ia se tivesse uma oportunidade.

10.

- 0 Não costumo chorar mais do que o habitual.
- 1 Choro mais agora do que costumava fazer.
- 2 Actualmente, choro o tempo todo.
- 3 Eu costumava conseguir chorar, mas agora não consigo, ainda que queira.

11.

0 Não me irrita mais do que costumava.

1 Fico aborrecido(a) ou irritado(a) mais facilmente do que costumava.

2 Actualmente, sinto-me permanentemente irritado(a).

3 Já não consigo ficar irritado(a) com as coisas que antes me irritavam.

12.

0 Não perdi o interesse nas outras pessoas.

1 Interesse-me menos do que costumava pelas outras pessoas.

2 Perdi a maior parte do meu interesse nas outras pessoas.

3 Perdi todo o meu interesse nas outras pessoas.

13.

0 Tomo decisões como antes.

1 Adio as minhas decisões mais do que costumava.

2 Tenho maior dificuldade em tomar decisões do que antes.

3 Já não consigo tomar qualquer decisão.

14.

0 Não sinto que a minha aparência seja pior do que costumava ser.

1 Preocupo-me porque estou a parecer velho(a) ou nada atraente.

2 Sinto que há mudanças permanentes na minha aparência que me tornam nada atraente.

3 Considero-me feio(a).

15.

0 Não sou capaz de trabalhar tão bem como antes.

1 Preciso de um esforço extra para começar qualquer coisa.

2 Tenho que me forçar muito para fazer qualquer coisa.

3 Não consigo fazer nenhum trabalho.

16.

0 Durmo tão bem como habitualmente.

1 Não durmo tão bem como costumava.

2 Acordo 1 ou 2 horas antes que o habitual e tenho dificuldade em voltar a adormecer.

3 Acordo várias vezes mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir.

17.

- 0 Não fico mais cansado(a) do que o habitual.
- 1 Fico cansado(a) com mais dificuldade do que antes.
- 2 Fico cansado(a) ao fazer quase tudo.
- 3 Estou demasiado cansado(a) para fazer qualquer coisa.

18.

- 0 O meu apetite é o mesmo de sempre.
- 1 Não tenho tanto apetite como costumava ter.
- 2 O meu apetite, agora, está muito pior.
- 3 Perdi completamente o apetite

19.

- 0 Não perdi muito peso, se é que perdi algum ultimamente.
  - 1 Perdi mais de 2,5 kg.
  - 2 Perdi mais de 5 kg.
  - 3 Perdi mais de 7,5 kg.
- Estou propositadamente a tentar perder peso, comendo menos.
- Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

20.

- 0 A minha saúde não me preocupa mais do que o habitual.
- 1 Preocupo-me com problemas físicos, como dores e aflições, má disposição do estômago, ou prisão de ventre.
- 2 Estou muito preocupado(a) com problemas físicos e torna-se difícil pensar em outra coisa.
- 3 Estou tão preocupado(a) com os meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa.

21.

- 0 Não tenho observado qualquer alteração recente no meu interesse sexual.
- 1 Estou menos interessado(a) na vida sexual do que costumava.
- 2 Sinto-me, actualmente, muito menos interessado(a) pela vida sexual.
- 3 Perdi completamente o interesse na vida sexual.

**Total:** \_\_\_\_\_

**Classificação:** \_\_\_\_\_



#### 10.4. Guideline Strobe para estudos observacionais

	Item No	Recommendation	Page
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	58
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	58
<b>Introduction</b>			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	59
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	59
<b>Methods</b>			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	58 e 60
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	60
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up	NA
		<i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls	NA
		<i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	60
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed	NA
		<i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	NA
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	60 e 61
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	61
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	60 e 61
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	61
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	61 e 62
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	61 e 62
		(c) Explain how missing data were addressed	61 e 62
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed	NA
		<i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed	NA
		<i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA

<b>Results</b>			<b>Page</b>
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	62
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	NA
		(c) Consider use of a flow diagram	NA
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	62 e 63
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	NA
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	NA
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time	NA
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	NA
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures	62 e 63
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	62 a 64
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	62 e 63
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	NA
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	63 e 71
<b>Discussion</b>			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	64 a 66
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	64 a 66
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	64 a 66
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	66
<b>Other information</b>			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	57