

UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE

Angela Maria Brol

**BIOMARCADORES PROTEICOS EM MULHERES PORTADORAS
DE FIBROMIALGIA SUBMETIDAS À HIDROTERAPIA**

Dissertação de Mestrado

Joaçaba (SC)

2016

Angela Maria Brol

**BIOMARCADORES PROTEICOS PRESENTES EM MULHERES
PORTADORAS DE FIBROMIALGIA SUBMETIDAS À
HIDROTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biociências e Saúde, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biociências e Saúde da Universidade do Oeste de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Glauber
Wagner

Joaçaba (SC)

2016

B867b Brol, Angela Maria
 Biomarcadores proteicos em mulheres portadoras de
 fibromialgia submetidas à hidroterapia. / Angela Maria Brol.
 UNOESC, 2016.

40 f.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Glauber Wagner

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Oeste de
Santa Catarina. Programa de Mestrado em Biociências e
Saúde, Joaçaba, SC, 2016.

Bibliografia: f. 31 – 35.

1.Fibromialgia. 2. Hidroterapia. I.Título

CDD- 616.849

ANGELA MARIA BROL

BIOMARCADORES PROTEICOS PRESENTES EM MULHERES
PORTADORAS DE FIBROMIALGIA SUBMETIDAS À
HIDROTERAPIA

Esta dissertação foi julgada e aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biociências e Saúde no Programa de Mestrado em Biociências e Saúde da Universidade do Oeste de Santa Catarina.

Joaçaba, 30 de Abril de 2016.

Prof.(^a) Dr. Jovani Steffani

Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Glauber Wagner

Orientador

Prof. Dr. Antuani Rafael Baptistella

Universidade do Oeste de Santa Catarina

Examinador Interno

Prof. Dr. Marcelo Carlos Bortoluzzi

Universidade Estadual de Ponta Grossa

Examinador Externo

À minha mãe, pelo exemplo de vida que é e por estar ao meu lado me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis. Ao meu pai, que agora já está junto a Deus, e que me ensinou a importância da dedicação e persistência. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

* A Deus, por me amparar nos momentos difíceis que trilhei durante o período de mestrado, me dar força para superar as dificuldades e seguir em frente e também por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria chegado até aqui!

* Ao meu orientador Dr. Glauber Wagner, por acreditar em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder, por me mostrar o caminho da pesquisa e da ciência, por ser um exemplo de profissional e, principalmente, por me ensinar o dom da persistência e paciência nas pesquisas laboratoriais!

* À minha mãe, a quem amo muito, pelo carinho, paciência, incentivo e por nunca duvidar de minha capacidade. Pelas inúmeras idas e vindas dormindo no carro, me acompanhando e nunca me deixando sozinha!! Meu infinito agradecimento. Obrigada pelo amor incondicional!

* A todos os amigos que fizeram parte desses momentos, sempre me ajudando e incentivando. À minha amiga Adarly por ouvir meus desabafos incansavelmente inúmeras vezes. Obrigada pela amizade!

* Aos meus colegas de trabalho do Posto de Saúde, que me apoiaram em vários momentos e que me ouviram falar por horas sobre as tarefas do mestrado! Ao Secretário e ao Diretor de Saúde, os quais me forneceram apoio sempre que precisei. Obrigada pela compreensão e auxílio.

* A todos os meus colegas professores da Unoesc, os quais me incentivaram desde a aprovação para o mestrado. Obrigada pelo incentivo!

* As colegas do Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Unoesc Joaçaba, por me receberem tão bem. Principalmente à dedicada e incansável Valéria Zardo, pela ajuda durante todo o trabalho de laboratório. Obrigada por me acalmar quando os resultados não saíam como deveriam ser!!

* A todos os colegas do mestrado pelo convívio e aprendizado. Especialmente à Janaína, Marina, Flávia e Magda, que se tornaram amigas, obrigada por ouvirem minhas angústias! Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi maravilhoso poder contar com vocês!

* À minha família, meus tios, tias, primos e primas. E à excelente profissional Emanuely. Obrigada pela força!

* As mulheres e às pacientes que participaram espontaneamente deste trabalho, das sessões de Hidro e das coletas de material. Por causa de vocês é

que esta dissertação se concretizou. Vocês merecem meu eterno agradecimento!

* Ao Reumatologista Dr. Rafael Barbieri, pela participação na avaliação das pacientes. Obrigada pela colaboração!

* Às técnicas do Laboratório de Análises Clínicas de Piratuba. Obrigada pela colaboração!

* Ao Governo do Estado de Santa Catarina, através do Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina, pelo incentivo financeiro a mim concedido.

RESUMO

Introdução: A Fibromialgia (FM) é uma síndrome reumática não articular, que acarreta mialgia difusa, distúrbios do sono, rigidez matinal e alterações psicológicas, como depressão. Até o momento a terapêutica medicamentosa isolada não tem sido efetiva no tratamento dos sintomas de FM, porém tratamentos fisioterapêuticos, como a balneoterapia, têm sido reportados como uma conduta eficaz no tratamento e na melhora das condições de vida dos portadores desta síndrome. O diagnóstico de FM ainda é subjetivo, pois a falta de marcadores proteicos, fisiológicos ou genéticos específicos para esta síndrome, torna o diagnóstico um grande desafio para os profissionais da saúde. **Metodologia:** Mulheres com FM e saudáveis foram submetidas à sessões diárias de hidroterapia durante 10 dias. A evolução do quadro clínico e de qualidade de vida destas pacientes foi avaliada por meio de questionário FIQ. Foram coletadas amostras de saliva e de sangue destas pacientes para a avaliação de biomarcadores. Na saliva, foi avaliada a expressão da proteína fosfoglicerato mutase I (PGAM I), por meio de *Western blotting*. Amostras séricas foram quantificadas os marcadores inflamatórios TNF- α , interleucina (IL)-1, IL-2 e IL-10, a atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) por cinética química e a proteína C reativa (PCR) por método imunoturbidimétrico. **Resultados:** A amostra foi composta por um grupo de 11 mulheres fibromiálgicas e 11 mulheres saudáveis. Foi observado que as pacientes com FM apresentaram melhoras significativas no estado clínico após 10 dias de hidroterapia. Após este período de tratamento foi observada uma tendência de aumento (1,1 $\times$) na expressão da PGAM I na saliva das pacientes com FM e uma redução (1,2 $\times$) no grupo controle. Também foi observado que os níveis LDH sérico das pacientes sem FM é menor antes ($p=0.0243$) e após ($p=0.0002$) do que o observado para os pacientes com. Também observou-se que as pacientes com FM apresentaram níveis de IL-10 menores os indivíduos sem esta síndrome e a balneoterapia aumentou significativamente a expressão desta citocina em ambos os grupos ($p=0.0006$ e $p=0.00332$), concomitante com a diminuição da dor nos pacientes com FM. Já as citocinas inflamatórias (IL-1, IL-2 e TNF- α) estavam mais expressas em pacientes FM do que no grupo sem FM, contudo os níveis destas citocinas não reduziram significativamente após o tratamento. **Conclusões:** Pacientes com FM submetidas à hidroterapia por um período de 10 dias relataram melhoras no estado clínico. As análises apontaram aumento da expressão de PGAM I e IL-10, bem como diminuição dos níveis de LDH, IL-1, IL-2 e TNF, indicando, portanto diminuição da dor. A variação da expressão da proteína PGAM I indica esta enzima como um potencial biomarcador para o acompanhamento da terapia da fibromialgia. Além disto, a quantificação dos níveis séricos de IL-10 pode também ser utilizada com um parâmetro para o acompanhamento clínico em pacientes com FM.

Palavras-chave: Fibromialgia, Hidroterapia, Bioindicadores, PGAM I, Interdisciplinar, Citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Fibromyalgia (FM) is a nonarticular rheumatic syndrome that leads to diffuse myalgia, sleep disturbances and morning stiffness. As the treatment of FM symptoms is difficult, balneotherapy shown as effective strategy to improve the health conditions of patients. However the follow-up FM patient treatment is based on patient report due to the lack of biomarkers. **Methods:** this study evaluated the application of phosphoglycerate mutase I (PGAM I) and cytokines to monitoring FM patient underwent to balneotherapy treatment. Healthy (11) and with FM (11) women were submitted to daily sessions of balneotherapy during 10 days. Clinical and quality of life parameters were assessed through a FIQ questionnaire. Also, the variation of PGAM I expression in patients' saliva was assessed by western blotting. TNF- α , interleukin (IL-1, IL-2 and IL-10), lactate dehydrogenase enzyme (LDH) and C-reactive protein (CRP) were also evaluated. **Results:** It has been observed that patients with FM showed significant improvements in the clinical state after 10 days balneotherapy. After this treatment period was observed an increasing trend (1.1 $\times$) in the PGAM I expression in saliva of patients with FM and a decrease (1.2 $\times$) in FM without group. It was also observed that serum LDH levels of non FM patients is less than before ($P = 0.0243$) and after ($p = 0.0002$) than that observed for patients with. We also observed that patients with FM showed IL-10 levels smaller individuals without this syndrome and thermal therapy significantly increased the expression of this cytokine in both groups ($p = 0.0006$ and $p = 0.00332$), concomitant with the reduction of pain in FM patients. Since inflammatory cytokines (IL-1, IL-2 and TNF- α) were more expressed in FM patients than in the group without FM, however the levels of these cytokines not significantly reduced after treatment. **Conclusions:** Patients with FM undergoing thermal therapy for a period of 10 days reported improvements in clinical status. The analysis showed increased expression of PGAM I and IL-10 and a reduction of LDH levels, IL-1, IL-2 and TNF, thus indicating reduction of pain. The variation of PGAM I protein expression indicates this enzyme as a potential biomarker for monitoring fibromyalgia therapy. Moreover, quantifying the IL-10 serum levels may also be used as a parameter for clinical monitoring of patients with FM.

Keywords: Fibromyalgia, Hydrotherapy, Biomarkers, PGAM I, interdisciplinary, cytokines.

Lista de figuras

Figura 1: Expressão da proteína PGAM I (29 kDa) avaliada por *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-PGAM I. (A) Densitometria de bandas: gráfico apresentando a mediana e variação (pixels) observada nos indivíduos do grupo controle (GC) e pacientes com FM (FM), pré (BT) e pós (AT) o tratamento fisioterapêutico; (B) *Western blotting* representativo identificando a região de 29kDa (PGAM I) reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-PGAM I (1/1.000); (C) Região de 30kDa da membrana de nitrocelulose demonstrando a normalização da quantidade de proteína. Para o WB foram utilizadas 30µg de extrato total de proteína extraídas da saliva dos indivíduos.....22

Figura 2: Quantificação do LDH sérico das pacientes do grupo controle (GC) e do grupo de pacientes com fibromialgia (FM). O gráfico apresenta a mediana em mg/mL das 11 amostras analisadas para cada grupo pré e pós tratamento fisioterapêutico. Observa-se diferenças estatísticas significativas entre os grupos antes (* $p=0.0243$) e após o tratamento (** $p=0.0002$)23

Figura 3: Níveis séricos de IL-1 (A), IL-2 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) das pacientes de ambos os grupos pré e pós tratamento fisioterapêutico quantificados por Ensaio Imunoenzimático utilizando usando o kit Quantikine® (R&D Systems, Inc., MN. USA). Valores estatisticamente significativos: $p=0.0001$ (*); $p=0.0150$ (#); $p=0.0006$ (##); $p=0.0063$ (###) e $p=0.00332$ (□)24

Lista de tabelas

Tabela 1: Dados sócio-demográficos avaliados nas pacientes dos Grupos FM e controle.....19

Tabela 2: Evolução clínica, física e psicológica das pacientes com FM avaliadas no presente estudo, de acordo com os escores obtidos para cada item no FIQ.....21

Lista de abreviaturas e siglas

AVD's: Atividades de vida diária

CF: Capacidade funcional

ELISA: Ensaio imuno-enzimático

FIQ: Fibromyalgia Impact Questionnaire

FM: Fibromialgia

IL: Interleucina

LDH: Lactato Desidrogenase

mg: miligrama

mL: mililitro

MMII: membros inferiores

MMSS: membros superiores

PGAM I: Fosfoglicerato mutase I

WB: Western Blotting

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.1.1 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Fibromialgia.....	4
3.1.1 Fisiopatologia e Quadro Clínico	4
3.1.2 Aspectos Epidemiológicos.....	5
3.1.3 Diagnóstico e Avaliação	6
3.1.4 Formas de Tratamento.....	8
3.2 Hidroterapia no Tratamento da Fibromialgia	9
3.3 Potenciais biomarcadores em pacientes com FM.....	10
3.3.1 Citocinas e Lactato Desidrogenase (LDH)	10
3.3.2 Fosfoglicertato Mutase (PGAM).....	11
3.3.3 Pesquisa de biomarcadores a partir da saliva.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Aspectos Éticos e avaliação clínica dos pacientes.....	14
4.2 Tratamento Fisioterapêutico	15
4.3 Coleta de material biológico.....	15
4.4 Extração das proteínas.....	16
4.5 Avaliação da expressão da PGAMI	16
4.6 Quantificação dos marcadores em plasma	17
4.7 Análise Estatística	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO.....	25
7. CONCLUSÃO.....	29
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS A RESPEITO DA INTERDISCIPLINARIDADE	30
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

As doenças reumáticas acarretam um considerável impacto em termos físicos, psicológicos e sociais para os pacientes, sendo deste modo pertinente a utilização de medidas de avaliação multidimensionais no que diz respeito à qualidade de vida dos mesmos. Dentre estas patologias, destaca-se a Fibromialgia (FM), que é uma síndrome reumática não articular, de etiologia ainda desconhecida. Caracteriza-se por um quadro clínico polimorfo que inclui mialgia difusa, distúrbios do sono, rigidez matinal e alterações psicológicas, como depressão e ansiedade^(1,2). A FM é mais prevalente em mulheres do que em homens e seu diagnóstico ainda é prioritariamente clínico, uma vez que não há exames complementares capazes de identificar tal síndrome⁽³⁻⁵⁾. Sabe-se que a terapêutica medicamentosa isolada não tem sido eficiente no tratamento dos sintomas de FM⁽⁶⁾. No entanto, a hidroterapia apresenta-se como uma alternativa eficaz para a melhora do quadro clínico dos pacientes, em função de possíveis alterações na expressão de mediadores inflamatórios⁽⁷⁻⁹⁾. Porém, a subjetividade dos sintomas da FM, associada à falta de marcadores para seus mecanismos fisiopatológicos, torna o diagnóstico e tratamento dos pacientes um grande desafio para os profissionais da saúde⁽¹⁰⁾.

Neste sentido, a identificação de potenciais biomarcadores que possam ser utilizados para auxiliar o diagnóstico e o acompanhamento do tratamento de FM é importante. Dentre estes, destacam-se os biomarcadores sorológicos (como anticorpos, neuropeptídeos, marcadores inflamatórios), citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, proteínas diferencialmente expressas em pacientes com FM, como aciclofilina A, fosfoglicerato mutase I (PGAM I), calgranulinas (A e C)⁽¹¹⁻¹³⁾.

A PGAM I foi relatada por ser mais expressa em pacientes FM do que em indivíduos saudáveis. A PGAM I é uma enzima envolvida na oitava fase da glicólise, na catálise reversível do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato⁽¹⁴⁾. Como a FM é uma doença que resulta em um estresse oxidativo, especula-se que este fator pode estar envolvido na limitação de oxigênio aos tecidos biológicos⁽³⁾.

A FM, apesar de não ser classificada como uma doença inflamatória tem sido reportada por estar relacionada com desordens nos níveis de citocinas

anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, em especial como proteínas envolvidas na comunicação entre os sistemas imune e nervoso ^(1,2). Citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) IL-1, IL-2 e o IFN- γ induzem a resposta inflamatória, estimulam as células citotóxicas e recrutam macrófagos, enquanto citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 são expressas após o recrutamento de macrófagos e tem o papel de atenuar o processo inflamatório ^(5, 15).

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima importante no metabolismo dos glicídios, a qual apresenta seus níveis séricos elevados sempre que ocorre algum dano tecidual. Estudos sugerem que portadores de FM apresentam níveis elevados de LDH, quando comparados aos indivíduos saudáveis, mesmo em repouso, gerando acúmulo de ácido láctico muscular e consequente mialgia ^(16, 17).

Diante disso, há a necessidade de formação de conhecimentos interdisciplinares, congregando para a clínica às evidências básicas, como a proteômica, para validação ou refutação de possíveis biomarcadores para serem utilizados no prognóstico e intervenção em pacientes portadores de FM.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a variação da expressão da proteína fosfoglicetato mutase I (PGAM I) na saliva de pacientes com FM submetidas à hidroterapia, bem como os níveis de marcadores inflamatórios séricos (TNF- α , citocinas IL-1, IL-2 e IL-10) e da proteína LDH nessas pacientes.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a evolução clínica e sintomatologia das pacientes portadoras de FM submetidas à hidroterapia;
- Avaliar os níveis de expressão da PGAM I na saliva de pacientes com e sem FM, submetidas à hidroterapia, através de *Western Blotting*.
- Verificar a resposta inflamatória, por meio da análise de marcadores inflamatórios e dos níveis de LDH;
- Avaliar a correlação entre níveis de PGAM I em saliva de pacientes, com a evolução de seus quadros clínicos após hidroterapia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fibromialgia

3.1.1 Fisiopatologia e Quadro Clínico

A fibromialgia é uma síndrome dolorosa crônica, de etiologia ainda não esclarecida, caracterizada pela distribuição generalizada de queixas algicas e pela presença de pontos dolorosos à palpação em regiões específicas do corpo, conforme critérios definidos pelo colégio Norte-Americano de Reumatologia e validados para o contexto brasileiro em 1990 ⁽¹⁸⁾.

A fisiopatologia desta síndrome reside sobre os mesmos alicerces tão incertos e multicausais quanto a sua etiologia⁽⁵⁾. Evidenciam-se as explicações multifatoriais, onde a importância de fatores sociais, emocionais e familiares, aliados a uma característica de maior resposta aos estímulos dolorosos, o baixo nível de condicionamento cardiovascular e performance muscular são as hipóteses mais plausíveis^(2,19).

De acordo com um estudo realizado por Wolfe, Smythe & Yunus ⁽¹⁵⁾ os possíveis fatores de risco para a FM são depressão, história familiar (base genética), níveis elevados de somatização e ansiedade, rigidez matinal, alteração do sono, fadiga, cólon irritável, má percepção e satisfação com o estado de saúde.

Somam-se evidências de uma atuação não coordenada dos mecanismos de nocicepção e de inibição da dor, resultando numa percepção aumentada da dor. O modelo fisiopatológico que melhor descreve a FM parte da observação de que existe uma elevação da concentração de substância P (neuromodulador presente em fibras aferentes primárias do tipo C) e distúrbios metabólicos do metabolismo da serotonina. Quando estimuladas por fatores nociceptivos, há a liberação de substância P nas vias ascendentes e, qualquer distúrbio da sua produção, atividade funcional ou degradação pode resultar numa percepção

dolorosa defeituosa. Por outro lado, as vias descendentes inibitórias de dor, também parecem estar envolvidas, onde as alterações do metabolismo da serotonina implicam na redução da atividade do Sistema Inibidor de Dor, com uma consequente elevação da resposta dolorosa frente a estímulos algogênicos ou mesmo o aparecimento de dor espontânea^(2,9).

Em função desta diversidade de fatores que envolvem a fisiopatologia da FM, nota-se que o quadro clínico da FM costuma ser polimorfo. O sintoma comum a todos os pacientes é a dor difusa e crônica em determinados sítios anatômicos, determinados *tender points*. Além das manifestações músculo-esqueléticas, muitos dos pacientes queixam-se de sintomas não relacionados ao sistema locomotor, como cefaleia, tontura, dor abdominal, constipação, diarreia e dispneia. Outros sintomas centrais que acompanham o quadro doloroso são os distúrbios do sono, a fadiga e a dificuldade de concentração ^(1, 8).

3.1.2 Aspectos Epidemiológicos

Com o estabelecimento dos critérios diagnósticos da FM pelo Colégio Americano de Reumatologia, em 1990, os estudos de prevalência desta síndrome tornaram-se mais frequentes e passíveis de comparação entre si ⁽¹⁵⁾. Embora tais critérios tenham proporcionado a classificação da síndrome, ainda não há um consenso sobre a prevalência de FM na população e, tal diferença, provavelmente, seja resultado das distintas estratégias utilizadas para a detecção dos casos e dos diferentes critérios aplicados para tal diagnóstico no mundo. Diante disso, entre 2010 e 2011 o comitê de estudos para a fibromialgia do Colégio Americano de Reumatologia, elaborou novos critérios preliminares para o seu diagnóstico, considerando os outros sintomas além da dor difusa em detrimento da palpação dos pontos dolorosos⁽²⁰⁾.

Em uma revisão sistemática de literatura sobre a prevalência da FM na população, utilizando os critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia, foi possível chegar a uma prevalência da FM na população mundial que varia entre 0,66 e 4,4%, sendo mais prevalente em mulheres do

que em homens, especialmente na faixa etária entre 35 e 60 anos ⁽³⁾. Da mesma forma, em uma revisão realizada por Queiroz, ⁽⁴⁾ este demonstra que a prevalência global de FM é de 2,7%, sendo mais prevalente em mulheres acima dos 50 anos de idade, com baixa escolaridade e baixo nível socioeconômico e, possivelmente, em mulheres obesas. Já na América Latina, apenas um estudo realizado em Minas Gerais, Brasil, demonstra uma prevalência de 2,5%, sendo considerada a segunda desordem reumatológica mais frequente ⁽²¹⁾.

Observa-se também que fatores genéticos estão fortemente associados ao aumento da FM, pois, segundo de FM Buskila e Neumann ⁽²²⁾ a prevalência entre os familiares de indivíduos fibromiálgicos, especialmente entre em casos de consanguíneos, o diagnóstico positivo de FM é de 26% dos familiares, sendo superior entre as mulheres (41%) quando comparado aos homens (14%).

3.1.3 Diagnóstico e Avaliação

Na tentativa de homogeneizar as populações para a realização de estudos científicos, o Colégio Americano de Reumatologia, em 1990, definiu os seguintes critérios para classificação e diagnóstico da FM: queixas frequentes de dor difusa por um período de, pelo menos, três meses e presença de dor à palpação em, no mínimo, onze dos dezoito pontos dolorosos (*tender points*) pré-definidos e padronizados, inclusive para a população brasileira. Considerando que, tanto os exames laboratoriais de atividades inflamatórias, como os exames de imagem são normais, o diagnóstico da FM continua sendo prioritariamente clínico ^(1, 2, 18).

Apesar dos benefícios destes critérios clínicos de diagnósticos, ainda existem algumas falhas, como a predominância da dor difusa como o único sintoma para o diagnóstico em detrimento de outros sintomas cognitivos e somáticos importantes ^(5, 20).

Entre os anos de 2010 e 2011, o Colégio Americano de Reumatologia elaborou novos critérios preliminares para o diagnóstico desta condição, que

consiste na utilização de duas escalas padrão, as quais são baseadas nas informações dos pacientes e posteriormente, são convertidas em números para se estabelecer um valor de score. Uma destas escalas refere-se ao “índice de dor generalizada”, na qual o paciente assinala os locais do seu corpo em que tenha apresentado dor nos últimos sete dias, sendo os scores acima de sete (7) como um indicativo de FM. Já a segunda escala utilizada é a “escala de gravidade dos sintomas” e é baseada em sintomas definidos são: fadiga, sintomas cognitivos e sintomas somáticos, apresentados pelo paciente nos últimos seis meses, neste caso scores superiores a nove (9) podem indicar o diagnóstico positivo para a FM⁽²⁰⁾. Contudo, mesmo estes novos critérios ainda há significativas discussões que demonstram a necessidade de uma revisão e complementação para o diagnóstico da FM^(5, 14).

Neste sentido, pesquisas inovadoras a partir de abordagens proteômicas procuram estabelecer possíveis biomarcadores para o diagnóstico, monitoramento de respostas às terapias e prognóstico para a FM. Uma destas pesquisas foi realizada por Bazzichi et al.⁽¹²⁾, o qual comparou a expressão de proteínas presentes na saliva de 22 indivíduos diagnosticados com FM e 26 indivíduos saudáveis por meio de uma abordagem proteômica de gel bi-dimensional (2-D), e demonstrou a alteração na expressão das enzimas transaldose e fosfoglicerato mutase I (PGAM I) em pacientes com FM em relação ao grupo saudável.

Também há outra linha de estudos que propõe a utilização de marcadores inflamatórios (citocinas) como biomarcadores da FM. Menzies e Lyons⁽²³⁾ compilaram os resultados de várias pesquisas que objetivavam avaliar a relação entre a presença de citocinas e a FM, e demonstraram que há relação entre os níveis de expressão de determinadas citocinas e a FM. Porém, afirmam que existem muitos resultados discrepantes relacionados à possibilidade de citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias estarem elevadas ou reduzidas em indivíduos com FM. Já para Rodrigues-Pintó et al.⁽²⁴⁾, os níveis de alguns tipos de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 além do TNF (Fator de Necrose Tumoral) tem se mostrado elevados em pacientes com FM.

Mas há um consenso entre todos estes estudos, a urgência de novas pesquisas na área da genômica e da proteômica para estabelecer biomarcadores para o diagnóstico da FM.

3.1.4 Formas de Tratamento

O tratamento da FM permanece ainda voltado às manifestações clínicas, objetivando o alívio da dor, a melhora da qualidade do sono, o equilíbrio emocional e a diminuição da fadiga, através de medidas farmacológicas e não farmacológicas⁽¹⁾. De acordo com o Consenso Brasileiro de Tratamento da FM, a estratégia para o tratamento ideal da FM requer uma abordagem multidisciplinar, com a combinação de diversas modalidades terapêuticas e o tratamento deve ser elaborado em discussão com o paciente, de acordo com a intensidade da sua dor e funcionalidade do mesmo⁽⁶⁾.

Em relação ao tratamento farmacológico, está indicado o uso de antidepressivos tricíclicos (como a amitriptilina e a ciclobenzaprina); os bloqueadores seletivos da recaptação de serotonina (como a fluoxetina); os benzodiazepínicos (como o alprazolam) e os analgésicos (como o paracetamol e a dipirona)^(2, 6).

No que tange ao tratamento não medicamentoso, o exercício físico é de extrema importância e deve fazer parte do tratamento do portador de FM, já que a atividade física proporciona efeito analgésico, estimulando a liberação de endorfinas, proporcionando sensação de bem-estar global. Dentre os exercícios mais indicados está a atividade aeróbica de baixo impacto, como hidroterapia, natação e caminhadas. O suporte psicológico, através da abordagem cognitivo-comportamental, também tem se mostrado efetivo no tratamento destes pacientes, já que 25 a 50% dos pacientes com FM apresentam distúrbios psiquiátricos concomitantes ^(2, 6).

Com relação aos distúrbios psiquiátricos desenvolvidos por grande parte dos pacientes portadores de fibromialgia, alguns autores afirmam que, pelo fato da FM estar associada à fadiga generalizada, distúrbios do sono, rigidez matinal, dispnéia, ansiedade e alterações no humor, estes sintomas, na maioria

dos casos, podem evoluir para um quadro de depressão, afetando negativamente a qualidade de vida dos indivíduos portadores desta doença ^(25, 26). Souza et al.⁽²⁶⁾ confirmou que os pacientes com fibromialgia tem pior qualidade de vida e níveis mais altos de depressão quando comparados com pessoas sem esta patologia e, sugerem a existência de uma estreita relação entre fibromialgia e depressão e que esta pode ser considerada um sintoma secundário da fibromialgia.

3.2 Hidroterapia no Tratamento da Fibromialgia

A Hidroterapia, também conhecida como Fisioterapia Aquática, é um recurso que utiliza os efeitos físicos, fisiológicos e cinesiológicos advindos da imersão do corpo em piscina aquecida como um recurso benéfico na reabilitação e/ou prevenção de alterações funcionais. Esta técnica vem sendo utilizada desde a antiguidade para tratar doenças ortopédicas, reumatológicas, neurológicas, respiratórias e psicológicas ⁽²⁷⁾.

As propriedades físicas da água, somadas aos exercícios físicos na piscina, conduzem à melhora global do paciente com alguma disfunção, melhorando diretamente sua capacidade funcional e, principalmente, sua qualidade de vida. A hidrocinesioterapia, que trata-se de exercícios realizados em água, permite melhorar a amplitude de movimento das articulações, reduzir a tensão muscular, melhorar o relaxamento muscular, diminuir o impacto articular durante os exercícios e aliviar a sobrecarga e dor articular. Além disso, propicia analgesia, aumento da circulação sanguínea periférica e consequente redução do edema, fortalecimento muscular, estimula o equilíbrio e a coordenação, aumenta a flexibilidade e a força muscular, aumenta o condicionamento cardiovascular, auxilia na recuperação de problemas respiratórios. A hidroterapia proporciona ainda melhora do estado psicológico do indivíduo, através da diminuição dos níveis de estresse e de ansiedade e melhora da auto-estima, provavelmente, devido ao relaxamento físico, descontração, prazer, integração e socialização que a atividade aquática proporcionan ^(8, 27). Estes aspectos foram corroborados com a alteração na

expressão de proteínas presentes na saliva de indivíduos com FM submetidos a este tratamento ^(8,).

Em relação ao protocolo de hidroterapia a ser utilizado no tratamento de pacientes com FM, a média de duração das sessões deve ser de 40 minutos, com uma frequência semanal variando de 2 a 6 vezes, por um período de 2 a 4 semanas de duração. Os protocolos de exercícios mais utilizados são compostos de quatro fases: aquecimento global, alongamento muscular global, exercícios de fortalecimento e relaxamento, realizados nesta sequência ^(7, 28).

3.3 Potenciais biomarcadores em pacientes com FM

3.3.1 Citocinas e Lactato Desidrogenase (LDH)

As citocinas são pequenas proteínas não estruturais, secretadas por células específicas do sistema imunológico em resposta a um determinado estímulo. Estas moléculas atuam como mensageiros químicos entre células, induzindo o crescimento e a diferenciação celular, a reparação de tecidos, e a modulação de respostas imunológicas agudas e crônicas. Citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) IL-1, IL-2 e o IFN- γ estimulam linfócitos e recrutam macrófagos para o local da infecção, enquanto citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 são expressas após o recrutamento de macrófagos e induzem a redução do processo inflamatório com a diminuição da permeabilidade vascular e consequentemente recrutamento de macrófagos ^(5, 18, 20).

De forma simplista, as células apresentadoras de antígeno (APC) secretam a citocina IL-1 que aumenta a ativação das células T auxiliares 1 (TH1) que por sua vez produzem citocinas como a IL-2 e o IFN- γ promovendo o estímulo das células T citotóxicas, bem como estimulam o funcionamento dos próprios macrófagos. Em contraste com estas células, existem as TH2 que produzem as citocinas IL-4 e IL-10 que estimulam os linfócitos B e a produção de anticorpos. O IFN- γ inibe a proliferação das células TH2, enquanto que a IL-10 inibe o desenvolvimento das células TH1 ^(29, 30). Sabe-se que o aumento das citocinas pró-inflamatórias (como IFN- γ , IL-1 e IL-2) e a diminuição das citocinas

anti-inflamatórias (como IL-10 e IL-4), culminam em uma exacerbação da resposta inflamatória e conseqüente aumento do quadro álgico ^(30,41).

Embora ainda existam dúvidas sobre a etiologia da fibromialgia, as principais teorias apontam para um papel central das citocinas tanto na etiologia quanto na intensidade de sintomas físicos, apesar da discrepância dos resultados obtidos em diferentes estudos ⁽²³⁾.

Já com relação a enzima Lactato Desidrogenase (LDH), por ser uma enzima importante no metabolismo dos glicídios, o seu nível sérico elevado indica alterações nas condições fisiológicas dos indivíduos e conseqüentemente algum dano tecidual. Em portadores de FM é observado níveis elevados de LDH, quando comparados aos indivíduos saudáveis, mesmo em repouso, o que gera um acúmulo de ácido láctico muscular e conseqüente mialgia ^(14, 16).

3.3.2 Fofosfoglicerato Mutase (PGAM)

A enzima fofosfoglicerato mutase (PGAM) é responsável pela oitava fase da glicólise, catalizando a transferência reversível do grupo fosfato do Carbono 2 para o do Carbono 3 (transformando o fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato) ⁽³⁰⁾. A glicólise, é determinada como a via central de catabolismo da glicose, representando a principal fonte de energia metabólica humana, ocorre em uma sequência de dez reações enzimáticas. Esta via pode ocorrer de maneira aeróbica ou anaeróbica, dependendo da oferta de oxigênio. Em tecidos onde há o adequado suprimento de oxigênio, ocorre a glicólise do tipo aeróbica e o produto final são duas moléculas de piruvato. Ao contrário, em situações em que o suprimento de oxigênio é limitado, como em um músculo durante o exercício intenso, ocorre o processo anaeróbico, o qual resulta em duas moléculas de lactato. O encéfalo representa o principal local de consumo diário de glicose, através da via aeróbica e, a maior parte da energia restante é utilizada pelos eritrócitos e músculos esqueléticos e cardíaco ^(30, 31).

Pacientes com FM apresentam taxas aumentadas de LDH, a qual cataliza a conversão de piruvato em lactato. Então, o excesso de ácido láctico presente nos músculos gera mialgia, que é o principal sintoma relatado na FM.

Além disso, pesquisas recentes apontam que o exercício físico aeróbico reduz o quadro algico dos pacientes, provavelmente, devido à capacidade que o exercício aeróbico tenha de remover os níveis de ácido láctico muscular (28,40).

Um estudo realizado por Bazzichi et al.⁽¹³⁾, detectou que a enzima PGAM I encontrava-se em níveis elevados em mulheres portadoras de FM quando comparadas à população saudável. Estes autores sugerem que este fator pode estar envolvido na limitação do dano oxidativo aos tecidos biológicos, sendo então considerada um potencial biomarcador proteico em pacientes FM.

3.3.3 Pesquisa de biomarcadores a partir da saliva

O progresso de metodologias proteômicas têm aberto novas oportunidades para a obtenção de informações relevantes sobre processos normais e patológicos que ocorrem no organismo humano. Nos últimos anos, muitas questões biológicas têm sido respondidas pela proteômica e centenas de biomarcadores candidatos foram descobertos⁽¹⁰⁾.

Uma revisão de literatura, realizada por Barbosa et al.⁽¹⁰⁾, acerca das metodologias e aplicações da proteômica no estudo de doenças humanas, indica que muitos fatores afetam os resultados de análises proteômicas, especialmente nos fluidos corporais. Neste caso, as características do próprio paciente e do ambiente de coleta e armazenamento do material biológico podem influenciar os resultados das análises. Além disso, pesquisas apontam que o fator clínico destes estudos também enfrenta desafios, como a realização de análise prospectiva de populações representativas e bem caracterizadas, a fim de se obter poder estatístico e superar as limitações advindas da variabilidade individual e do processamento do material biológico. No entanto, apesar destes desafios, a literatura afirma que os resultados das abordagens proteômicas têm sido bastante úteis para a prática clínica, especialmente no diagnóstico, monitoramento de respostas às terapias e determinação de fatores de risco.

Conforme Barbosa et al.⁽¹⁰⁾, os tecidos afetados na maioria das doenças humanas são de difícil acesso e raramente são utilizados para análise de

rotina. Por outro lado, os fluidos corporais mostram-se adequados para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e prognósticas menos invasivas, além de serem apropriados quando é necessário o monitoramento longitudinal de determinadas condições.

Vários fluidos corporais órgão-específicos já foram caracterizados com perspectivas para a utilização clínica, como urina, líquido, plasma e saliva. A saliva, por tratar-se do fluido mais acessível do organismo, é um material biológico bem estudado por abordagens proteômicas. O grande interesse na saliva como fluido para a descoberta de biomarcadores diagnósticos tem levado à padronização do processo de coleta e armazenamento, já que vários fatores externos podem afetar seu fluxo e composição ⁽³²⁾.

Ainda de acordo com a análise feita por Barbosa et al.⁽¹⁰⁾, embora muitos estudos tenham identificado biomarcadores salivares em doenças locais e sistêmicas, sua validação em grupos amostrais grandes não está disponível e estudos de diferentes autores sobre a mesma doença mostram resultados conflitantes. Apesar disso, muitas associações interessantes têm sido referidas na literatura.

Estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar citocinas, anticorpos, mudança na concentração de aminoácidos e perfil proteômico de pacientes com FM. Estudo realizado por Bazzichi et al.⁽¹²⁾, objetivou avaliar as mudanças globais nos perfis proteômicos presentes na FM e buscar eventuais biomarcadores salivares que poderiam ser usados no manejo de pacientes portadores desta doença. O principal resultado deste estudo foi a observação de significativa expressão da trans-aldose e da PGAM I nos pacientes com FM, além de confirmar a natureza não-inflamatória desta patologia. Estes resultados preliminares demonstram a utilidade da análise proteômica na identificação de biomarcadores salivares em pacientes com FM e no esclarecimento dos aspectos patogênicos desta doença.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos e avaliação clínica dos pacientes

Este estudo foi realizado conforme a Resolução CNS 466/12 que envolve pesquisas com seres humanos, seguindo os princípios da autonomia, não maleficência, beneficência e justiça. Os indivíduos somente foram submetidos à pesquisa com prévia assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme APÊNDICE A. Os dados obtidos durante a pesquisa serão utilizados apenas para os objetivos desta, mantendo-se o anonimato dos/as entrevistados/as utilizando-se nomes fictícios para transcrever tais informações. Todos os participantes, inclusive o médico especialista em Reumatologia, que realizou a avaliação clínica das pacientes selecionadas para este estudo, receberam os esclarecimentos acerca da pesquisa e, então, assinaram a Declaração de Co-participação, conforme APÊNDICES B e C.

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste de Santa Catarina de Joaçaba, Santa Catarina, Brasil, sob o número 916.872.

Inicialmente, realizou-se uma reunião com todos os profissionais de saúde da UBS, a fim de esclarecer a pesquisa para os mesmos. Então, foi realizada uma busca ativa dos pacientes com possível diagnóstico de FM em um município de pequeno porte do Meio Oeste Catarinense, através de inquérito durante as visitas domiciliares realizadas pelas Agentes de Saúde (ACS's) e também pelos médicos das Estratégias de Saúde da Família (ESF's) durante as consultas realizadas na Unidade Básica de Saúde (UBS).

Após a avaliação, um total de 11 ($n=11$) indivíduos fibromiálgicos foram pré-selecionados para o presente estudo, considerando os seguintes critérios de inclusão os: (i) ser do sexo feminino, (ii) apresentar diagnóstico reumatológico positivo para FM (de acordo com os critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia), (iii) não possuir diagnóstico de

patologias associadas, (iv) não ser praticante de atividade física regular e (vi) ter sido diagnosticado pelo mesmo reumatologista. O grupo controle (GC), composto por 11 mulheres ($n=11$) sem diagnóstico de FM, de mesma faixa etária e não praticante de atividade física regular foram igualmente selecionadas. Para ambos os grupos foram coletadas informações relativas à idade, profissão, escolaridade uso ou não de fármacos. Já para o grupo FM foi aplicado o questionário *“Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ)”* ⁽³³⁾ para conhecer os aspectos clínicos envolvidos à patogenia, antes e após o tratamento fisioterapêutico (APÊNDICE D). Neste questionário foi avaliada a frequência de execução das principais atividades de vida diária (AVD's) dos pacientes, como fazer compras, cozinhar, limpar a casa, dirigir carro ou andar de ônibus. A partir das AVD's se determinou a capacidade funcional (CF) das pacientes.

4.2 Tratamento Fisioterapêutico

O tratamento fisioterapêutico se deu por meio da técnica de hidroterapia, sendo composto por 10 sessões de hidrocinésioterapia em águas termais, com temperatura média de 37°C, com cinco subseções semanais de 50 minutos de duração cada uma, durante o período de duas semanas consecutivas, de acordo com o protocolo adaptado de Silva et al.⁽⁸⁾. O protocolo executado foi composto de quatro fases: 1) aquecimento global com caminhada por toda a extensão da piscina em linha reta para frente e para trás, com passada lateral, durante 10 minutos; 2) alongamento dos principais grupos musculares dos membros superiores (MMSS), membros inferiores (MMI), tronco e pescoço, durante por 10 minutos; 3) exercícios aeróbicos e de fortalecimento muscular leves, inicialmente realizados sem carga externa e evoluindo para exercícios com o uso de “espaguete” e pesos aquáticos, durante por 20 minutos; 4) relaxamento, com alongamentos e exercícios respiratórios, durante 10 minutos. Os grupos FM e controle receberam as mesmas intervenções fisioterapêuticas, pelo mesmo profissional fisioterapeuta.

4.3 Coleta de material biológico

Para a avaliação dos níveis dos marcadores proteicos e inflamatórios dos grupos estudados utilizou-se como material biológico saliva e sangue, respectivamente. Os materiais biológicos foram coletados no primeiro dia antes da primeira sessão de hidroterapia e no último dia, após a última hidroterapia.

Para a avaliação de PGAM I, foi coletado de cada paciente, de ambos os grupos, 1-3 mL de saliva não estimuladas, em tubos estéreis, durante o primeiro horário da manhã (entre 6:00 e 7:00 h), antes de qualquer ingestão. As salivas foram mantidas em temperatura -20°C para extração proteica e avaliação da expressão de PGAM I.

Para a análise dos marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-10), foram coletados 20mL de sangue venoso periférico de cada indivíduo, também na primeira hora da manhã. As amostras sanguíneas foram mantidas a 4°C por 1 hora e centrifugadas a 5.000 x g por 15 minutos. O soro obtido a partir do sobrenadante foi armazenado em -80 °C para as análises.

4.4 Extração das proteínas

Proteínas solúveis foram obtidas pela precipitação com TCA-Acetona. Resumidamente, as amostras foram submetidas à centrifugação por 14.000 x g durante 30 minutos, à 4°C, para remoção de debris celulares. O sobrenadante foi precipitado com 10% de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich) em acetona durante uma hora à -20°C. Em seguida a solução foi centrifugada por 14.000 x g durante 15 minutos à 4°C e o precipitado lavado três vezes em acetona 100% nas mesmas condições. O precipitado final foi seco em temperatura ambiente durante 10 minutos. As proteínas foram solubilizadas em tampão de solubilização (2mM SDS, 22 % Glicerol, 100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 mM de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich)) e quantificadas por meio do método de Bradford, utilizando reagente Bradford (Bio-Rad®) e

leitura no comprimento de onda 595nm. Posteriormente as amostras foram armazenadas em -80°C.

4.5 Avaliação da expressão da PGAM I

Proteínas solúveis da saliva das voluntárias foram resolvidas em gel de poliacrilamida SDS-Page 1%. Para isso, foram solubilizadas 25 µg de proteínas totais em tampão de corrida 2x (SDS 10% 2 mL; 2-mercaptoetanol 500 µl; Glicerol 2mL; Azul de Bromofenol 2% 400 µl; Tris HCl 0,5% pH 6,8 2,5mL; água Miliq 10 mL), aquecidas durante 5 minutos a 95°C e resolvidas durante 2 horas sob 40mA.

Para o Western Blotting (WB), as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Bio-Sciences AB) em tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20% Metanol) por 16 horas a 25 V. Em seguida, as membranas foram coradas com Ponceau (Ponceau-S 0,1% em ácido acético 10%) e os padrões de massas moleculares identificados e assinalados. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas em solução PBS-Tween 20 (0,1%) contendo 5% de leite em pó desnatado a 4°C durante 12 horas. Após cinco ciclos de lavagem em solução de limpeza (PBS-Tween 20 0,1%) as membranas foram incubadas durante 90 minutos a 37°C com anticorpo anti-PGAM I humana (Santa Cruz) na diluição de 1:2,5 em solução de diluição (PBS com 2,5% de leite em pó desnatado). Em seguida, as membranas foram lavadas novamente e incubadas durante 60 minutos sob agitação com anti-IgG conjugado peroxidase (Santa Cruz) na diluição de 1:5.000 em solução de diluição. Após outra sequência de lavagens, a revelação foi realizada por quimioluminescência utilizando kit ECL (Amersham ECL) e após 5 minutos de exposição ao final radiográfico (Amersham Hyperfilm) foram reveladas imediatamente com reagentes de revelação (Kodak). Então, a expressão da proteína PGAM I foi avaliada baseada em densitometria de bandas utilizando o programa ImageJ e os resultados foram expressos em pixels.

4.6 Quantificação dos marcadores em plasma

A variação da enzima LDH e das citocinas TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-10 foram realizadas a partir do plasma sanguíneo (diluído 1:2 e 1:4) dos indivíduos de ambos os grupos, antes e após a intervenção. A quantificação da enzima da LDH foi realizada utilizando método de cinética química através do Kit Desidrogenasse Láctica LDH UV® (Bioclin). A Proteína C Reativa (PCR) foi quantificada através de teste imunoturbidimétrico (Bioclin, MG, Brasil). Já as citocinas IL-1, IL-2, IL-10 e TNF- α foram quantificadas através de Ensaio Imunoenzimático, usando o kit Quantikine® (R&D Systems, Inc., MN. USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados da LDH estão expresso em mg/mL, a quantidade de PCR em mg/dL e a quantidade de citocinas em pg/mL.

4.7 Análise Estatística

A comparação entre as frequências dos dados sócio-demográficos foi realizada utilizando teste não-paramétrico de χ^2 Pearson's. Para as análises estatísticas do FIQ, as respostas foram normalizadas em escala de 0-10, de acordo com Marques et al. (2006), sendo comparadas as médias do FIQ antes e após a intervenção por meio de teste *t-Student's* pareado.

Para avaliar variação da expressão da proteína PGAM I pelo WB foi aplicado o teste *One-way analysis of variance* (ANOVA), seguido pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni's Multiple Comparison*. E as variações de níveis das citocinas e de LDH entre os grupos foi utilizado o teste *t-Student's* pareado. Para todos os métodos foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando valores de $p < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPadPrism - Versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação Clínica

As características sócio-demográficas das pacientes do grupo FM e Controle foram avaliadas durante a anamnese (Tabela 1). A faixa etária dos dois grupos foi semelhante, assim como o grau de escolaridade. A atuação profissional dos indivíduos de ambos os grupos foram avaliadas e a maioria das portadoras de FM eram agricultoras, enquanto que a maioria das mulheres do grupo controle eram comerciantes. Majoritariamente, pacientes do grupo FM são beneficiárias do Instituto Nacional de Serviço Social (INSS), relatando tempo médio de auxílio de 5,1 anos. Em relação ao uso de medicação contínua, pacientes do grupo controle usavam diuréticos e anti-hipertensivos, já as pacientes do grupo FM relataram o uso de diuréticos e anti-hipertensivos, antidepressivos, ansiolíticos, relaxantes musculares e anti-inflamatórios.

Em relação à evolução clínica e física dos grupos, observaram-se melhorias significativas pós-tratamento no grupo FM (Tabela 2).

Foi observado que 31,4% das pacientes relataram sensação de bem-estar nos últimos 7 pós-tratamento e que houve uma redução de 30% no número de dias que essas mulheres relataram não terem conseguido trabalhar em decorrência dos sintomas gerados pela FM. Com relação a dor, 63,6% das pacientes relataram sentir muita dor na avaliação antes da intervenção, contudo apenas 9,09% delas afirmou sentir apenas “*um pouco*” de dor ao final da intervenção. Outro fator importante é que 63,6% das mulheres relataram não mais apresentar rigidez matinal ao final da intervenção. Os sintomas psíquicos avaliados, ansiedade e depressão, não apresentaram variação ao final da intervenção. As principais atividades de vida diária (AVD's) reportadas pelas pacientes com FM após intervenção foram fazer compras, cozinhar, limpar a casa, dirigir carro ou andar de ônibus.

Tabela 1: Dados sócio demográficos avaliados nas pacientes dos Grupos FM e controle.

Aspectos sócio-demográficos		Grupo FM (n=11)	Grupo Controle (n=11)
Idade média (anos) *			
Idade		46-63 ($\pm 53,2$)	42-69 ($\pm 51,8$)
Escolaridade (%) *			
Fundamental Incompleto		54,5	36,4
Fundamental Completo		18,2	36,4
Médio Completo		27,3	27,2
Ocupação Profissional (%)			
Comerciante		18,2	45,4
Empregada Doméstica		0,0	27,2
Costureira		0,0	9,1
Do lar		18,2	9,1
Agricultora		36,4	0,0
Aposentada		27,2	9,1
Outros dados			
Recebe Benefício INSS		90,9	9,1
Uso Medicação Contínua *		100,0	45,4

*p ≤ 0.007

Tabela 2: Evolução clínica, física e psicológica das pacientes com FM avaliadas no presente estudo, de acordo com os escores obtidos para cada item no FIQ.

	Pré Tratamento¹	Pós Tratamento¹	Valor de <i>p</i>
Capacidade Funcional (CF) Score	0.47 (0.27 - 0.77)	0.3 (0.03 - 0.63)	<i>p</i> =0.0001
Sentir-se Bem (Dias)	1 (0 - 7)	5 (0 - 7)	<i>p</i> =0.0027
Falta ao trabalho (Dias)	4 (0 - 7)	2 (0 - 4)	<i>p</i> =0.0049
Habilidade no Trabalho	1 (0.67 - 1.00)	0.67 (0.33 - 1.00)	
Dor	1 (0.67 - 1.00)	0.67 (0.67 - 1.00)	
Fadiga	0.67 (0.67 - 1.00)	0.67 (0.33 - 1.00)	
Acordar Cansado	0.67 (0.33 - 1.00)	0.33 (0.33 - 0.67)	
Rigidez	0.67 (0.33 - 1.00)	0.33 (0.33 - 0.67)	
Ansiedade	0.67 (0.67 - 1.00)	0.67 (0.33 - 1.00)	
Depressão	0.67 (0.33 - 1.00)	0.67 (0.33 - 1.00)	
Score FIQ	6.75 (5.30 - 8.23)	5.44 (3.89 - 6.96)	<i>p</i>=0.0001

¹ Valores: Mediana (Mínimo – Máximo)

5.2 Análise da Expressão de Proteína PGAM I

Os valores da mediana da expressão de PGAM I foram calculados e comparados, antes e após o tratamento fisioterapêutico em ambos os grupos. Apesar da expressão da proteína PGAM I em indivíduos do grupo FM e controle após o tratamento tenham sido similares, sem diferenças estatísticas, notou-se que antes do tratamento esta proteína esteve mais expressa no grupo GC do que no grupo FM. Também observou-se que a expressão de PGAM I aumentou em 1.1 vezes no grupo FM após o tratamento, se comparado com a expressão anterior ao tratamento (Figura 1).

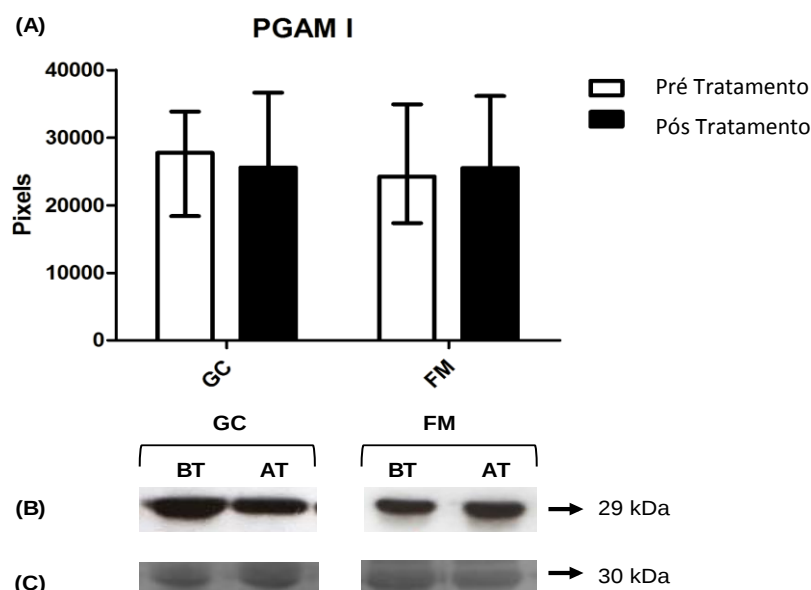


Figura 1: Expressão da proteína PGAM I (29 kDa) avaliada por *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-PGAM I. (A) Densitometria de bandas: gráfico apresentando a mediana e variação (pixels) observada nos indivíduos do grupo controle (GC) e nas pacientes com FM (FM), pré (BT) e pós (AT) o tratamento fisioterapêutico; (B) *Western blotting* representativo identificando a região de 29kDa (PGAM I) reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti-PGAM I (1/1.000); (C) Região de 30kDa da membrana de nitrocelulose demonstrando a normalização da quantidade de proteína. Para o WB foram utilizadas 30µg de extrato total de proteína extraídas da saliva dos indivíduos.

5.3 Concentração de LDH sérica

Com relação ao nível de LDH, observou-se que tanto no grupo controle quanto no grupo FM houve uma leve redução nos níveis desta enzima (Figura 2) após o tratamento, contudo apenas no grupo controle esta redução foi significativa ($p=0,0239$). Também foi possível observar que, em relação aos grupos, o nível de LDH nos pacientes com FM é mais elevado do que os indivíduos do grupo controle, tanto antes quanto após ao tratamento.

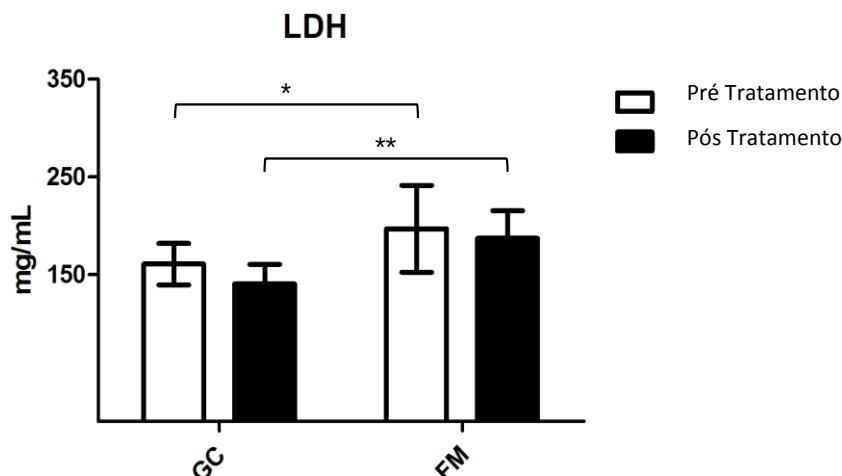


Figure 2: Quantificação do LDH sérico das pacientes do grupo controle (GC) e do grupo de pacientes com fibromialgia (FM). O gráfico apresenta a mediana em mg/mL das 11 amostras analisadas para cada grupo pré e pós tratamento fisioterapêutico. Observa-se diferenças estatísticas significativas entre os grupos antes (* $p=0.0243$) e após o tratamento (** $p=0.0002$).

5.4 Marcadores pró e anti-inflamatórios IL-1, IL-2, TNF e IL-10

Após a quantificação dos níveis séricos de IL-1, IL-2, TNF e IL-10 dos indivíduos de ambos os grupos antes e após o tratamento fisioterapêutico (Figura 3), observou-se que houve uma redução nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2 e TNF- α no grupos com FM, apesar desta redução não ser significativa ($p>0.05$). Contudo, houve um aumento significativo dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 após o tratamento em ambos os grupos. Também podemos ressaltar que as pacientes com FM apresentam níveis maiores de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2 e TNF- α) e níveis inferiores da citocina anti-inflamatória IL-10 quando comparado com o grupo controle (GC), tanto antes quanto após a intervenção, sendo estas diferenças significativas.

Com relação a Proteína C Reativa (PCR), os níveis desta proteína foram inferiores ao valor de referência (6mg/dL) em todos os indivíduos de ambos os grupos, desta forma determinado como não reagente e sem valores quantitativos.

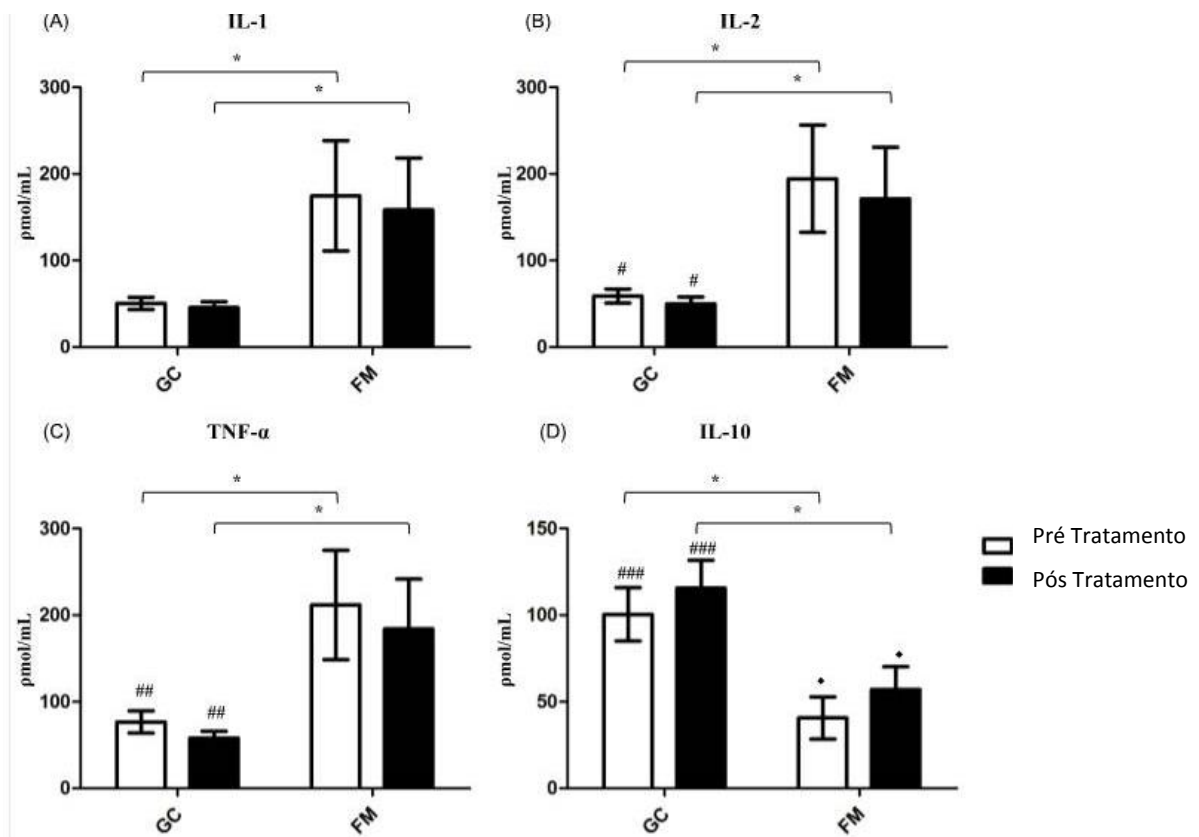


Figure 3: Níveis séricos de IL-1 (A), IL-2 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) das pacientes de ambos os grupos pré e pós tratamento fisioterapêutico quantificados por Ensaio Imunoenzimático utilizando usando o kit Quantikine® (R&D Systems, Inc., MN. USA). Valores estatisticamente significativos: $p=0.0001$ (*); $p=0.0150$ (#); $p=0.0006$ (##); $p=0.0063$ (###) e $p=0.00332$ (□).

6. DISCUSSÃO

A identificação da FM por meio de biomarcadores tem sido apresentada como uma estratégia para o seu diagnóstico, bem como o acompanhamento do tratamento de indivíduos portadores de FM ⁽¹⁰⁾. Dentre estes bioindicadores, destacam-se a busca por anticorpos, neuropeptídios, marcadores inflamatórios, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, e proteínas com a aciclofilina A, PGAM I calgranulinas (A e C) ⁽¹²⁾.

No presente estudo foi avaliada a variação da expressão de PGAM I na saliva de mulheres portadoras de FM e de marcadores séricos inflamatórios como as citocinas TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-10 e a enzima LDH. Estes parâmetros foram avaliados antes e após o tratamento fisioterapêutico por hidroterapia.

As pacientes FM possuíam faixa etária e grau de escolaridade semelhante às pacientes do grupo controle, no entanto referiam quanto às atividades profissionais, sendo que pacientes FM majoritariamente declararam-se agricultoras (beneficiárias do INSS), e às do grupo controle comerciantes. Atividades que demandam demasiado esforço físico e repetitividade de movimentos, como agricultura familiar, atividades domésticas e outras, podem comprometer estruturas musculoesqueléticas, levando muitas vezes á quadros depressivos por incapacidade trabalhista⁽³⁴⁾.

Neste trabalho também observamos quadros depressivos nas pacientes com FM, o que justifica o uso contínuo de antidepressivos e ansiolíticos. Este fato é comum em pacientes com FM. Kaplan (2000) ⁽³⁵⁾ e Neumann (2000) ⁽³⁶⁾ demonstram que o quadro depressivo destes pacientes ocorre em razão da cronicidade da FM, levando a necessidade do uso de medicamentos para o controle desta depressão.

Como alternativa de tratamento à fibromialgia, a hidroterapia tem sido descrita como eficiente na redução da dor e no aumento da capacidade funcional dos indivíduos. Com base nos resultados do FIQ, observou-se que os pacientes com FM tratados por hidroterapia pelo período de 10 dias, apresentaram melhorias significativas na qualidade das AVD's, alívio da dor e aumento de atividades cotidianas. Apesar de estes resultados confirmarem a eficácia deste tipo de tratamento para esta doença, como já reportado na literatura (Buskila, 2001) ⁽³⁷⁾, a avaliação da qualidade de vida dos pacientes

com FM na rotina clínica não utiliza bioindicadores como parâmetros para avaliar a melhora do quadro destes pacientes.

Neste sentido, este estudo avaliou possíveis bioindicadores do quadro clínico de pacientes FM, como a variação da expressão da proteína PGAM I presente na saliva dos pacientes e marcadores inflamatórios, como o TNF- α , a IL-1, IL-2 e IL-10. Para Wong (2006) o uso de saliva como material biológico é promissor na busca por biomarcadores de enfermidades, uma vez que se trata de um método de coleta não invasivo, reduzindo o desconforto e a ansiedade do paciente.

Resultados mostraram que PGAM I foi similarmente expressa em indivíduos do grupo FM e controle, no entanto, notou-se que a expressão de PGAM I aumentou em 1.1 vezes no grupo FM após o tratamento, se comparado com a expressão anterior ao tratamento e no grupo controle esta expressão reduziu em 1.2 vezes. Apesar desta variação não ser significativamente distinta entre os grupos, estes dados não são similares a Bazzichi et al.⁽¹³⁾, que detectou PGAM I em níveis elevados em mulheres portadoras de FM, quando comparadas à população saudável. Estes mesmos autores, demonstram uma redução da expressão desta enzima em pacientes com FM tratados durante 15 dias com banho de lama e balneoterapia na Itália. Bioquimicamente, a PGAM I é uma enzima presente no final da via glicolítica, tem sua expressão aumentada em condições de aerobiose, e tem como função a conversão do 3-Fosfoglicerato para o 2-Fosfoglicerato, etapa fundamental para a formação do piruvato e entrada no ciclo de Krebs, bem como fisiologicamente, a deficiência em apenas 5% na atividade da PGAM I nos músculos leva fadiga, contraturas e outras mialgias durante exercício extremo (39, 40).

O aumento da atividade da PGAM I tende a reduzir a formação de lactato, mediado pela LDH, assim reduzindo o acúmulo de ácido láctico muscular podendo auxiliar na redução das dores musculares⁽⁴⁰⁾, o que foi observado no presente estudo. As pacientes com FM apresentam níveis mais elevados de LDH do que o grupo controle (Figura 2), e em ambos os grupos foi observada uma redução dos níveis de LDH após o tratamento, mesmo que esta redução não tenha sido significativa. Desta forma, estes dados combinados indicam o potencial uso da PGAM I presentes na saliva de

pacientes com FM como potencial biomarcador para acompanhar a melhora em pacientes FM por meio da hidroterapia, e também poderia ser utilizado no diagnóstico da enfermidade. Porém, pressupõe-se que um protocolo mais longo de hidroterapia poderia, talvez, evidenciar resultados mais específicos. Presume-se que ao final da via glicolítica, a PGAM I é direcionada para formação de Piruvato, reduzindo a formação de lactato e, podendo ser responsável pela redução nas dores musculares, melhorando o bem estar do paciente.

Com relação aos marcadores inflamatórios, apesar da FM ainda não ser considerada como uma doença inflamatória, desordens nos níveis de citocinas vem sendo reportadas na literatura⁽¹⁻³⁾. Estudos apontam que as citocinas podem ter um papel tanto na etiologia quanto na intensidade de sintomas de FM, sugerindo que estas moléculas podem desempenhar um papel na comunicação entre os sistemas imune e nervoso⁽⁶⁻⁸⁾.

No presente trabalho, os níveis séricos de citocinas pró-inflamatória (IL-1, IL-2 e TNF- α) estavam elevadas antes da hidroterapia em pacientes com FM, mesmo em pacientes que administravam anti-inflamatórios, se comparados com os níveis nos pacientes do grupo controle (Figura 3). Interessantemente é que estas citocinas não reduziram significativamente no grupo com FM após o tratamento com balneoterapia, apenas a IL-2 teve uma redução significativa nos indivíduos do grupo controle após o tratamento. Já com relação à citocina anti-inflamatório IL-10, nota-se que o grupo controle apresenta níveis de IL-10 maiores que os pacientes com FM; Em contrapartida ficou evidente um aumento na expressão da citocina anti-inflamatório IL-10 em ambos os grupos após serem submetidos à hidroterapia (Figura 3-D).

Os resultados aqui apresentados corroboram estudo descrito por Wallace et al.⁽³⁰⁾, que sugerem que o aumento de IL-10 é um importante fator de bloqueio da dor, pois auxilia na redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, que podem ser responsáveis pela dor. As citocinas são mediadores necessários para realizar a resposta inflamatória, sendo que as anti-inflamatórias, como IL-10 pode minimizar a infecção e seus efeitos indesejáveis ⁽⁴¹⁾. IL-10 é descrita como supressora de citocinas pró-inflamatórias, sendo relatada na prevenção da rejeição de enxertos, no tratamento de sepsia, artrite reumatóide e psoríase⁽⁴²⁾.

Assim, é possível inferir no presente estudo que a hidroterapia induziu o aumento os níveis de IL-10, o que colabora com a diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em pacientes FM, a diminuição das dores reportada pelos pacientes com FM e, conseqüentemente, melhorando a qualidade de vida desses pacientes.

CONCLUSÃO

* As pacientes com FM submetidas à hidroterapia por um período de 10 dias relataram melhoras do quadro clínico geral, principalmente no que diz respeito à dor.

* As análises laboratorias evidenciaram que a PGAM I, inicialmente, apresentava-se mais elevada no grupo controle quando comparada às mulheres com FM. Porém, após o tratamento fisioterapêutico com hidroterapia, a concentração desta proteína aumentou no grupo FM e diminuiu no grupo Controle, apesar de não ter apresentado diferença estatística significativa.

* As análises deste estudo apontaram um aumento na expressão da IL-10 (a qual trata-se de uma citocina anti-inflamatória) e uma redução nos níveis de IL-1, IL-2 e TNF (citocinas pró-inflamatórias) após o tratamento com hidroterapia.

* Foi possível observar que o grupo controle apresentou níveis de LDH menores que dos pacientes com FM, além de uma discreta diminuição da LDH após a intervenção fisioterapêutica.

* A variação da expressão da proteína PGAM I indica esta enzima como um potencial biomarcador para o acompanhamento da terapia da fibromialgia, apenas em tratamentos mais prolongados do que os utilizados neste protocolo. Contudo, os níveis séricos de IL-10 apresentam uma resposta mais rápida ao tratamento e poderia ser utilizada com um parâmetro para o acompanhamento clínico em pacientes com FM em intervenções mais curtas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS A RESPEITO DA INTERDISCIPLINARIDADE

A FM é uma doença que necessita de intervenções do fisioterapeuta e acompanhamento reumatológico constante. Contudo, apesar de se conhecer diferentes metodologia para tratamento desta doença, não existem métodos laboratoriais que permitem o profissional acompanhar a melhoria clínica de um paciente.

Desta forma, o conhecimento e a aplicação de metodologias, de acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, poderão contribuir para a melhoria da condução terapêutica dos pacientes, tendo em vista a necessidade de uma formação profissional com conhecimentos interdisciplinares e com habilidades para investigação científica e produção em biociências e saúde, condicionando a atuação no diagnóstico, promoção e intervenção da saúde.

Acredita-se que com a utilização métodos inovadores na fisioterapia, para o tratamento da FM, como a aplicação de marcadores biológicos no acompanhamento da intervenção de FM, é possível incrementar o conhecimento científico, contribuindo para a melhoria da saúde dos pacientes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Provenza JR, Pollak DF, Martinez JE, Paiva ES, Helfenstein M, Heymann R, Matos JMc, Souza EJR (2004) Fibromialgia. Rev. Bras. Reumatol 44:443-449. doi: [dx.doi.org/10.1590/S0482-50042004000600008](https://doi.org/10.1590/S0482-50042004000600008)

- 2 - Ablin J, Neumann L, Buskila D (2008) Pathogenesis of Fibromyalgia: a review. Joint Bone Spine 75:273-279. doi: [10.1016/j.jbspin.2007.09.010](https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.09.010)

- 3 - Cavalcante AB, Sauer JF, Chalot SD, Assumpção A, Lage LV, Matsutani L, Marques AP (2006) A Prevalência de Fibromialgia: uma revisão de literatura. Rev. Bras. Reumatol 46:40-48. doi: [dx.doi.org/10.1590/S0482-50042006000100009](https://doi.org/10.1590/S0482-50042006000100009)

- 4- Queiroz LP (2013) Worldwide Epidemiology of Fibromyalgia. Curr Pain Headache Rep 17:356. doi: [10.1007/s11916-013-0356-5](https://doi.org/10.1007/s11916-013-0356-5)

- 5- Fitzcharles M, Shir Y, Ablin JN, Buskila D, Amital H, Henningsen P, Winfried HW (2013) Classification and Clinical Diagnosis of Fibromyalgia Syndrome: recommendations of recent evidence-based interdisciplinary guidelines. J Evid Based Complementary Altern Med 1-9. doi: [10.1155/2013/528952](https://doi.org/10.1155/2013/528952)

- 6-Heymann RE, Paiva ES, Helfenstein M et al (2010) Consenso Brasileiro do Tratamento de Fibromialgia. Rev. Bras. Reumatol 50:56-66.

- 7-McVeigh JG, McGaughey H, Hall M, Kane P (2008) The effectiveness of hydrotherapy in the management of fibromyalgia syndrome: a systematic review. Rheumatol Int 29:119-130. doi: [10.1007/s00296-008-0674-9](https://doi.org/10.1007/s00296-008-0674-9).

- 8-Silva KMOM, Tucano SJP, Kumpel C, De Castro AAM, Porto EF (2012) Efeito da Hidrocinesioterapia sobre a qualidade de vida, capacidade funcional e qualidade do sono em pacientes com fibromialgia. Rev. Bras. Reumatol 52:846-857. doi: [dx.doi.org/10.1590/S0482-50042012000600004](https://doi.org/10.1590/S0482-50042012000600004)

9-Hecker CD, Melo C, Tomazoni SS, Martins RABL, Leal Junior ECP (2011) Análise dos Efeitos da Cinesioterapia e da Hidrocinesioterapia sobre a Qualidade de Vida de Pacientes com Fibromialgia: um ensaio clínico randomizado. *Fisioter. Mov* 24:57-64. doi: [dx.doi.org/10.1590/S0103-51502011000100007](https://doi.org/10.1590/S0103-51502011000100007)

10-Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Trovó De Marqui AB, Tajara EH (2012) Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev. Assoc. Med. Bras* 58:366-375. doi: [dx.doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019](https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019)

11-Uçeyler N, Valenza R, Stock M, Schedel R, Sprotte G, Sommer C (2006) Reduced levels of anti-inflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis Rheum* 54:2656-2664. doi: [10.1002/art.22026](https://doi.org/10.1002/art.22026)

12-Bazzichi L, Ciregia F, Giusti L, Baldini C, Giannaccini G, Giacomelli C, Sernissi F, Bombardieri S, Lucacchini A (2009) Detection of potencial markesrs of primary fibromyalgia syndrome in human saliva. *Proteomics Clin Appl* 3:1296-1304. doi: [10.1002/prca.200900076](https://doi.org/10.1002/prca.200900076)

13 - Bazzichi L, Da Valle Y, Rossi A, Giacomelli C, Sernissi F, Giannaccini G, Bettl L, et al (2013) A Multidisciplinary Approach to Study the Effects of Balneotherapy and Mud-bath Therapy treatments on Fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol* 31:111-120.

14-Toda, K (2011) The Modification of the American College of Rheumatology Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia Should Be Supplemented and Revised. *J Rheumatol* 38:2074. doi: [10.3899/jrheum.110343](https://doi.org/10.3899/jrheum.110343)

15-Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB et al (1990) The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 33:160-172.

- 16-Mciver KL, Evans C, Kraus RM, Ispas L, Sciotti VM, Hickner RC (2005) NO-Mediated alterations in skeletal muscle nutritive blood flow and lactate metabolism in fibromyalgia. *Pain* 120:61-69.

- 17-Gerdle B, Soderberg K, Salvador Puigvert L, Rosendal L, Larsson B (2010) Increased interstitial concentrations of pyruvate and lactate in the trapezius muscle of patients with fibromyalgia: a microdialysis study. *J Rehabil Med* 42:679-687. doi: 10.2340/16501977-0581

18. Atallah-haum M, Pollak D, Ferraz D. A validação dos critérios do Colégio Americano de Reumatologia para classificação de fibromialgia em uma população brasileira. *Rev. Bras. Reumatol.* 1999; 39: 221-30.

19. Riberto M, Pato TR. Fisiopatologia da Fibromialgia. *Acta Fisiat.* 2004; 11(2): 78-81.

20. Wolfe F, et al. (2011). Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *J Rheumatol*, 38 (6): 1113-22. doi. 21285161.

21. Senna ER, et al (2004). Prevalence of Rheumatic Disease s in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J. Rheumatol.*,. 31 (3): 594-97.

22. Buskila D, Neumann L. (1997). Fibromyalgia syndrome (FM) and nonarticular tenderness in relatives of patients with FM. *J. Reumatol.*, 24 (5): 941-44. doi. 9150086.

23. Menzies V & Lyon DE, 2010. Integrated Review of the Association of Cytokines with Fibromyalgia and Fibromyalgia Core Symotoms. *Biol Res Nurs.*, 1(4):387-94. doi. 19933683.

24. Rodriguez-Pintó I, Agmon-Levin N, Howard A, Shoenfeld Y (2014). Fibromyalgia and cytokines. *Immunol Lett.*, 1(2): 200-2003. doi.

25. Annemans L, et al., 2008. Health economic consequences related to the diagnosis of fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum.* , 58(3):895-902. doi. ID 8311794
26. Souza AMB, Assumpção A, Matsutani LA, Pereira CAB, LAGE LV, Marques AP, (2006). Depressão e Qualidade de Vida em Pacientes com Fibromialgia. *Rev. Bras. Fisioter.*,10(3): 317-24. doi. 17273685.
27. Bates A, Hanson N. Exercícios Aquáticos Terapêuticos. 1 ed. São Paulo: Manole, 1998.
- 28-Langhorst J, Musial F, Klose P, Hauser, W (2009) Efficacy of hydrotherapy in fibromyalgia syndrome – a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Rheumatol* 48:1155-1159. doi: 10.1093/rheumatology/kep182
29. Ikram N, Hassan K, Tufail S. Cytokines, 2016. *International Journal of Pathology*, 2: 47-58.
- 30 - Wallace DJ (2006) Is there a role for cytokine based therapies in fibromyalgia? *Curr Pharm Des* 12:17-22.
31. Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
32. Hu S, Loo JA, Wong DT, 2007. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*, 4(4): 531-38. doi. 17705710.
- 33- Marques, AP, Barsante S, Assumpção A, Matsutani LA, Lage LV, Pereira, CAB. (2006) Validação da Versão Brasileira do Fibromyalgia impact Questionnaire (FIQ). *Rev. Bras. Reumatol* 46:24-31.
- 34-Buckle P (2005) Ergonomics and Musculoskeletal disorders: overview. *Occup Med* 55:164-167. doi: 10.1093/occmed/kqi081

35-Kaplan RM, 2000. Quality of Well Being in Patients with Fibromyalgia. *J Rheumatol*, 27:785-789.

36-Neumann L (2000) Measuring Health Status in Israeli Patients with Fibromyalgia Syndrome and Widespread pain and healthy individuals: utility of the SF-36. *Semin Arthritis Rheum* 29:400-408.

37-Buskila, D (2011) Fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and myofascial pain syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 13:113-123.

38-Wong DT (2006) Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc* 137:313-321. doi: [dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0180](https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0180)

39-Dimauro SAF, Miranda AF, Khan KS, Gitlin K, Friedman R (1981) Human Muscle Phosphoglycerate Mutase Deficiency: Newly Discovered Metabolic Myopathy. *Sci* 12:1277-1279.

40- Gladden LBA (2008) "Lactatic" Perspective on Metabolism. *Med. Sci. Sports Exerc* 40:477-485. doi: [10.1249/MSS.0b013e31815fa580](https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31815fa580).

41-Sommer C, White F (2010) Cytokines, Chemokines, and Pain. In: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson A (ed) *Pharmacology of Pain*. 1st edn, Seattle, IASP Press, pp 279-302.

42 - Docke WD, Asadullah K, Belbe G, Ebeling M, Höflich C, Friedrich M, Sterry W, Volk HD. (2009) Comprehensive biomarker monitoring in cytokine therapy: heterogeneous, time-dependent, and persisting immune effects of interleukin-10 application in psoriasis. *J Leukoc Biol* 85:582-593.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **Biomarcadores Proteicos Presentes em Mulheres Portadoras De Fibromialgia Submetidas À Hidroterapia.**

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O motivo que nos leva a propor este estudo é que a Fibromialgia trata-se de uma doença, ainda de causa desconhecida, que gera diversos sintomas desagradáveis para os pacientes, como dor muscular em vários locais do corpo, alterações do sono, rigidez matinal e distúrbios psicológicos, como a depressão. É uma doença relativamente comum que afeta mais mulheres do que homens, especialmente na faixa etária entre 35 e 60 anos. A pesquisa se justifica pelo fato de que o diagnóstico desta doença ainda é apenas clínico, devido à ausência de exames complementares que a identifiquem. Além disso, sabe-se que o tratamento medicamentoso isolado não tem sido eficiente no tratamento desta doença. Estudos mostram que a hidroterapia é uma técnica alternativa, que tem se mostrado eficaz na melhora dos sintomas gerais. Então, a grande subjetividade dos sintomas associado à falta de exames complementares para o diagnóstico da fibromialgia, torna o atendimento do paciente um grande desafio para os profissionais da saúde. Diante disso, o objetivo desse estudo é avaliar no nível da expressão de uma determinada proteína na saliva de pacientes submetido à tratamento por hidroterapia através de metodologias utilizadas na rotina de laboratórios de análises clínicas, servindo assim como um marcadores de melhora/piora do quadro clínico dos pacientes. Os procedimentos de coleta de dados serão da seguinte forma: os pacientes selecionados serão avaliados antes e após o tratamento, o qual se constituirá de um programa de hidroterapia em águas termais, com 6 sessões semanais de 50 minutos de duração, durante duas semanas consecutivas, realizadas pelo profissional fisioterapeuta. Para a avaliação da proteína em estudo serão coletadas amostras de saliva dos pacientes antes e após o programa de hidroterapia e estas amostras serão levadas ao Laboratório de Genética Humana da Unesco para análise através de dois testes laboratoriais: ELISA e Western Blotting. Também será necessário a coleta de 20mL de sangue, que será obtido por um profissional qualificado, através da punção do sangue em uma sua veia do seu braço, como realizado para a realização de qualquer exame de sangue em laboratório. Este sangue é necessário para os nossos testes controles.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: A sua participação neste estudo não irá gerar nenhum tipo de risco à sua saúde e bem estar geral. O pequeno desconforto será a “picada” da agulha durante a obtenção do seu sangue. Além disso, o benefício que você paciente terá será a obtenção do diagnóstico reumatológico e proteômico, além do tratamento que, provavelmente, irá gerar alívio dos sintomas.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você poderá solicitar esclarecimento sobre a pesquisa em qualquer etapa do estudo. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação na pesquisa a qualquer

momento, seja por motivo de constrangimento e ou outros motivos. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. A pesquisadora irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este consentimento está impresso e assinado em duas vias, uma cópia será fornecida a você e a outra ficará com a pesquisadora responsável.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO: A participação no estudo não acarretará nenhum custo, ou seja, a avaliação com o reumatologista responsável e o tratamento através da hidroterapia não terão nenhum custo para o participante. Não será disponibilizada nenhuma compensação financeira.

DECLARAÇÃO DO SUJEITO PARTICIPANTE:

Eu,, fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e ou retirar meu consentimento. O responsável pela pesquisa acima, certificou-me de que todos os meus dados serão confidenciais. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora Angela Maria Brol, residente na Rua das Flores, n. 336, no município de Piratuba, telefone (49)99218551 ou entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Unoesc e Hust, Rua Getúlio Vargas, nº 2125, Bairro Flor da Serra, 89600-000-Joaçaba – SC, Fone: 49-3551-2012. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Assinatura do sujeito pesquisado.

Nome legível:

Endereço:

RG:

Fone:

Data Nascimento: ____/____/____

Assinatura da pesquisadora responsável

Data ____/____/____

APÊNDICE B

Declaração Instituição Co-Participante

DECLARAÇÃO

Eu, Ladi João Cowacicz, portador do CPF nº 250.576.429-87, declaro estar ciente da pesquisa intitulada “BIOMARCADORES PROTEICOS PRESENTES EM MULHERES PORTADORAS DE FIBROMIALGIA SUBMETIDAS À HIDROTERAPIA”, de responsabilidade da pesquisadora Angela Maria Brol.

Em relação à pesquisa supracitada, informamos que o acesso da pesquisadora ao local da pesquisa e a manipulação dos dados de prontuários médicos e arquivos de laudos médicos **será autorizado somente após a emissão do PARECER DE APROVAÇÃO do Comitê de Ética em pesquisa em Seres Humanos da UNOESC/HUST.**

Declaro conhecer e cumprir com as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Local/Setor onde a pesquisa será realizada: Secretaria Municipal de Saúde de Piratuba, Unidade Mista de Saúde.

Por ser verdade, firmo a presente.
Piratuba, 01 de Dezembro de 2014.

**Assinatura do Responsável pela Instituição,
(com carimbo)**

APÊNDICE C

Declaração Médico Reumatologista Co-Participante

DECLARAÇÃO

Eu, Rafael Barbieri, portador da cédula de identidade nº _____ e CRM nº _____, **declaro estar ciente** da pesquisa intitulada “BIOMARCADORES PROTEICOS PRESENTES EM MULHERES PORTADORAS DE FIBROMIALGIA SUBMETIDAS À HIDROTERAPIA”, de responsabilidade da pesquisadora Angela Maria Brol.

Em relação à pesquisa supracitada, informamos que a realização das avaliações clínicas dos pacientes e o acesso e a manipulação dos dados de prontuários médicos e arquivos de laudos médicos **será realizada somente após a emissão do PARECER DE APROVAÇÃO do Comitê de Ética em pesquisa em Seres Humanos da UNOESC/HUST.**

Declaro conhecer e cumprir com as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 422/12. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Local/Setor onde a pesquisa será realizada: Reumato Clínica LTDA, Rua Marechal Deodoro, n. 772, Sala 63, Centro, Concórdia – SC.

Por ser verdade, firmo a presente.

Concórdia, 01 de Dezembro de 2014.

Assinatura do Responsável pela Instituição

APÊNDICE D

Ficha de Anamnese e Questionário sobre o Impacto da Fibromialgia (QIF)

Dados do paciente

Idade:

Profissão:

Escolaridade:

Tempo de diagnóstico de FM:

Está recebendo auxílio do INSS: () Sim () Não

Faz uso de medicação contínua () Sim () Não Qual:

Questionário sobre o Impacto da Fibromialgia (QIF)

Com que frequência você consegue	Sempre	Quase Sempre	De vez em Quando	Nunca
a) fazer compras	0	1	2	3
b) lavar roupa	0	1	2	3
c) cozinhar	0	1	2	3
d) lavar louça	0	1	2	3
e) limpar a casa (varrer, passar pano, etc)	0	1	2	3
f) arrumar a casas	0	1	2	3
g) andar vários quarteirões	0	1	2	3
h) visitar parentes ou amigos	0	1	2	3
i) cuidar do quintal ou jardim	0	1	2	3
j) dirigir carro ou andar de ônibus	0	1	2	3

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

0 1 2 3 4 5 6 7

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

0 1 2 3 4 5 6 7

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

Não interferiu Atrapalhou muito

5- Quanta dor você sentiu?

Nenhuma Muita dor

6- Você sentiu cansaço?

Não Sim, muito

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

Descansado/a Muito cansado/a

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

Não, Sim, muita

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

Não, nem um pouco Sim, muito

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

Não, nem um pouco Sim, muito