

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM BIOTECNOLOGIA

MAIRA REGINA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DRD3 QUANTO A
INFLUENCIA NA PERCEPÇÃO DA DOR EM PACIENTES COM
FIBROMIALGIA**

RIBEIRÃO PRETO

2014

MAIRA REGINA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DRD3 QUANTO A
INFLUENCIA NA PERCEPÇÃO DA DOR EM PACIENTES COM
FIBROMIALGIA**

Dissertação apresentada ao
curso de Pós- graduação da
Universidade de Ribeirão Preto
para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ana Lúcia Fachin

Co-orientador: Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

S729a Souza, Maira Regina de, 1975-
Avaliação de polimorfismos do gene DRD3 quanto a influencia
da percepção da dor em pacientes com fibromialgia / Maira Regina
de Souza. - - Ribeirão Preto, 2015.
70 f.: il.: color

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Ana Lúcia Fachin.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2015.

1. Fibromialgia. 2. Polimorfismo genético. I. Título.

CDD 660

DEDICATÒRIA

Dedico esta dissertação ao meu marido Ronaldo Cristiano Gimenez, pelo amor, incentivo e principalmente compreensão em todos os momentos.

Dedico também aos meus filhos: Eduarda, pelo nosso amor incondicional e constante e Pedro Henrique, pois você é muito importante pra mim.

Dedico aos meus pais Antônio e Regina que sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha orientadora Prof.^a Dr^a Ana Lúcia Fachin, pela sua admirável paciência e confiança. Em nenhum momento deixou de me auxiliar, e em acrescentar seus conhecimentos para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr Mozart de Azevedo Marins, pela disposição oferecida para esclarecer as dúvidas.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Agradeço ao Péricles e ao Mendel pela colaboração nos experimentos.

Agradeço as amigas da Távola Redonda, sempre presentes, mostrando a que a única maneira de ter um amigo é sendo um.

Agradeço em especial a minha coordenadora e amiga Selma Fernandes, que sempre me motivou e apoiou durante esta trajetória.

E enfim agradeço muito a amiga Carol Paca pela paciência e ajuda nos momentos difíceis, pelas suas palavras de conforto e segurança.

RESUMO

A Síndrome Fibromiálgica (FS) é geralmente caracterizada pelo processamento anormal dos sinais da dor e por uma combinação de fatores externos, como fatores hormonais, neurotransmissores e do sistema nervoso simpático. A prevalência da fibromialgia na população geral é de 2 a 3%. No Brasil, a FS é a segunda desordem reumatológica mais frequente, com prevalência de 2,5%. Aproximadamente 90% de indivíduos afetados são mulheres em idade produtiva (35 a 60 anos) assim, a FS pode ser considerada o principal problema de saúde entre mulheres. Os fatores neuroendócrinos e genéticos podem desempenhar uma função significativa no desenvolvimento da doença no sistema. O gene DRD3 está localizado no cromossomo 3p13.3.3. DRD3 é um SNP, cujo genótipo mutado "glygly" pode estar está relacionado com a mais elevada atividade do receptor de dopamina. No presente estudo, foram realizadas coletas de sangue periférico de 102 pacientes com fibromialgia e de 100 indivíduos saudáveis com posterior extração de DNA genômico e PCR para confirmação do polimorfismo do gene DRD3. Foram aplicados questionários como FIQ e ACR 2010 para identificação da classificação do comprometimento de acordo com a SF desses pacientes. Foi observado que existe relação entre os pacientes fibromiálgicos que apresentaram como resposta do FIQ grau considerado severo e moderado, com os pacientes que de acordo com as respostas do ACR 2010mod foram avaliados positivamente de acordo com os critérios de dor difusa e escala de gravidade dos sintomas. Quanto a análise do sequenciamento das amostras, foram observadas mutações predominantemente heterozigoto no loc 167 do gene DRD3, que podem estar relacionados a alterações no limiar da dor nestes pacientes.

Palavras-Chaves: Fibromialgia, Polimorfismo genético, DRD3, ACR 2010.

ABSTRACT

The fibromyalgia syndrome (FS) is generally characterized by abnormal processing of pain signals and a combination of external factors such as hormonal factors, and neurotransmitters of the sympathetic nervous system. The prevalence of fibromyalgia in the general population is 2-3%. In Brazil, the FS is the second most common rheumatologic disorder, with a prevalence of 2.5%. Approximately 90% of affected individuals are women of working age (35-60 years) as well, FS can be considered the main health problem among women. Neuroendocrine and genetic factors can play a significant role in the development of the disease in the system. The DRD3 gene is located on chromosome 3p13.3.3. DRD3 is a SNP genotyped mutated Gly 'may be associated with higher dopamine receptor activity. In the present study, there were peripheral blood samples of 102 patients with fibromyalgia and 100 healthy individuals for subsequent extraction of genomic DNA and PCR for the amplification by PCR to confirm the polymorphism of questionnaires DRD3. It is FIQ and ACR 2010 to identification of the impairment rating according to the SF of patients. It was observed that there is a relationship between fibromyalgia patients who presented as FIQ response level considered moderate and severe, with patients who answered questions ACR 2010mod and were positively evaluated according to the criteria of diffuse pain and range of severity of symptoms. The analysis of the sequencing of the samples, mutations were observed in loc 167 of DRD3 gene that may be related to changes in pain threshold.

Key Words: Fibromyalgia, Genetic polymorphisms, DRD3, ACR 2010

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação ACR 2010.....	37
Tabela 2. Sequência dos Primers utilizados	39
Tabela 3. Escore do FIQ e classificação em % das pacientes fibromiálgicas de acordo com os pontos das respostas	47
Tabela 4. Critérios do ACR 2010 e % das respostas de acordo com o novo critério.....	48
Tabela 5. Correlação dos pacientes fibromiálgicos pelos critérios de avaliação do FIQ e ACR2010.....	49
Tabela 6. Distribuição e comparação dos genotipos do SNP do gene DRD3 com a média do escore FIQ e ACR2010 em pacientes com fibromialgia e indivíduos controle.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Doenças associadas relatadas nas pacientes fibromiálgicas	44
Figura 2 : Prática de atividade física ou atividades em grupo	45
Figura 3: Condições para agravamento da dor	46
Figura 4: Maior e menor valor das respostas FIQ	47
Figura 5: Template do gene DRD3.....	50
Figura 7: Cromotograma representativo do sequenciamento do fragmento de PCR do gene DRD3 apresentando genótipo heterozigoto AG na região 167 de pacientes fibromiálgicos.....	50
Figura 8: Cromotograma representativo do sequenciamento do fragmento de PCR do gene DRD3 apresentando Genótipo homozigoto AA na região 167 de pacientes controle.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
SFM	Síndrome Fibromialgica
FM	Fibromialgia
COMT	Polimorfismo de único nucleotídeo.
SNP	Enzima Catecol-O-metiltransferase
MET	Metionina.
Val	Valina
HTR2A	receptor de serotonina e 5-HTT
5-HTT	transportador de serotonina.
HT	receptor serotoninérgico 5-hydroxytryptamine
5HT2A	gene do receptor de serotonina.
PCR	Reação da polimerase em cadeia.
DNA	Ácido Desoxirribonucléicos
FIQ	Fibromyalgia Impact Questionnaire (Questionário de impacto da fibromialgia)
TAE	Tris-acetato EDTA
DRD3	Receptor dopamina.
S-COMT	Catecol-O-metiltransferase solúvel
MB-COMT	Catecol-O-metiltransferase na membrana
SNC	Sistema nervoso central

1. 1 INTRODUÇÃO

A fibromialgia (FM) é uma síndrome clínica comumente observada na prática médica diária cuja etiologia e a fisiopatologia permanecem ainda obscuras. É caracterizada pelo quadro de dor musculoesquelética crônica associada a sintomas como fadiga, dor generalizada e sono não reparador, podendo ser confundida com diversas outras doenças reumáticas.

O diagnóstico da fibromialgia é fundamentalmente clínico, não havendo evidências de anormalidades laboratoriais ou nos exames de imagem. A prevalência da síndrome aumenta com a idade.

Os critérios para diagnóstico da fibromialgia foram propostos pelo ACR (American College Rheumatology) considerando outros sintomas além da dor, problemas emocionais como ansiedade e depressão, sono não reparador e avaliação de respostas de questionários. Nos últimos 20 anos, tornou-se uma síndrome com diagnóstico aceito e reconhecido pela Organização Mundial da Saúde.

Os estudos realizados até agora apontam a fibromialgia como uma doença multifatorial, com uma possível suscetibilidade genética, para o desencadeamento da fibromialgia. Essa predisposição genética, podem estar associada a fatores ambientais, dentre os quais os agentes estressores relacionados aos aspectos psicossociais e afetivos, podem aumentar o risco para o desencadeamento e agravamento dos sintomas.

Embora existam evidências, ainda não estão determinados quais seriam os genes associados a essa doença, e nem de que maneira a variabilidade nesses genes interagem com fatores ambientais. Essas investigações são principalmente associadas a genes do sistema serotoninérgico.

As hipóteses atuais focalizam os mecanismos centrais de modulação e amplificação da dor na gênese da SFM e tem sido aceito um modelo de fisiopatologia, que sugere que o distúrbio primário na SFM seria uma alteração em algum mecanismo central de controle da dor, o qual poderia resultar de uma

disfunção de neurotransmissores. Tal disfunção neuro-hormonal incluiria uma deficiência de neurotransmissores inibitórios em níveis espinhais ou supraespinhais (serotonina, encefalina, norepinefrina e outros), ou uma hiperatividade de neurotransmissores excitatórios (substância P, glutamato, bradicinina e outros peptídeos).

Vários artigos na literatura descrevem a importância da análise dos polimorfismos de gene envolvidos diretamente com a fibromialgia e a modulação e a intensidade da dor. Deste modo, investigações genômicas demonstraram que SNPs “Polimorfismos de único nucleotídeo” (Single Nucleotide Polymorphisms) comuns em genes que podem relacionar-se a fibromialgia, podem contribuir para avaliar as diferenças na sensibilidade a dor em pacientes com fibromialgia.

Além disso, diferenças na atividade da enzima do gene DRD3 é um SNP, cujo genótipo mutado (homozigoto " glygly") está relacionado com a mais elevada atividade do receptor de serotonina e outras catecolaminas.

Matsuda et al. (2010) seguida por Barbosa et al (2010) desenvolveram projetos sobre fibromialgia no Departamento de Biologia Molecular da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) e avaliaram o polimorfismo do gene COMT em pacientes com fibromialgia (LL, LH e HH) e verificaram uma relação do genótipo LL com a fibromialgia na população brasileira. Desta forma, dando continuidade a esta linha de pesquisa do laboratório, o objetivo do presente projeto foi avaliar a influência dos SNPs em outro gene que pode estar relacionado com modificações da sensibilidade a dor em pacientes com fibromialgia.

2 REVISAO BIBLIOGRAFICA

A fibromialgia pode ser definida como uma síndrome de amplificação dolorosa crônica, caracterizada por dor difusa pelo corpo. Em mais de 80% dos pacientes a dor sempre vem acompanhada de fadiga e de distúrbios do sono, e na maioria dos casos ainda o paciente apresenta cefaléia, síndrome do colon irritável, assim como alterações de humor, depressão e ansiedade (FITZCHARLES et al., 2013).

A fibromialgia é entendida como uma condição frustrante, sem causa definida e consensual, por se tratar em última análise de uma síndrome funcional, com sinais e sintomas subjetivos ou oriundos de alterações orgânicas mínimas ou sub diagnosticadas (RAHMAN; UNDERWOOD; CARNES, 2014).

Sabe-se que esses sintomas contribuem para o sofrimento e comprometimento da qualidade de vida, e ainda a alteração na percepção e no processamento da dor e outras disfunções, levando a síndrome fibromialgica a uma complexidade muito maior (GOLDENBERG, 2009).

Trata-se de uma situação altamente incapacitante, onde o paciente apresenta quadros de dor generalizada mediante a qualquer estímulos mecânicos periféricos, que piora por um estado de hipervigilância em relação à dor e distúrbios nos mecanismos supressores analgésicos endógenos (FINAN; ZAUTRA, 2010).

Considera-se que a fibromialgia é uma síndrome antiga, pois Hipócrates já a descrevia ao relatar casos de mulheres com dor generalizada associada a importante componente psiquiátrico. Durante muito tempo por desconhecimento científico, utilizou-se o termo reumatismo psicogênico e fibrosite para descrever a fibromialgia (YUNUS; ALDAG, 2012).

O conceito atual da fibromialgia foi descrito a partir dos anos 70 do século 20. Porém o conceito atualmente abordado sobre fibromialgia foi introduzido em 1975 por Smythe e Moldofsky, quando descreveram a presença dos “tenders poits” ou pontos doloridos, e as alterações do sono profundo dos pacientes (AGUGLIA et al., 2011). O termo fibromialgia foi proposto por um grupo de pesquisadores em 1981. Em 1987, a fibromialgia (FM) foi reconhecida como uma síndrome distinta pela

American Medical Association. A partir daí iniciou-se a elaboração de vários critérios para o diagnóstico da fibromialgia (WOLFE et al., 1990).

De acordo com dados epidemiológicos a prevalência de fibromialgia no mundo varia de 0,7 a 5% em consideração a população geral. No Brasil é classificada como a segunda doença reumatológica mais frequente apresentando uma prevalência em torno de 2,5%(WOLFE et al., 1995).

Em muitos países industrializados sua prevalência varia de 1% a 4% da população geral, sendo a segunda afecção reumatológica mais frequente, superada apenas pela osteoartrite degenerativa. A prevalência de FM em diferentes comunidades varia de 1% a 10%, provavelmente devido à variedade de fatores demográficos e da metodologia utilizada para sua conceituação, e quando se adotam os critérios da ACR a prevalência é 4% a 6% (CAVALCANTE et al., 2006).

A faixa etária mais comum de aparecimento da doença é entre 40 e 55 anos, mas geralmente seus sintomas iniciam-se entre os 30 e 65 anos, com idade média de 49 anos. Esta síndrome acomete pessoas de ambos os sexos, porém há uma clara associação com mulheres, em uma proporção de 8:1. Quando utilizados os critérios do ACR de 1990, as mulheres representam 75 a 95% da população comprometida (WOLFE et al., 1990).

A SFM atinge então aproximadamente 10 a 20 vezes mais mulheres do que homens. Estudos de Wolfe (1990) observou prevalência da fibromialgia de 3,5% em mulheres e de 0,5% em homens, sugerindo-se que aspectos neuro-hormonais ou características psicológicas podem ser implicados no que é chamada de “doença típica das mulheres”. Ainda assim, acredita-se que nos homens a doença tende a ser mais branda, sendo possível que a fibromialgia em homens esteja sendo subnotificada.

Wolfe et al. (1995), descreve que existem condições associadas ao aparecimento da SFM e incluem depressão, níveis elevados de somatização e ansiedade, sensação de derrame articular, parestesia, rigidez matinal, alteração do sono, fadiga, colon irritável, má percepção e satisfação com o estado de saúde.

O Colégio Americano de Reumatologia (ACR), em 1990, normatizou os critérios para a classificação da fibromialgia, que foram utilizados como referência para diagnóstico. Determinou-se que a combinação de dor difusa, definida como bilateral, sobre e abaixo da cintura, e axial, com pelo menos três meses de duração, associada à presença de pelo menos 11 de 18 pontos dolorosos previamente especificados, sinais de depressão, ansiedade e comprometimento no sono, também influiriam para o diagnóstico (WOLFE, 2010). Considera-se a existência de pontos sensíveis (*tender points*) locais dolorosos quando uma força de 4 kg/A é aplicada pela palpação digital pelo corpo (SMITH et al., 2011).

O critério de classificação para a fibromialgia de acordo com o ACR (American College Rheumatology) 1990, foi utilizado como padrão ouro para o diagnóstico desta condição durante os últimos 20 anos e foi destinado para os estudos epidemiológicos. Porém SARZI et al. (2008) relatou que diagnosticar a fibromialgia apenas com base nos critérios do ACR através da presença de *tender points*, não eram suficientes para confirmar a presença de fibromialgia, pois poderia ser confundida com outras doenças que apresentassem as mesmas características. Deste modo, a presença dos *tender points* e a dor difusa como sintoma único, não representavam mais a essência da fibromialgia, pois ela também poderia estar relacionada a sintomas múltiplos os quais incluem proeminente fadiga, distúrbio do sono, e outros. Assim descreveu-se a necessidade da aplicação de um questionário para que se tenha uma avaliação mais precisa e correta da síndrome.

Recentemente, em 2010, o ACR propôs um novo método de critérios para o diagnóstico alternativo para a SFM, para facilitar o atendimento primário pelos médicos generalistas, ou seja, este não baseava-se na presença de pontos sensíveis, aboliu então o exame físico e padronizou os testes por meio de questionários. Os critérios para realizar um diagnóstico mais preciso da fibromialgia inclui uma lista de outros sintomas, considerando a fadiga, o sono não reparador e sintomas cognitivos como os mais importantes (WOLFE et al., 2011). Ainda existem alguns outros sintomas que podem ser incluídos como cefaleia, depressão, dores e cólicas abdominais.

Nesse novo critério, o paciente passou a preencher completamente o diagnóstico de fibromialgia quando apresente um índice de dor difusa $\geq 7/19$ e uma escala de gravidade ≥ 5 , ou índice de dor difusa entre 3–6 e escala de gravidade ≥ 9 . Os sintomas devem estar estáveis e presentes por pelo menos três meses e não deve haver nenhuma outra condição clínica que explique essa sintomatologia (WOLFE et al., 2011).

É muito importante destacar que o diagnóstico dessa síndrome é eminentemente clínico, não havendo alterações laboratoriais específicas (WOLFE et al., 1990). Os critérios da classificação e do diagnóstico da fibromialgia, apresentam muitas discussões, pois a avaliação baseia-se apenas em características subjetivas, como a dor descrita pelo paciente .

A persistente dor crônica e difusa, é o sintoma principal da fibromialgia. Sua intensidade pode variar de moderada a severa, e frequentemente tem início localizado, particularmente no pescoço, ombros, região lombar e bacia, e posteriormente torna-se generalizada. Normalmente os pacientes têm dificuldade de localizar o ponto exato da dor, ou se ela é na articulação ou não. Os pacientes descrevem a dor como constante e com características de queimação, agulhadas, pontadas, pruridos ou picadas (HEYMANN; HELFENSTEIN; FELDMAN, 2001).

A grande maioria dos pacientes se queixam de fadiga matutina e afirmam que a intensidade da dor aumenta após esforço físico e tornar-se tão intensa como atividades difíceis que aparentemente seriam leves, porém agravam a dor e o cansaço (YUNUS; ALDAG, 2012).

Pacientes com fibromialgia costumam ter problemas com o sono, incluindo sono não reparador, insônia, despertar muito cedo, e sono de má qualidade e ainda relataram piora dos sintomas de dor após o sono pobres (WOLFE, 2012).

Apesar das dores musculares generalizadas serem os sintomas característicos da FM, rigidez matinal, fadiga, palpitação, tontura, zumbido, cefaleia, dispneia, hipersensibilidade ao frio, sensação de inchaço, hiperemia cutânea, dismenorreia, dificuldade de digestão, síndrome de cólon irritável, cistite de

repetição, fenômeno de Raynaud, ansiedade e depressão irritável, podem ou não associar-se a eles. Estas situações se manifestam com períodos intermitentes de melhora e piora, que se tornam mais intensos durante alguns meses e depois se estabilizam, de modo que a incapacidade física, em graus variados, está sempre presente (WOLFE, 1990).

A fibromialgia é uma síndrome primária pesquisada e tratada por reumatologistas por envolver um quadro crônico de dor musculoesquelético. Também é necessário que estes pacientes recebam um tratamento multidisciplinar com objetivo de alcançar um amplo tratamento dos sintomas e comorbidades (WOLFE, 1990).

Entre as características dos tratamentos já propostos pela literatura científica, destacam-se os programas com sessões de exercícios, relaxamento, controle do estresse e terapia cognitiva comportamental (KATZ; WOLFE; MICHAUD, 2006).

Os sintomas da fibromialgia causam grande impacto no cotidiano dos doentes, promovem mudança na rotina, cujas consequências tendem a manter-se ao longo do tempo devido à cronicidade da condição causal, influenciam o processo de avaliação cognitiva, modificam os valores de vida dos indivíduos e induzem no doente comportamento adaptativo no cotidiano. Os impactos sociais que desestabilizam as relações familiares, restringem o contato social e interferem nos hábitos e rotinas dos doentes e obrigam-nos a esforços contínuos da adaptação às novas realidades (KATZ; WOLFE; MICHAUD, 2006).

Pacientes com crises fibromiálgicas apresentam quadro clínico tão grave quanto os pacientes com outras doenças crônicas, como artrite reumatoide, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica e lúpus eritematoso sistêmico (GOLDENBERG, 2009).

O quadro clínico dos pacientes com fibromialgia é muito heterogênea. Vários autores sugerem classificá-los em subgrupos e identificá-los pela análise de cluster de dor. (WOLFE et al., 1995).

Investiga-se que os pacientes com fibromialgia apresentam um distúrbio global de processamento sensorial pelo SNC, com respostas exacerbadas a estímulos dolorosos ou não, de calor e frio, estímulos elétricos e luminosos (PETERSEL; DROR; CHEUNG, 2011).

2.1 DOR

A sensação de dor é definida, segundo a *International Association for Study of Pain* como uma experiência sensorial e emocional desagradável, podendo ser consequente a um estímulo virtual ou potencialmente lesivo aplicado aos nociceptores (dor nociceptiva ou somática), à lesão do sistema nervoso (dor por injúria neural, neuropática, a fenômenos de natureza puramente psíquica (dor psicogênica) ou a uma associação desses mecanismos (dor mista) (WOLFE, 1990).

A dor é essencialmente, uma manifestação subjetiva, variando sua apreciação de indivíduo para indivíduo portanto, a experiência de dor é sujeita diferenças individuais, e para sua avaliação, não existem exames laboratoriais ou testes objetivos, dependendo-se, em grande, parte do relato subjetivo do paciente (New criteria proposes using pain, symptoms to diagnose fibromyalgia, 2010).

O substrato neurológico funcional desta amplificação dolorosa está relacionado a um desequilíbrio entre mediadores do Sistema Nervoso Central (SNC). Sabe-se que há uma redução relativa da atividade serotoninérgica ou analgésica, bem como uma hiperprodução de substância P ou mediadora da dor. A complexa sintomatologia da fibromialgia envolve principalmente: o sistema musculoesquelético, o sistema neuroendócrino e o sistema psicológico (CAGNIE et al., 2014)

A dor, principal característica da fibromialgia, é diferente de qualquer outra impressão sensorial porque caracteriza-se não somente pela dimensão sensório-discriminativa que o indivíduo vivencia, mas também pelo importante componente afetivo-emocional, que constitui a dimensão afetivo-motivacional da dor. A dor crônica, porém, não tem qualquer função de alerta e gera acentuados estresse e incapacidade (GOLDENBERG, 2009).

A complexidade e a subjetividade da dor dificulta sua avaliação precisa e justifica a utilização de técnicas como questionários verbais, escala de categoria numérica, escala analógica visual e índices não-verbais para avaliar a dor (CORDERO et al., 2010).

As repercussões geradas pela dor podem ser inúmeras, inclusive do ponto de vista social. Em pacientes fibromialgicos a dor e a intolerância ao exercício físico podem algumas vezes diminuir a habilidade para o trabalho e para a execução de atividades funcionais(WOLFE et al., 1995).

A dor crônica compromete o estado físico e mental dos pacientes, com piora da qualidade de vida por isso, pois segundo conceitos atuais, a dor não pode ser deixada em segundo plano por constituir parte integral do cuidado ao paciente (SUNDERMANN et al., 2014).

Os mecanismos fisiológicos da dor envolvem conceitos de sensibilização periférica e neuroplasticidade da dor. Pode-se estabelecer correlações entre inflamação, dor e status psicológico. A inflamação persistente contribui para a continuidade do ciclo de dor, gerando hipersensibilidade. A dor aumenta com o estresse psicológico, que é capaz de induzir aumento de citocinas inflamatórias (HENRY, 1989).

Existe um interesse crescente em fatores genéticos, uma vez que estes podem explicar uma porção substancial das diferenças interindividuais na resposta de dor (HENRY, 1989).

2.2 FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia da SFM é complexa e não totalmente esclarecida. O principal mecanismo envolvido na fisiopatologia da fibromialgia é a amplificação da sensibilidade dolorosa pelo SNC (PETERSEL et al., 2011).

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) na fibromialgia foi descrito a partir de 1999 inicialmente por Russel, mas principalmente por Bennett, seguido posteriormente por outros pesquisadores (PETERSEL et al., 2011).

O modelo fisiopatológico que melhor descreve a fibromialgia parte da observação de que o aparecimento dos sintomas dolorosos ocorre de forma geralmente espontânea, simétrica e num sentido craniocaudal, contrariando uma hipótese de lesões periféricas e sugerindo uma origem nervosa central para a síndrome (BELLATO et al., 2012).

A fisiopatologia da fibromialgia envolve uma série de fatores, incluindo alterações nos sistemas neuroendócrino e nervoso autônomo, fatores genéticos, variáveis psicossociais e estressores ambientais. Isso ocorre em decorrência de modificações observadas nos mecanismos envolvidos no processamento da dor em nível central. Sabe-se que essas alterações envolvem disfunção no eixo hipotálamo-pituitário-adrenal. Os doentes com SFM apresentam resposta anormal ao estresse e inadequação aos eventos estressores, traumas e infecções. O estresse persistente ocasiona anormalidades no sistema neuroendócrino, no sistema serotoninérgico e no sistema nervoso neurovegetativo simpático (POTVIN et al., 2012).

Estudos mostram que a fibromialgia é caracterizada por um aumento da percepção sensorial, que é mediada pelo sistema nervoso central, pelos eventos semelhantes aos associados com condições de dor neuropática (ou seja, a sensibilização central). Evidências também sugerem que a fibromialgia envolve níveis anormais de serotonina e noradrenalina, que são neurotransmissores-chave em vias inibitórias endógenos da dor (CORDERO et al., 2010).

Os pacientes com fibromialgia possuem um limiar de dor rebaixado, quando comparados a indivíduos normais, provavelmente por sensibilização central clinicamente observado pela sensibilidade aumentada à palpação e a outros estímulos nociceptivos, e apresentam também uma sensibilidade aumentada a distúrbios comumente dolorosos (hiperalgesia) (PETERSEL et al., 2011). A sensibilização central se expressa por aumento da excitabilidade dos neurônios da medula espinhal que transmitem as informações nociceptivas, sugerindo atividade

nervosa espontânea, expansão dos receptores e aumento das respostas ao estímulo. Doentes com SFM apresentam anormalidades funcionais nas vias descendentes da medula espinhal, responsáveis pela regulação do estímulo doloroso (YUNUS, 2008).

A atividade reduzida de neurotransmissores envolvidos na inibição da dor (serotonina, noradrenalina e dopamina), está presente em pacientes com fibromialgia e encontra-se associada a um aumento da sensibilidade dolorosa. Ou ainda o aumento dessas concentração de neurotransmissores facilitadores da transmissão dolorosa, como o glutamato e substância P, também podem contribuir para a amplificação dolorosa (BARBOSA et al., 2012).

A serotonina é um neurotransmissor produzido por neurônios no tronco cerebral e é derivado do triptofano. Apresenta alguns efeitos inibitórios em diversas vias da dor e é também amplamente distribuído. Serotonina aumentada no cérebro leva a uma atenuação da sinalização da dor e diminuição da liberação da substância P na medula espinhal (HENRY, 1989).

As alterações do metabolismo da serotonina implicam na redução da atividade do Sistema Inibidor de Dor, com uma conseqüente elevação da resposta dolorosa frente a estímulos algogênicos ou mesmo o aparecimento de dor espontânea (HENRY, 1989).

Uma explicação para a alteração da atividade da serotonina seria o polimorfismo dos receptores de serotonina, onde seus receptores apresentam algum tipo de diferença funcional. O polimorfismo do gene codificador de receptores é para identificado em pacientes com fibromialgia (PETERSEL et al., 2011).

A substância P (SP) é um neuromodulador presente em fibras nervosas do tipo C, não-mielinizadas. Quando estimuladas por estímulos nociceptivos, essas fibras liberam SP num grupo específico de neurônios do corno posterior da medula, que passam a responder com potenciais lentos, prolongados e com somação temporal. Considerando a participação da SP nas respostas dos neurônios nociceptivos, qualquer distúrbio da sua produção, atividade funcional ou degradação pode resultar numa percepção dolorosa defeituosa. Por outro lado, as vias

descendentes inibitórias de dor, que partem de estruturas do tronco encefálico para os diversos níveis segmentares de medula, também parecem estar envolvidas na fisiopatologia da fibromialgia. Esse conjunto de estruturas é denominado Sistema Inibidor de Dor e os principais neurotransmissores envolvidos no seu funcionamento são a serotonina e noradrenalina ao nível do tronco encefálico e as endorfinas e encefalinas a nível segmentar medular. Esse sistema foi descrito com um tônus basal, o que sugere uma atividade constante, contudo ele também parece ser ativado por condicionamento e estado motivacional. Estímulos nociceptivos são decididamente responsáveis por uma elevação do seu funcionamento, o que o classificaria como uma alça de retro- alimentação negativa em relação a sensações dolorosas. Fica demonstrado que os estímulos dolorosos seriam capazes inicialmente de produzir a sensação desagradável da dor, mas posteriormente estimulariam estas vias descendentes, atuando assim como moduladores da dor (PETERSEL et al., 2011).

A sensibilização central consiste no aumento da excitabilidade de neurônios da medula que transmitem a informação da dor para o córtex pelas fibras C. Essa sensibilização parece ser o principal fator que contribui para a hiperalgesia. É associada à atividade nervosa espontânea, campos receptivos expandidos e aumento de resposta a estímulos no interior da medula espinhal. Somação temporal anormal (wind-up) é o fenômeno pelo qual, após um período inicial de estímulos dolorosos subsequentes, estímulos iguais são percebidos como mais intensos. Essa aumentada “segunda dor”, que ocorre em todos, é exagerada em pacientes com fibromialgia (PETERSEL et.,al,2011).

Estudos funcionais cerebrais têm mostrado aumento a da ativação de áreas cerebrais de processamento da dor, mesmo após estímulos não nociceptivos. Esse aumento de ativação de processamento central da dor é independente de fatores psiquiátricos. Essas alterações morfológicas e funcionais no cérebro dos pacientes com fibromialgia, ocorrem principalmente em estruturas relacionadas ao processamento da dor em nível central (POTVIN et al., 2012).

Outro mecanismo que poderia explicar tal distorção sensorial é a alteração global de atenção, na qual uma percepção do meio ambiente elevada por disfunções localizadas em regiões do encéfalo causaria a perversão de estímulos térmicos, táteis e proprioceptivos em sensações dolorosas. Um distúrbio dessa natureza seria responsável por outros achados habituais entre portadores de fibromialgia como a alteração do sono, transtornos ansiosos e outras síndromes disfuncionais associadas a ativação simpática, onde se incluem a cefaleia tensional, cólon irritável, dor torácica atípica e síndrome dismenorreica. Estudos clínicos de pacientes com fibromialgia mostram que alterações do sono são intimamente relacionadas com a sintomatologia somática, mas não com a personalidade. Assim quanto pior o sono, maior o número de pontos dolorosos e em pacientes com fibromialgia (FINAN; ZAUTRA, 2010).

As atividades de neurotransmissores podem ser influenciadas pelos polimorfismos. Assim observa-se que a atividade reduzida de neurotransmissores (serotonina, noradrenalina e dopamina) envolvidos na inibição da dor, é presente em pacientes com a síndrome fibromialgia e também está associada a um aumento ou intolerância a sensibilidade dolorosa (PETERSEL et al., 2011).

Sabe-se que existe um risco maior no desenvolvimento da síndrome fibromiálgica na presença de genes presentes no metabolismo das catecolaminas, serotonina e dopamina (Kato K. et al, 2009).

Entretanto, a etiologia e a fisiopatologia exata que resultam no quadro de amplificação dolorosa ainda são pouco esclarecidas, incertas e multicausais quanto a sua etiologia. Acredita-se que determinados fatores de risco identificados até o momento atuem como gatilhos para o desenvolvimento desse quadro em indivíduos geneticamente predispostos (WOLFE et al., 1995).

Há evidências que polimorfismos não específicos em circuitos serotoninérgicos, dopaminérgicos, ou ainda catecolaminérgicos, estejam ligados à etiopatogenia da doença (MATSUDA et al., 2010). Recentemente, Mergener relatou um provável efeito do SNPT102C no gene do receptor HTR2A no metabolismo da 5-

HT, mas ainda faltam estudos para explicar todos os genes envolvidos na fisiopatologia da doença (MERGENER et al., 2011).

O desconhecimento da fisiopatologia dificulta o estabelecimento de estratégias terapêuticas para doentes com fibromialgia. O tratamento continua sendo um desafio para os profissionais da saúde, mas a ideia principal de tratamento inclui o controle da dor e da fadiga, a melhoria do padrão do sono, o controle das anormalidades do humor, a melhora da funcionalidade e reintegração psicossocial, ainda que não se tenha formas ideais para o diagnóstico da fibromialgia (SMITH; BARKIN, 2011).

2.3 GENÉTICA

Acredita-se que existam determinados fatores de risco identificados até o momento, e que atuem como gatilhos para o desenvolvimento desse quadro em indivíduos geneticamente predispostos. A predisposição genética é um fator bem estabelecido na fibromialgia (KATZ et al., 2006)

O conceito de que a síndrome de fibromialgia (FMS) pode envolver a susceptibilidade hereditária não é nova, nem a hipótese de que a sua patogênese envolve uma susceptibilidade genética (ARNOLD et al., 2004).

Investigação sobre genes e expressão do gene em FMS pode identificar biomarcadores objetivos para o distúrbio da dor , assim como indicam os caminhos que são desregulados e , portanto, são alvos potenciais para intervenção terapêutica (ARNOLD, 2006).

Pesquisas indicam que polimorfismos de alguns genes podem influenciar na atividade de neurotransmissores como no metabolismo da serotonina e das catecolaminas, e possivelmente da dopamina e então podem estar associados a riscos aumentados no desenvolvimento da fibromialgia (LIGHT, A. R. et al., 2012).

Os polimorfismos de um único nucleotídeo, ou “single nucleotide polymorphisms” (SNPs), tratam-se de substituições de nucleotídeos dentro de uma

determinada região do DNA, sendo o tipo mais comum de variação genética. Dentro da região codificante do gene, o SNP pode causar alterações no aminoácido codificante (SNP não-sinônimo), promovendo alterações na estrutura da proteína, que resultarão em uma diminuição da sinalização celular, levando a uma alterada, e possivelmente inapropriada, resposta celular ao estímulo. Muitos dos SNPs são sinônimos ou não-codificantes, os quais não alteram a estrutura proteica. As consequências funcionais destas alterações genéticas são difíceis de deduzir. Cada uma pode ter um impacto na expressão do receptor alterando a eficiência da transcrição ou da tradução. A diminuição ou o aumento na expressão do receptor poderá influenciar a cascata de sinalização do neurotransmissor, alterando, assim, a resposta celular global aos estímulos (SANDERS-BUSH, 2003).

Para uma definição mais ampla de fibromialgia, no entanto, há também uma maior probabilidade de inclusão dos subgrupos de diferentes etiologias envolvendo perfis genéticos e expressão de genes diferentes, daí uma outra área de investigação é a relação entre estes genes e a dor (ARNOLD, 2006).

Gürsoy et al, (1999) demonstrou que variantes genéticas associadas com níveis relativamente baixos ou intermediários de COMT por exemplo, que teve sua atividade enzimática significativamente mais freqüentes entre os pacientes com fibromialgia em comparação com controles saudáveis (SNP melhor estudado em pacientes com fibromialgia é o rs4680) (GARCIA-MARTIN et al., 2010). E essa variação na atividade enzimática da COMT pode estar envolvida com a sensibilidade a dor, através de sua regulamentação direta de vias dopaminérgicas, que resultam em mudanças compensatórias no processamento opioidérgico em resposta à dor (VARGAS-ALARCON et al., 2007).

É importante citar as semelhança da literatura com resultados positivos em relação as associações entre polimorfismos da COMT e fibromialgia, pois sabe-se que esse gene, por ser o gene mais evidente quando se trata de fibromialgia, pode estar relacionado com diversas doenças como esquizofrenia, câncer, dependência da nicotina, doença de alzheimer, ansiedade, e principalmente com a sensibilidade a dor (VARGAS-ALARCON et al., 2007).

2.3.1DRD3

O DRD3 gene do receptor D3 da dopamina, em particular o polimorfismo de um único nucleótido Ser9Gly, tem sido amplamente investigada. O gene no cromossoma 3 codifica para uma proteína que responde à dopamina neurotransmissora, a fim de desencadear sinais dentro do sistema nervoso central. A função do receptor D3 é de inibição: inibe a enzima adenilil-ciclase, assim como a secreção mediada por dopamina de renina. O receptor DRD3 foi implicada na retenção de sal e hipertensão ,assim como as condições como tremor essencial, e de modo unipolar e bipolar depressão.

O gene DRD3 está localizado no cromossomo 3p13.3.3. DRD3 Ser9Gly é um SNP, cuja mutação genótipo homozigota está ligada à maior atividade do recepto. O D3 do gene do receptor (DRD3) contém um polimorfismo resultando numa substituição de serina-glicina na extremidade N-terminal do receptor (POTVIN et al., 2009).

Apesar das baixas concentrações de receptores de dopamina no nível espinhal, evidências sugerem que a dopamina influencia significativamente percepção da dor. Ao contrário de receptores D1 e D2, o receptor D3 é amplamente expresso em neurónios dopaminérgicos do núcleo acumens (NAC) , onde atua como um auto-receptor-regulação da liberação DA .Outras regiões em que o receptor D3 é expresso, incluir a substância negra, o hipotálamo, globo pálido e tálamo (TEE; TANG; LOH, 2011).

Em alguns estudos de pacientes portadores da alteração ou mutação de DRD3 Ser9Gly apresentou alterações significativas de sensibilidade térmica em pacientes com FM, mas não nos controles (POTVIN et al., 2009).

Porém, este estudo não consideraram uma associação entre DRD3 Ser9Gly e a SFM, mostrando que este polimorfismo não parece ser um fator de risco para SFM. No entanto, para aqueles que têm fibromialgia, observou-se que DRD3 Ser9Gly influencia significativamente na alteração da sensibilidade hiper-térmica (POTVIN et al., 2009).

O polimorfismo do gene DRD3 também têm sido observado no aumento do risco para o transtorno depressivo e anedonia induzida por estresse (MAO et al., 2013). A falta ou comprometimento da sensação de prazer relatados por pacientes, tem sido associada com a diminuição da capacidade de resposta do receptor D3, referindo se aos receptores de D3, que são localizados preferencialmente no (meso) - sistema límbico (LEE et al., 2011).

SNPS no gene DRD3 foram associados com a capacidade de resposta diferencial em humanos com transtorno depressivo, justificando que o Ser9Gly polimorfismo também tem sido associada com a depressão associada como precedente da demência (LEE et al., 2011).

O efeito do polimorfismo do gene DRD3, sobre sua função dopaminérgica central, que é conferida pela sensibilidade a racloprida (um antagonista de D2 de receptores de dopamina) de ligação para a liberação de dopamina endógena, dado o papel importante do receptor D3 na regulação da liberação de dopamina no corpo estriado ventral (MULERT et al., 2006).

Porém, a associação do DRD3 Ser9Gly e a interpretação como polimorfismo influenciador da SFM, requer estudos cautelosos para descrever a ligação entre o DRD3 Ser9Gly e medidas de dor já descritas (POTVIN et al., 2009).

3 JUSTIFICATIVA

Este estudo se mostra relevante, pois a fibromialgia tem afetado com grande frequência mulheres em idade produtiva. Pesquisas sobre a etiologia da doença, tem demonstrado que os fatores genéticos ou mecanismos moleculares estão envolvidos com a fibromialgia. Sabe-se que a fibromialgia pode estar associada com a disfunção neuroendócrina caracterizada por uma função anormal da adrenal-pituitária-hipotálamo, incluindo a hiperatividade do hormônio adrenocorticotrófico, relacionado com resposta adrenal diminuída, daí a necessidade do estudo da biologia molecular e observação da detecção de polimorfismos.

Vários artigos na literatura descrevem a importância da análise do polimorfismo em relação a SFM, e então as afirmações sobre o gene DRD3 com relação a intensidade e limiar da dor descritos, podem estar envolvidos com a fibromialgia e as características da dor.

4 HIPÓTESE

Este estudo pretende relacionar o polimorfismo dos receptores de dopamina D3 límbicas diretamente com a fibromialgia e seus graus de severidade ao comprometimento. Como o limiar da dor e de inibição da dor são deficientes em pacientes fibromiálgicos, estes resultados podem ajudar a identificar um subgrupo de pacientes com SFM.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Este trabalho teve como objetivo identificar SNPs do gene DRD3 em pacientes com fibromialgia e associar a presença do SNP a resposta da dor

5.2 ESPECÍFICOS

a) Extrair DNA genômico de sangue periférico de pacientes com fibromialgia e de indivíduos controle.

b) Caracterizar os polimorfismos (SNPs) do gene DRD3 por sequenciamento.

d) Avaliar a intensidade da dor em pacientes com fibromialgia através do questionário Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) e dos novos critérios do ACR 2010mod, correlacionando-os.

e) Relacionar os polimorfismos do gene DRD3 com a intensidade ou severidade da dor avaliado em pacientes com fibromialgia.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 LOCAL DO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

Os pacientes com fibromialgia que fizeram parte deste estudo foram atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto com a possibilidade de realização de trabalho multicêntrico. Voluntários saudáveis que foram utilizados como controle, foram obtidos a partir do Hemocentro de São José do Rio Preto.

6.2 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

A amostra final incluiu o número de 102 indivíduos com diagnóstico de fibromialgia e 100 indivíduos saudáveis, tendo como base os valores descritos em trabalhos relevantes sobre estudos de SNPS e biologia molecular (GURSOY et al., 2003) e (POTVIN et al., 2009; VARGAS-ALARCON et al., 2007).

6.2.1 Seleção dos indivíduos e avaliação clínica

O critério de inclusão dos pacientes com fibromialgia foi estabelecido com base nas características clínicas da síndrome fibromialgica (mulheres com idade superior a 30 anos, dor generalizada, que persiste por no mínimo três meses, fadiga e sono não restaurador). O diagnóstico da fibromialgia foi baseado no critério desenvolvido pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1990 e atualizado em 2010 (ACR 2010mod). A triagem destas pacientes para o presente trabalho foi realizada pelo Prof. Dr. Roberto Acayaba de Toledo e equipe, reumatologista do Hospital de base de São José do Rio Preto.

Foram excluídos da amostra, pacientes que não elegeram os critérios da ACR (1990 e 2010) como: sexo masculino, mulheres com idade inferior a 30 anos, e outras enfermidades associadas como patologias reumáticas e ou endócrinas.

Para os indivíduos controles, os critérios de inclusão utilizados foram de mulheres com idade superior a 30 anos, ausência de dores generalizadas, normalidades no sono e sem queixa de fadiga.

6.3 COLETA DE DADOS CLINICOS

6.3.1 Entrevista

Todos os pacientes foram informados das condições da pesquisa, portanto tomaram ciência lendo o termo de Esclarecimento ao sujeito da pesquisa, onde os indivíduos controle saudáveis e os pacientes da pesquisa assinaram livremente o Termo de Consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1 e 2).

Após a assinatura do termo todos os pacientes fibromialgicos foram submetidos a uma entrevista para coleta de dados. Responderam 3 questionários, sendo o primeiro de triagem, contendo informações para delinear o perfil dos participantes (ANEXO 3), o Questionário Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), para avaliar a intensidade e o impacto da dor sobre a vida dos fibromialgicos (ANEXO 4), e o questionário do ACR 2010mod com os Critérios Preliminares de Fibromialgia atualizados (ANEXO 5).

O projeto foi registrado e aprovado na base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos para todo o sistema CEP/Conep sob o número 04021012.9.0000.5498 em 2012 (ANEXO 6). Também foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos da Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto- FAMERP sob parecer 94.642/2012 (ANEXO 7) e da Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP sob parecer 99.585/2012 (ANEXO 8).

6.3.1.a Escore Questionario Triagemde perfil dos pacientes

Este questionário, criado pela própria autora, teve o objetivo de coletar informações que pudessem delinear o perfil dos pacientes participantes. Os

resultados obtidos foram analisados individualmente e posteriormente observou-se os valores correlacionando com outros resultados obtidos.

6.3.1.b Escore FIQ

De acordo com (BOOMERSHINE et al., 2011) o questionário FIQ tem por objetivo colher informações sobre as condições do funcionamento físico, a relação entre o paciente e o seu trabalho, seu estado de depressão, ansiedade, cansaço matinal, rigidez, dor, fadiga e bem estar nos últimos dias.

A avaliação do escore FIQ foi realizada seguindo critérios do ACR 1990 (BENNETT, 2005). O FIQ é composto por 10 itens\questões . O primeiro item contém 10 perguntas (A a J) relacionadas a capacidade funcional. Cada pergunta é avaliada em um tipo escala de Likert (escala de respostas gradativas) valendo até 3 pontos. Os itens 2 e 3 possuem valores que variam de 0 a 7 pontos e orienta que o paciente marque o número de dias que sentiu-se bem e o número de dias que foi incapaz de trabalhar (incluindo trabalho em casa) devido aos sintomas da fibromialgia. Os itens de 4 a 10 refere-se as condições de dificuldade de trabalho, a dor, a fadiga, o cansaço da manhã, a rigidez, a ansiedade e a depressão dos pacientes. O FIQ tem como critério estabelecido uma contagem de pontos que indica que quanto mais elevada, maior o impacto da síndrome na vida da pessoa. Cada um dos 10 itens tem um escore máximo de 10 pontos. Assim o escore máximo é 100 pontos. Considera-se a média do escore de pacientes com fibromialgia é de aproximadamente 50 pontos, e pacientes severamente afetados aqueles com 70 pontos ou mais.

O questionário é avaliado da seguinte maneira:

1) As 10 perguntas são assinaladas e somadas. Cada item é avaliado em um tipo de escala de Likert de 3 pontos. A contagem exata em cada item varia na escala de 0 (sempre) a 3 (nunca). Assim, a contagem mais elevada será de 30 pontos. A fim de obter completamente um escore somado válido para as perguntas de 1 a 10, as contagens para os itens que o paciente tem avaliado é somado e dividido pelo número de itens total e multiplicados por 3.33.

2) O item 2 é assinalado inversamente, de modo que um número mais elevado indica o prejuízo ou situação ruim (isto é, 0=7, 1=6, 2=5, 3=4, 4=3, 5=2, 6=1 e 7=0, etc.). A contagem pode variar de 0 a 7. O valor obtido é multiplicado por 1,43.

3) O item 3 é assinalado diretamente (isto é 7=7 e 0=0). A contagem exata pode ser de 0 a 7. O valor obtido é multiplicado por 1,03.

4) Os itens de 4 a 10 possuem valores 0 ou 10 e são somados. Assim, há uma normalização de modo que todas as contagens sejam expressadas em unidades similares. A escala de contagens normalizadas é de 0 a 10 onde 0 indica que a pessoa não apresenta dores e 10 indica o máximo de dor.

6.3.1.c. Escore ACR 2010mod

Para a análise dos resultados dos novos critérios de avaliação da fibromialgia de acordo com o ACR 2010mod, é necessário considerar quais foram as alterações ocorridas. Segundo (WOLFE et al., 2011), o ACR substituiu a avaliação dos tenders points, que era considerado como um exame físico de 18 pontos pelo índice de dor generalizada (WPI), com uma nova contagem de 19 regiões do corpo. Além disso incluiu neste critério a avaliação de alguns sintomas que são característicos da SFM como fadiga, sono não reparador, problemas cognitivos e somáticos, que podem ser pontuados de 0 a 3. Estes são analisados podendo-se totalizar um valor de 0 a 12 pontos, referindo-se a gravidade dos sintomas (SS). Estas escalas podem ser combinadas totalizando um valor de 0 a 31 pontos, referindo-se a uma medida segundo o sofrimento ou a gravidade dos vários sintomas da SFM.

Segundo (BENNETT et al., 2014), o paciente passa a preencher completamente o diagnóstico de fibromialgia, quando após responder o questionário ACR 2010mod apresentar índices de dor difusa $\geq 7/19$ e uma escala de gravidade de sintomas ≥ 5 , ou ainda o índice de dor difusa entre 3 a 6 e a escala de gravidade ≥ 9 , com os sintomas estáveis e presentes por pelo menos 3 meses, sem nenhuma condição que justifique os sintomas (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação ACR 2010

Classificação ACR 2010	Dor difusa (WPI)	Escala de gravidade (SS)
I	≥7/19	≥5
II	3-6/19	≥9

Fonte: autora

Para a obtenção da classificação da SFM a partir deste novo critério, somou-se os valores WPI e SS, estimando-se até 31 pontos, e então obtém-se a classificação de acordo com o impacto sobre a vida da paciente. Os pacientes que obtiveram resultados fora desta pontuação, ou seja, fora deste parâmetro de avaliação, não são considerados fibromialgicos de acordo com os autores.

6.4. EXTRAÇÃO DE DNA

Foi realizada a coleta do material genético, de todos os pacientes fibromialgicos e controle. Foram coletados 5ml de sangue periférico utilizado tubos BD Vacutainer (K2 EDTA 7.2 mg Plus Blood Collection Tubes para 4ml).

As amostras de sangue foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biotecnologia da UNAERP, realizando a extração do DNA de cada amostra. Essas amostras de sangue foram armazenadas adequadamente para que pudessem ser utilizadas no processo de extração de DNA genômico posteriormente.

O DNA foi extraído a partir das amostras de sangue (fibromialgicos e controle), utilizando o Kit GenElute Blood Genomic DNA Kit (Sigma), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante.

A extração de DNA foi realizada a partir de 200 µl das amostras de sangue periférico em temperatura ambiente, o qual foi pré aquecido a 55°C. Após aquecimento, adicionou-se 20µl de proteinase K (gelada). Posteriormente, foi adicionado 200µl de solução de Lyses C na amostra e a mistura foi submetida ao vortex por 15 segundos. A seguir, o conteúdo foi incubado a 55°C por 10 minutos.

Enquanto isso, as colunas foram montadas em um tubo de coleta e adicionado 500 µl da solução de preparo de coluna e centrifugado por 12000g por 1 minuto. Foi adicionado 200 µl de etanol (100%) ao lisando e higienizado por 10 segundos. Então foi adicionado a mistura à coluna e centrifugado a 6600g por 1 minuto. Descartado o tubo de coleta e colocado a coluna sobre um novo tubo adicionando mais 500 µl de solução de pré-lavagem a coluna e centrifugado a 6600g por 1 minuto. O tubo de coleta foi descartado e a coluna colocada sobre um novo tubo de coleta. Foi adicionado 500 µl de solução de lavagem (Wash buffer) à coluna e novamente centrifugado por 3 minutos a 14000g. Descartado o tubo de coleta e colocado a coluna novamente sobre um novo tubo de coleta de 1,5 µl, adicionou-se 200 µl de tampão de eluição no centro da coluna para a retirada do DNA da coluna e foi incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e depois centrifugado por 1 minuto a 6600g.

Após a extração de DNA as amostras obtidas foram numeradas e armazenadas novamente.

6.4.1 Armazenamento do material biológico utilizado na pesquisa.

O material biológico foi armazenado a -20°C na Unidade de Biotecnologia, sob a responsabilidade de instituição depositária, a qual obedece a norma ou regulamento aprovado pelo CEP da instituição. Caso haja eventual uso deste material em projetos futuros os participantes serão previamente consultados para autorizar o seu uso.

6.4.2. PCR

O DNA foi extraído utilizando o Kit GenElute Blood Genomic DNA Kit (Sigma), e logo após foi realizada uma PCR para a amplificação do gene de interesse DRD3, utilizando os primers indicados na tabela 2.

Para tanto, fez-se uma padronização da reação utilizando

aproximadamente 8µl de DNA genômico, 5µl da solução tampão 10 vezes concentrada (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 2µl de MgCl₂ a 50mM, 4µl da mistura contendo 250µM de cada dNTP, 1µl de cada *primer* DRD3 (+) (10pmol/µL) e DRD3 (-) (10pmol/µL), 1U da enzima polimerase (*Taq DNA polymerase recombinant* - Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 50µl (DE SOUZA et al., 2009).

Tabela 2. Sequência dos Primers utilizados.

Primers	Seqüência (5'-3')	Amplicon(pb)	Referencia
DRD3 (+)	GCTCTATGTCCAACTGTCACA		
DRD3 (-)	AAGTCTACTCAGGTCCAGGTA	463	(POTVIN et al., 2009)

Fonte: autora

A mistura foi submetida a um ciclo de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com um ciclo de 72°C por 5 min. As reações de PCR foram realizadas em termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Bio Rad).

Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% (peso/volume) utilizando tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo solução de GelRed (0,1 µg/mL), a 100V, durante 1 hora e 30 minutos. As bandas foram visualizadas à luz ultravioleta e as imagens foram capturadas no ChemiDoc™MP Imaging System (Bio Rad) (BARBOSA et al., 2012).

6.4.3. Sequenciamento

Os *amplicons* obtidos foram seqüenciados pelo método dideoxinucleotídeo (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977), no laboratório da Professora Doutora Nilce Martinez-Rossi, Departamento de Genética (FMRP- USP).

Os *amplicons* obtidos na PCR foram purificados com etanol baseado em metodologia descrita por Sambrook & Russel (2001). Em linhas gerais, aos *amplicons* foram adicionados de 3µL de acetato de sódio 3M seguido da adição de 150µl de etanol 100%. O DNA foi precipitado por uma hora a -80°C. Após centrifugação de 20 minutos a 13200 rpm (rotor Eppendorf F45-24-11), 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100µL de etanol 70% (Merck). Em seguida foi realizada centrifugação de 10 minutos, a 13200 rpm, 4°C para obtenção de um precipitado, o qual foi homogeneizado em 20µL de água ultra-pura (Invitrogen).

Após processo de purificação, os amplicons foram submetidos à reação de seqüenciamento, utilizando o *Big Dye Terminator Kit v3.1* (AppliedBiosystems), segundo recomendações do fabricante. Em linhas gerais, para a reação de sequenciamento, foram utilizados aproximadamente 200ng de DNA; 4,0 µL de Tampão 5x BigDyeTerminator v3.1 Sequencing (AppliedBiosystems), 2,0 µL de Big Dye Ready Reaction Mix, 3,2 pmol dos *primers* específicos (DRD3), listados na Tabela 2, e água para um volume final de 20 µL. Na ciclagem, foram realizados 25

ciclos de desnaturação a 96°C por 30seg, pareamento dos primers a 50°C por 15seg e extensão dos fragmentos a 60°C por 4min.

As amostras foram submetidas à precipitação antes de serem submetidas ao aparelho de sequenciamento Cycle ABI PRISM™ 3130 GeneticAnalyse (AppliedBiosystems). Para tanto, foi adicionado 5µL de EDTA (125mM) à reação seguido da adição de 60µL de etanol absoluto (Merck) e homogeneizadas. Após período de incubação de 15 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram submetidas a centrifugação de 10000g por 20 minutos a 4°C. Após o sobrenadante ser descartados, adicionou-se 60µL de etanol a 70%, inverteu-se os tubos para homogeneização e seguiu-se de centrifugação de 10 minutos a 10000g a 4°C. Logo após, descartou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* deixando os tubos invertidos. As amostras foram ressuspensas com 10µL de formamida e submetidas ao aparelho.

As sequências resultantes foram submetidas aos programas DS Gene 2.0 (Accelrys, USA) e FinchTV (Geospiza, INC).

6.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados clínicos foram analisados de acordo com as respostas do questionário do perfil dos pacientes, a pontuação de FIQ e os resultados do ACR2010, utilizando os programas Minitab, BioEstat e Excel.

Inicialmente, os dados foram analisados de forma descritiva, buscando-se estabelecer a ordem de importância e frequência das respostas para os fatores relacionados nas perguntas estruturadas do questionário do perfil dos pacientes.

Devido à natureza multifatorial da SFM, fez-se necessária a utilização de questionários para uma avaliação mais objetiva dos sintomas subjetivos, auxiliando o diagnóstico desta síndrome. O FIQ é o instrumento mais utilizado para avaliar o impacto da FM e já foi traduzido para vários idiomas, por isso apresenta grande relevância e confiabilidade. Quanto a análise do FIQ, os resultados foram baseados nos valores do escore determinado pela sua validação, e então mostrou-se os valores em percentuais dos pacientes de acordo com a classificação.

Os resultados do ACR2010 também foram quantificados de acordo com os escores determinados, e então correlacionados com os resultados obtidos do questionário FIQ, determinando quais pacientes realmente são identificados fibromiálgicos pelos dois critérios de avaliação.

Para análise dos resultados da frequência de polimorfismos do gene DRD3, as sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas DS Gene 2.0 (Accelrys, USA), FinchTV (Geospiza, INC) e BioEdit.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados de acordo com as respostas do questionário do perfil dos pacientes, a pontuação de FIQ e os resultados do ACR2010, utilizando os programas Minitab, BioEstat e Excel.

Inicialmente, os dados foram analisados de forma descritiva, buscando-se estabelecer a ordem de importância e frequência das respostas para os fatores relacionados nas perguntas estruturadas do questionário do perfil dos pacientes.

Devido à natureza multifatorial da SFM, fez-se necessária a utilização de questionários para uma avaliação mais objetiva dos sintomas subjetivos, auxiliando o diagnóstico desta síndrome. O FIQ é o instrumento mais utilizado para avaliar o impacto da FM e já foi traduzido para vários idiomas, por isso apresenta grande relevância e confiabilidade. Quanto a análise do FIQ, os resultados foram baseados nos valores do escore determinado pela sua validação, e então mostrou-se os valores em percentuais dos pacientes de acordo com a classificação.

Os resultados do ACR2010 também foram quantificados de acordo com os escores determinados, e então correlacionados com os resultados obtidos do questionário FIQ, determinando quais pacientes realmente são identificados fibromiálgicos pelos dois critérios de avaliação.

Para análise dos resultados da frequência de polimorfismos do gene DRD3, as sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas DS Gene 2.0 (Accelrys, USA), FinchTV (Geospiza, INC) e BioEdit.

7.2 DADOS DO QUESTIONARIO DE PERFIL DOS PACIENTES FIBROMIALGICOS

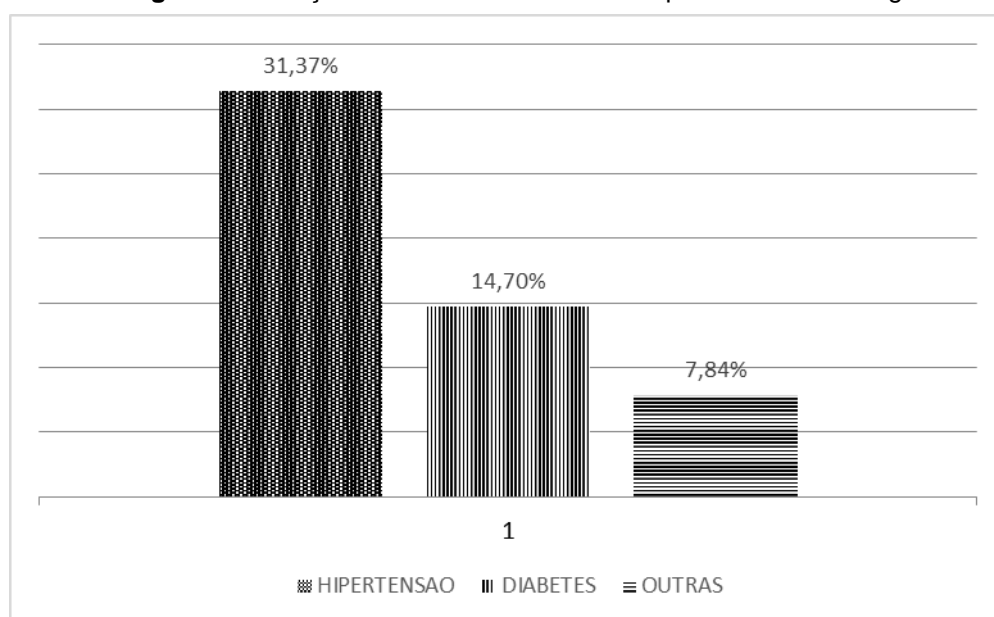
Foram avaliados 102 pacientes com diagnóstico clínico de fibromialgia, onde verificou-se que a idade das pacientes estava entre 30 e 74 anos, sendo idade média e desvio padrão de $52,60 \pm 9,59$.

Também foi investigado hábitos das pacientes fibromiálgicas em questão, e observou-se que 12,74% destas pacientes são tabagistas e 11,77% afirmaram ingerir bebida alcoólica em situações eventuais.

Este resultados estão de acordo com estudo realizado (DE SOUZA et al., 2009) onde relata que a maior incidência da fibromialgia se consta na faixa etária entre os 20 e 50 anos, sendo que a idade média do início dos sintomas pode variar entre 29 e 37 anos, e o diagnóstico geralmente ocorre entre os 40 e 50 anos.

A figura 1 mostra que além do diagnóstico de fibromialgia nestes pacientes ainda há ocorrência de outras patologias como hipertensão e diabetes melitus.

Figura 1: Doenças associadas relatadas nas pacientes fibromiálgicas



Fonte: autora

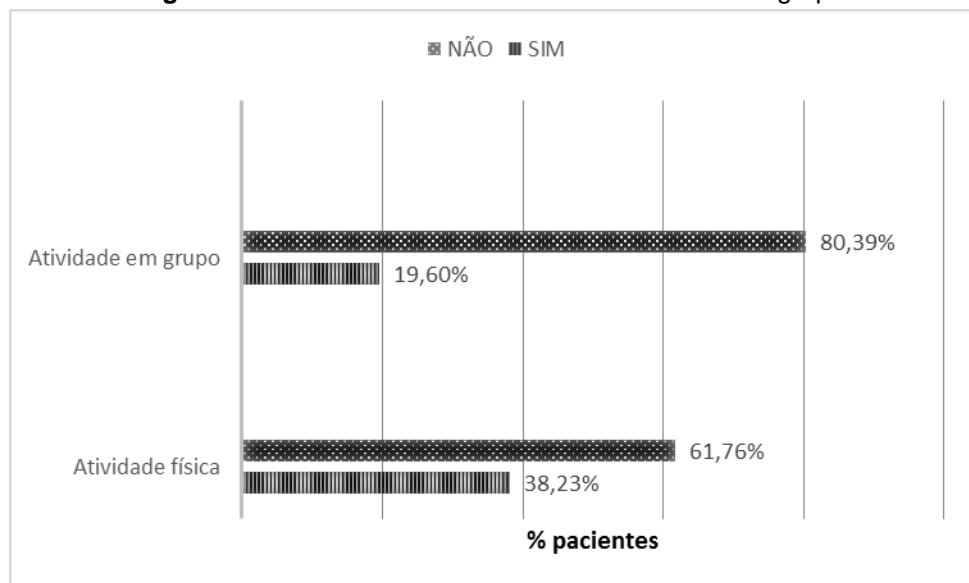
Em relação ao histórico familiar dos pacientes fibromiálgicos, 46% afirmaram apresentar parentes próximos com diagnóstico de fibromialgia.

Quando questionado sobre a ocorrência de sinais e sintomas de depressão 89% destas pacientes confirmaram apresentar dor de cabeça 67,64% e 62,74% afirmaram ser ansiosas.

Sobre a qualidade do sono das pacientes fibromiálgicas, 79,41% das pacientes afirmaram apresentar dificuldade de dormir ao deitar-se na cama, e 88,23% comentaram sobre o fato de acordar várias vezes durante a noite e ainda apresentar a sensação de sentir-se cansada ao acordar.

Somente 36,27% das pacientes fibromiálgicas afirmaram realizar atividade física e quanto as atividades em grupo, somente 19,60% realizam esta pratica de acordo com a Figura 2.

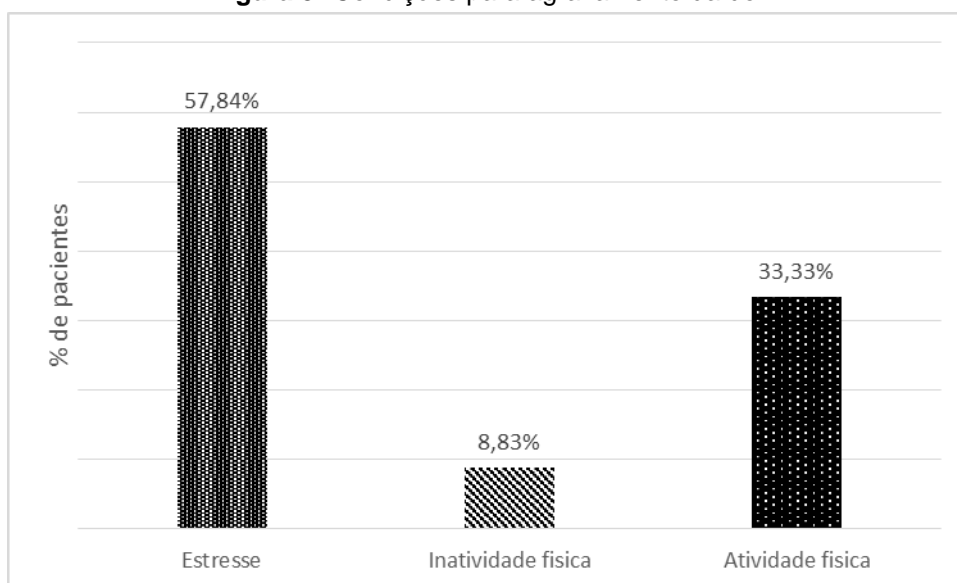
Figura 2 :Pratica de atividade física ou atividades em grupo



Fonte: autora

Também foi relatado por 78,43% das pacientes, a ocorrência de perda de força e a sensação de dormência em alguma região do corpo.

Sobre a percepção de agravamento da dor nas pacientes fibromiálgicas quando expostas a diversas situações como estresse, atividade física ou inatividade estão descritas na Figura 3.

Figura 3: Condições para agravamento da dor

Fonte: autora

Quanto aos tratamentos para a fibromialgia, 63,72% ou seja, 65 das 102 pacientes em questão, realizam somente o uso de medicação como forma de tratamento. E ainda 91,17% das pacientes fibromiálgicas abordadas neste estudo acreditam na cura da fibromialgia.

7.3 DADOS DO QUESTIONARIO FIQ

A tabela 3 mostra os valores do escore do questionário FIQ e o resultado em valor percentual das pacientes fibromiálgicas comprometidas de acordo com a severidade da doença.

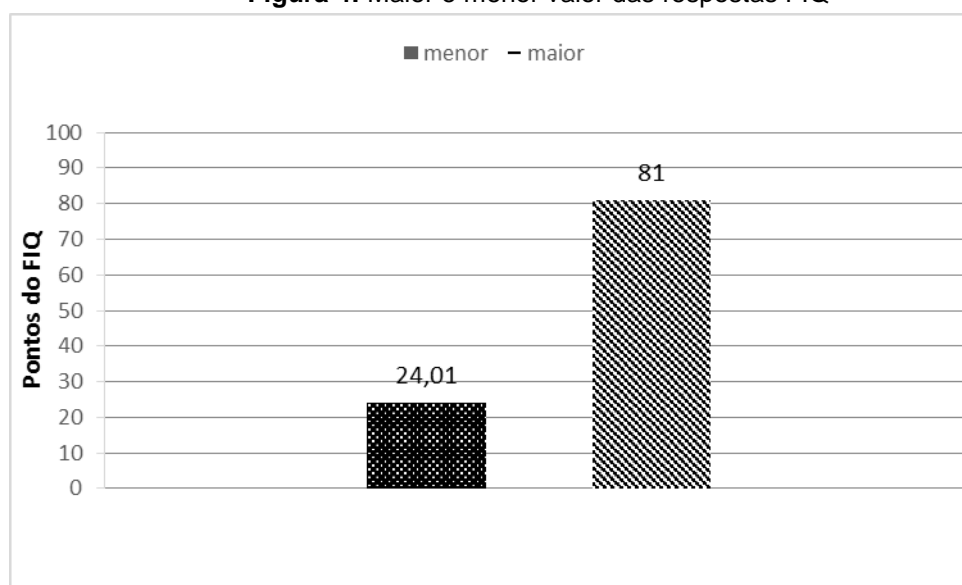
Tabela 3: Escore do FIQ e classificação em % das pacientes fibromiálgicas de acordo com os pontos das respostas

FIQ		RESPOSTAS
<i>PONTOS</i>	<i>ESCORE</i>	102 PACIENTES %
0 A < 39	LEVE	9,8%
=39 A < 59	MODERADO	30,39%
= < 59 A 100	SEVERO	59,80%

Fonte: autora

Considerando os valores dos pontos das respostas das 102 pacientes fibromiálgicas (Figura 4) foi possível determinar um valor médio de pontos de 52,50 de acordo com o escore do FIQ, com um desvio padrão de $\pm 40,29$ pontos, sendo este considerado muito grande, fora de padrão.

Figura 4: Maior e menor valor das respostas FIQ



Fonte: autora

A metodologia utilizada neste trabalho para a aplicação do FIQ, assim como seus resultados baseando-se no seu escore, obedece os critérios utilizados por (BENNETT, 2005) em vários dos seus trabalhos descritos.

7.4 DADOS DO QUESTIONARIO ACR2010

Quando analisados os resultados das respostas pertinentes ao questionário ACR 2010 nestes 102 pacientes, observou-se positiva a as características estabelecidas para critérios de avaliação, onde apresentavam dor difusa ou generalizada (WPI) $\geq 7/19$, e severidade dos sintomas ≥ 5 , para 71,56% desta população e apenas 2,94 % mostraram-se WPI 3 a 6 e SS = ≥ 9 . Foi possível verificar que cerca de 25,50% das pacientes apresentavam características mistas quanto a pontuação de dor generalizada e a severidade dos sintomas, caracterizando-as de acordo com o escore em não fibromialgicas, como descreve a tabela 4.

Tabela 4: Critérios do ACR 2010 e % das respostas dos pacientes de acordo com novo critério

	DOR GENERALIZADA OU DIFUSA (WPI)	SEVERIDADE SINTOMAS (SS)	PACIENTES (%)
FIBROMIALGICOS	≥ 7 a 19	≥ 5	71,56%
	3 a 6	≥ 9	2,94%
NÃO FIBROMIALGICOS	-	-	25,50%

Fonte: autora

Estes valores descritos demonstram a nova metodologia utilizada para a avaliação dos pacientes fibromialgicos, utilizadas a partir de 2010(WOLFE, 2010).

7.5 CORRELAÇÃO FIQ E ACR2010

Se correlacionarmos as respostas do questionário FIQ e ACR 2010mod, com o objetivo de identificarmos os pacientes que apresentaram comprometimento no FIQ e aqueles que apresentam-se fibromialgicos ou não de acordo com os critérios do ACR 2010mod, observaremos a descrição por esses critérios de acordo com a tabela 5 mostra.

Tabela 5: Correlação dos pacientes fibromialgicos pelos critérios do FIQ e ACR2010

FIQ	Pctes	ACR2010	Pacientes
LEVE MODERADO GRAVE OU SEVERO	1 17 58	FIBROMIALGICOS	76
LEVE MODERADO GRAVE OU SEVERO	9 14 3	NÃO FIBROMIALGICOS	26

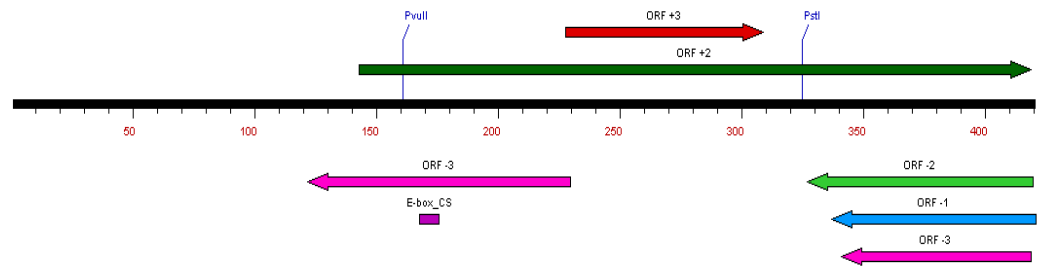
Fonte: autora

Essa amostra mostrou-se com relação positiva quando observado os critérios de comparação entre o FIQ e ACR2010. Para isso foi aplicado o teste-t, e obtido os valores $t=-9,7809$ e $P>0,001$.

7.6 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO DRD3

Para verificar a presença de polimorfismo no gene DRD3 foi necessário a análise dos sequenciamentos. Para isso precisou-se obter um template do perfil do gene DRD3, como mostra a figura 5.

Figura 5: Esquema do gene DRD3

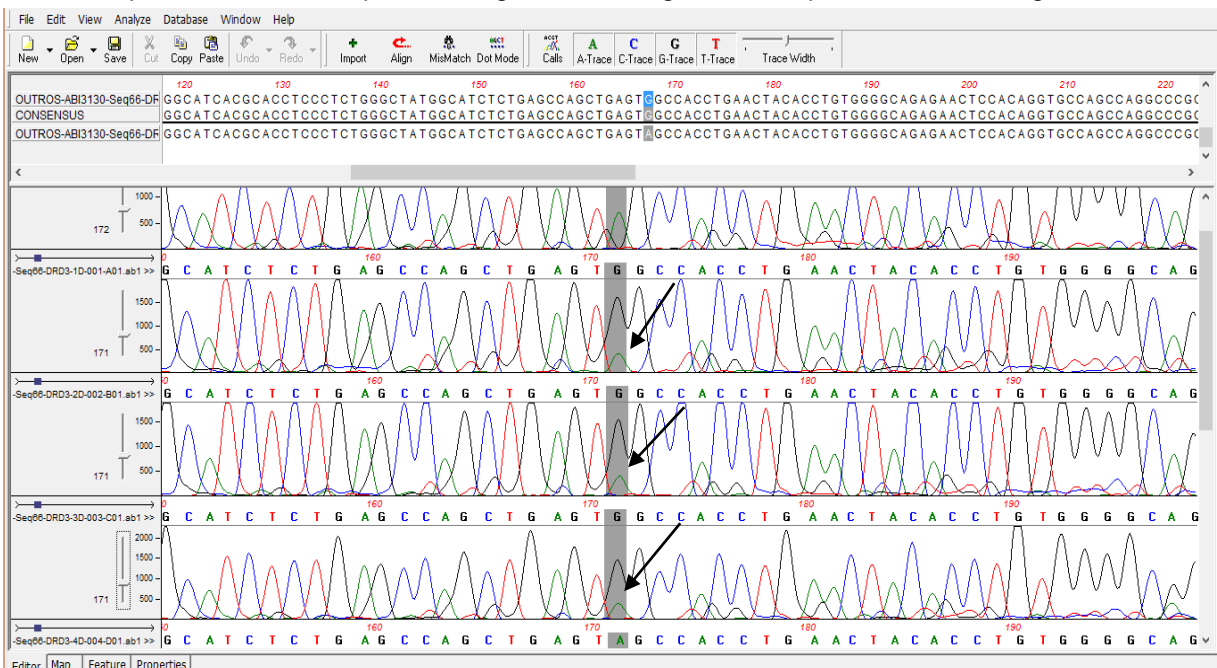


Fonte: <http://www.sciencedirect.com/>

Os eletroferogramas das reações de sequenciamento do SNP de DRD3 foram analisadas no programa Programs Accelrys Gene 2.5 e estão ilustrados na figura 7e 8 respectivamente.

Assim, foi possível observar na figura 7, possíveis genótipos para o SNP de DRD3 das amostras de pacientes fibromialgicos, sendo então genótipo heterozigoto AG na região 167.

Figura 7: Cromotograma representativo do sequenciamento do fragmento de PCR do gene DRD3 apresentando Genótipo heterozigoto AG na região 167 de pacientes fibromialgicos.



Fonte: autora

Em relação ao genótipo normal (TGG), este apresentou-se mais frequente no grupo controle para o SNPs em relação ao grupo de indivíduos com fibromialgia. Assim, para o SNP loc 167, o genótipo GG apresentou maior frequência 79,01% para o genótipo GA como mostra a tabela 5.

Nas amostras sequenciadas dos pacientes controle, quando analisadas da mesma forma ou seja utilizando-se o mesmo template, observou-se que pela análise molecular do gene DRD3 que o genótipo mutante AA para os SNPs no loc 167 são mais frequentes nos pacientes com fibromialgia comparados com os indivíduos controle apresentando diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$).

Figura 8: Cromotograma representativo do sequenciamento do fragmento de PCR do gene DRD3 apresentando Genótipo homocigoto AA na região 167 de pacientes controle.



Fonte: autora

Tabela 6: Distribuição e comparação dos genótipos do SNP do gene DRD3 com a média do escore FIQ e ACR2010 em pacientes com fibromialgia e indivíduos controle

GENOTIPOS	PACIENTES	Escore de FIQ	Escore ACR2010	CONTROLE	Valor de P
AA	33,9%	33,4%	22,69%	59,01%	P <0,001
GT	9,6%	14,54%	14,45%	NS	P <0,001
GG	12,5%	10,08%	11,21%	11,09%	P <0,001
AG	44,81	41,98%	51,65%	29,9%	P <0,001

Fonte: autora

A relação dos SNPs do gene DRD3, ainda é muito obscura quando se trata de sua influência quanto a com a sensibilidade a dor, como descrito por (POTVIN et al., 2009), que observa a possível presença destes SNPs em pacientes com alterações na modulação da dor, sintoma mais característico da síndrome fibromialgica, justificando então a correlação.

A percepção de dor é um processo complexo que é influenciado por uma variedade de fatores, assim, a associação de polimorfismos a percepção de dor humana e as condições persistentes da dor são de grande importância (DIATCHENKO et al., 2005).

No caso da síndrome fibromiálgica, muitas tentativas têm sido feitas para compreender sua patogenia, como (LIGHT, K. C. et al., 2012) que tenta elucidar a expressão de genes e sua relação com a dor.

8 CONCLUSÕES

O questionário de triagem auxiliou no levantamento de informações do perfil dos pacientes fibromialgicos, contribuindo para dados adicionais importantes para análise dos resultados obtidos.

Os novos criterios de avaliação do ACR2010 para os pacientes fibromialgicos comparados aos dados do FIQ e seus escores, mostram que pacientes classificados como fibromialgicos do tipo moderado e severo pelo FIQ, realmente se enquadram aos pontos do escore do ACR2010, ou seja, classificados também como fibromiálgicos, e o grupo classificado como fibromialgicos tipo leve pelo escore do FIQ, são tidos como não fibromialgico pelos critrios do ACR2010.

Em relação ao polimorfismo do gene DRD3, ele apresentou-se presente na população fibromialgica estudada, em proporções mais elevadas do que em pacientes do grupo controle. Quanto aos resultados do sequenciamento das amostras, encontramos mutações heterozigotas presentes no loc 167 das amostras observadas.

A relação da análise molecular dos genótipos dos pacientes fibromialgicos com o escore FIQ e ACR2010, também mostrou-se presente e de acordo, corroborando com os resultados afirmados acima.

ANEXO 1:**ESCLARECIMENTO AO PACIENTE**

Prezado Paciente,

Este trabalho de pesquisa tem o objetivo de estudar o DNA proveniente do sangue colhido de pacientes com fibromialgia, no intuito de utilizar este material genético para analisar a influência das várias formas dos genes com a intensidade a dor, por meio de experiências em laboratório com esse sangue. Serão coletados amostras de sangue de indivíduos de pacientes com fibromialgia do Hemocentro de São José do Rio Preto. Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento para a doação de 5 ml de sangue venoso, a coleta de sangue não causará risco a sua saúde, sendo que o único risco da coleta será o desconforto da “picada” e possivelmente o aparecimento de uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Deve ficar claro que o sujeito da pesquisa poderá retirar o material genético a qualquer momento, e caso for necessário, o doador será consultado sobre o uso deste material genético em projetos futuros. Além de você, outros 99 fibromiálgicos também participarão do estudo. O benefício desta pesquisa será o estudo das variações genética de 2 genes que estão envolvidos com a doença e também com a intensidade da dor em pacientes com fibromialgia.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito participar da presente Pesquisa.

São José do Rio Preto, _____ de _____ 2013.

Nome: _____

Telefone: _____

Assinatura do sujeito de pesquisa

ANEXO 2:**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu _____, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “**ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA**”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “**Avaliação de polimorfismos de genes que influenciam a percepção da dor em pacientes com fibromialgia**” que tem como pesquisador responsável a **Profª Drª Ana Lúcia Fachin Saltoratto**, residente a rua Doutor Antonio José Moreira nº57 CEP 14.055-320 e tel (016) 3011-8824, Ribeirão preto e o médico **Prof . Dr. Roberto Acayaba de Toledo, CRM SP 22645, e Profª Dra. Glauce Rejane Leonardi Bertazzi**, especialmente no que diz respeito ao objetivo de pesquisa aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, a forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa a que serei submetido.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e o meu material genético e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que possa afetar a minha vontade de continuar nele participando.
5. O compromisso que serei consultado sobre o uso de meu material genético em projetos futuros.
6. O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

7. O ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da minha participação no projeto, a ser promovido pelo Patrocinador da pesquisa.
8. Que o ressarcimento de eventuais despesas, bem como indenização, a título de cobertura material, para reparação de danos imediatos ou tardios, decorrentes de minha participação na pesquisa, serão feitos pelo Patrocinador da Pesquisa; não cabendo ao participante paciente, qualquer responsabilidade quantos aos referidos pagamentos.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

São José do Rio Preto, ____ de _____ de 2013.

Profª Drª. Ana Lúcia Fachin Saltorato

Assinatura dos participantes da pesquisa

ANEXO 3: QUESTIONARIO DE TRIAGEM

IDADE _____ SEXO () Feminino () Masculino PROFISSAO _____

FILHOS () Sim nº de filhos _____ () Não ESTADO CIVIL _____

GRAU DE ESCOLARIDADE () 1ºGRAU () 2º GRAU () SUPERIOR

TABAGISTA() SIM () NÃO () EX-FUMANTE

ETILISTA () SIM () NÃO

DOENÇAS ASSOCIADAS: DIABETES()

HIPERTENSAO ()

TRIGLICERIDES ALTO ()

COLESTEROL ()

OUTRAS _____

FAMILIARES COM DIAGNOSTICO DE FIBROMIALGIA ()SIM () NÃO

FAZ USO DE ANTIDEPRESSIVO () SIM _____ () NÃO

TEM FREQUENTEMENTE DOR DE CABEÇA () SIM () NÃO

FAZ ALGUM TIPO DE TRATAMENTO ALTERNATIVO PARA FIBROMIALGIA ()SIM()NÃO

VOCE REALIZA ATIVIDADE FISICA DIARIAMENTE? () SIM () NÃO

VOCE PARTICIPA D ATIVIDADES ESPORTIVAS OU CULTURAIS EMGRUPO() SIM()NÃO

VOCE TEM ALGUM TEMPO PARA RELAXAR? () SIM () NAO

VOCE SE SENTE UMA PESSOA ANSIOSA? () SIM () NAO

VOCE TEM DIFICULDADES PARA DORMIR? () SIM () NÃO

VOCE ACORDA DURANTE O SONO? () SIM () NÃO

ACORDA CANSADO, COMO SE NÃO TIVESSE DORMIDO? () SIM () NAO

VOCE SENTE ALGUM ADORMECIMENTO EM SEU CORPO? () SIM _____ () NÃO

VOCE SENTE PERDA DE FORÇA? () SIM _____ () NÃO

ASSINALE O FATOR QUE AUMENTA A SUA DOR ()ATIVIDADE FISICA EXCESSIVA ()

ESTRESSE () INATIVIDADE

VOCE ACREDITA NA CURA DA SUA FIBROMIALGIA () SIM () NÃO

ANEXO 4

Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ)

1-

Você é capaz de :	Sempre	Na maioria das vezes	Ocasionalmente	Nunca
A-fazer compras	0	1	2	3
B-lavar roupas	0	1	2	3
C-preparar refeições	0	1	2	3
D- lavar louças/cozinhar usando utensílios com as mãos	0	1	2	3
E-aspirar um tapete	0	1	2	3
F-fazer as camas	0	1	2	3
G-andar vários quartos	0	1	2	3
H-visitar amigos/parentes	0	1	2	3
I-fazer trabalhos no quintal	0	1	2	3
J-dirigir carro	0	1	2	3

2-Nos 7 dias da semana passada, quantos dias você se sentiu bem?

1 2 3 4 5 6 7

3- Quantos dias da semana passada você faltou ao trabalho devido à

fibromialgia? (se não tiver trabalho externo, deixar em branco)

1 2 3 4 5 6 7

4-Quando você foi ao trabalho, o quanto a dor ou outros sintomas de sua fibromialgia interferiram com a sua capacidade para fazer o seu trabalho?

Sem problema _____ grande dificuldade

5- Como tem sido sua dor

Sem dor _____ dor insuportável

6- Quanto você tem se sentido cansado?

Sem cansaço _____ muito cansado

7- Como você tem se sentido quando se levanta pela manhã?

Acorda bem cansado _____ acorda muito cansado

8- Como tem sido a sua rigidez?

Sem rigidez _____ muita rigidez

9-Quão tenso, nervoso ou ansioso você tem se sentido?

Sem tensão _____ muita tensão

10-Quão depressivo ou triste você tem se sentido?

Sem depressão _____ muito deprimido

ANEXO 5:

Critérios preliminares de fibromialgia elaborados pelo ACR em 2010				
ESCALA DE GRAVIDADE DOS SINTOMAS				
Marque a intensidade dos sintomas, conforme você está se sentindo nos último 7 dias.				
FADIGA (Cansaço ao executar atividades)	0	1	2	3
SONO NÃO REPARADOS (acordar cansado)	0	1	2	3
SINTOMAS COGNITIVOS (dificuldade de memória, concentração, etc.)	0	1	2	3
SINTOMAS SOMÁTICOS (dor abdominal, dor de cabeça, dor muscular, dor nas juntas, etc.)	0	1	2	3

Critérios preliminares de fibromialgia elaborados pelo ACR em 2010					
INDICE DE DOR GENERALIZADA					
Marque com x as áreas onde teve dor nos últimos 7 dias					
ÁREA	SIM	NÃO	ÁREA	SIM	NÃO
MANDIBULA E			MANDÍBULA D		
OMBRO E			OMBRO D		
BRAÇO E			BRAÇO D		
ANTEBRAÇO E			ABTEBRAÇO D		
QUADRIL E			QUADRIL D		
COXA E			COXA D		
PERNA E			PERNA D		
CERVICAL			DORSO		
TÓRAX			LOMBAR		
ABDOME					
TOTAL DE ÁREAS DOLOROSAS: _____					



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Avaliação da polimorfismos de genes que influenciam a percepção da dor em pacientes com fibromialgia*		2. CAAE:	
3. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas, Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
4. Nome: Ana Lucia Fachin Saltoratto			
5. CPF: 178.612.668-00	6. Endereço (Rua, n.º): DOUTOR ANTONIO JOSE MOREIRA SUMAREZINHO 57 RIBEIRAO PRETO SAO PAULO 14055320		
7. Nacionalidade: BRASILEIRA	8. Telefone: (16) 3011-8824	9. Outro Telefone:	10. Email: afachin@unaerp.br
11. Cargo:			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: 18 / 05 / 2012		Assinatura:	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Universidade de Ribeirão Preto UNAERP	13. CNPJ:	14. Unidade/Órgão:	
15. Telefone: (16) 3603-6779	16. Outro Telefone:		
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento desta projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: Suzeliei de Castro Franca	CPF: 133 156 888 30		
Cargo/Função: Coordenadora da Unidade			
Data: 18 / 05 / 2012	Assinatura:		
PATROCINADOR PRINCIPAL			
17. Nome: 5497 Universidade de Ribeirão Preto UNAERP	18. Telefone: (16) 3603-6779	19. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.			
Nome: Suzeliei de Castro Franca	CPF: 133 156 888 30		
Cargo/Função: Coordenadora da Unidade	Email: s.franca@unaerp.br		
Data: 18 / 05 / 2012	Assinatura:		

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
Elaborado pela Instituição Coparticipante

Número do Parecer: 94.642
Data da Relatoria: 11/09/2012

Apresentação do Projeto:

Pesquisa científica

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os polimorfismos de genes que influenciam a percepção da dor em pacientes com fibromialgia

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios satisfatórios ao desenvolvimento do projeto

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não se aplica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não se aplica

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não se aplica

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO JOSE DO RIO PRETO, 11 de Setembro de 2012

Assinado por:
Fernando Batigália

ANEXO 8:**UNIVERSIDADE DE RIBEIRAO PRETO
UNAERP****D PROJETO DE PESQUISA****Titulo:** Avaliação de polimorfismos de genes que influenciam a percepção da dor em pacientes com fibromialgia**Área Temática:**

Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2**CAAE:** 04021012.9.0000.5498**Pesquisador:** Ana Lucia Fachin Saltoratto**Instituição:** Universidade de Ribeirão Preto UNAERP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****Número do Parecer:** 99.585**Data da Relatoria:** 13/09/2012**Apresentação do Projeto:**

O estudo envolve uma avaliação da influência dos SNPs do gene da enzima Catechol-O-methyltransferase(COMT) e do gene DRD3 sobre a sensibilidade à dor em pacientes com fibromialgia.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência dos SNPs do gene da enzima Catechol-O-methyltransferase (COMT) e do gene DRD3 sobre a sensibilidade a dor em pacientes com fibromialgia.

Objetivos secundários

- a) Extrair DNA genômico de sangue periférico de pacientes com fibromialgia e de indivíduos controle.
- b) Caracterizar os SNPs dos genes COMT e do gene DRD3 por PCR e digestão com enzima de restrição
- d) Avaliar a intensidade da dor em pacientes com fibromialgia através do questionário Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ).
- e) Relacionar os polimorfismos dos genes COMT e DRD3 com a intensidade da dor em pacientes com fibromialgia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os autores, a realização do experimento envolve a coleta de sangue, o que não causará risco à saúde do paciente. Entretanto, durante a coleta, há o desconforto da "picada" e, possivelmente, o aparecimento de uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Os benefícios da pesquisa, por sua vez, se referem ao fato de que o sangue (material genético) será utilizado para analisar a influência das várias formas dos genes relacionados à intensidade da dor em fibromialgia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo proposto é de grande relevância, uma vez que a fibromialgia tem afetado, de forma freqüente, um grande número de mulheres em idade produtiva. As pesquisas sobre a etiologia da doença têm demonstrado que os fatores genéticos ou mecanismos moleculares estão correlacionados com a fibromialgia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A maior parte dos termos foi apresentada, mas existem algumas pendências.

Recomendações:

O projeto deve ser aprovado após o cumprimento das exigências do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. O TCLE não está assinado pelo pesquisador responsável pela pesquisa e não apresenta RG, telefone e endereço do pesquisador responsável pela pesquisa. No TCLE, a autorização é para utilização do material biológico neste projeto de pesquisa. Caso haja armazenamento do material biológico colhido ou descarte, é necessário explicitar no TCLE o destino que será dado a este material. Na metodologia, deve ser informado como será feito o armazenamento ou o descarte.
2. Não foram informados os critérios para encerrar ou suspender a pesquisa.
3. A autorização para utilização das dependências da Unidade de Biotecnologia deve ser da responsável pela Unidade.
4. No cronograma, devem ser incluídos os meses também, lembrando que a coleta só deve ser iniciada após a aprovação do comitê.
5. O orçamento não consta no projeto e devem ser informados quais serão os gastos e se são solicitados recursos à Instituição.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Pendências Atendidas.

RIBEIRAO PRETO, 17 de Setembro de 2012

Assinado por:
Luciana Rezende Alves de Oliveira

REFERÊNCIAS

AGUGLIA, A. et al. Fibromyalgia syndrome and depressive symptoms: comorbidity and clinical correlates. **J Affect Disord**, v. 128, n. 3, p. 262-6, Feb 2011.

ARNOLD, L. M. Biology and therapy of fibromyalgia. New therapies in fibromyalgia. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 4, p. 212, 2006.

ARNOLD, L. M. et al. Family study of fibromyalgia. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 3, p. 944-52, Mar 2004.

BARBOSA, F. R. et al. Influence of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphisms in pain sensibility of Brazilian fibromyalgia patients. **Rheumatol Int**, v. 32, n. 2, p. 427-30, Feb 2012.

BELLATO, E. et al. Fibromyalgia syndrome: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Pain Res Treat**, v. 2012, p. 426130, 2012.

BENNETT, R. The Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ): a review of its development, current version, operating characteristics and uses. **Clin Exp Rheumatol**, v. 23, n. 5 Suppl 39, p. S154-62, Sep-Oct 2005.

BENNETT, R. et al. Criteria for the diagnosis of fibromyalgia: Validation of the modified 2010 preliminary ACR criteria and the development of alternative criteria. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, Feb 4 2014.

BOOMERSHINE, C. S. et al. Simplifying Fibromyalgia Assessment: The VASFIQ Brief Symptom Scale. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v. 3, n. 5, p. 215-26, Oct 2011.

CAGNIE, B. et al. Central sensitization in fibromyalgia? A systematic review on structural and functional brain MRI. **Semin Arthritis Rheum**, Jan 8 2014.

CLAUW, D. J. Pain management: Fibromyalgia drugs are 'as good as it gets' in chronic pain. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, n. 8, p. 439-40, Aug 2010.

CORDERO, M. D. et al. [Low levels of serotonin in serum correlates with severity of fibromyalgia]. **Med Clin (Barc)**, v. 135, n. 14, p. 644-6, Nov 13 2010.

DE SOUZA, J. B. et al. Fibromyalgia subgroups: profiling distinct subgroups using the Fibromyalgia Impact Questionnaire. A preliminary study. **Rheumatol Int**, v. 29, n. 5, p. 509-15, Mar 2009.

FINAN, P. H.; ZAUTRA, A. J. Fibromyalgia and fatigue: central processing, widespread dysfunction. **PM R**, v. 2, n. 5, p. 431-7, May 2010.

FITZCHARLES, M. A. et al. Classification and Clinical Diagnosis of Fibromyalgia Syndrome: Recommendations of Recent Evidence-Based Interdisciplinary Guidelines. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 528952, 2013.

GARCIA-MARTIN, E. et al. Dopamine receptor 3 (DRD3) polymorphism and risk for migraine. **Eur J Neurol**, v. 17, n. 9, p. 1220-3, Sep 2010.

GOLDENBERG, D. L. Diagnosis and differential diagnosis of fibromyalgia. **Am J Med**, v. 122, n. 12 Suppl, p. S14-21, Dec 2009.

GURSOY, S. et al. Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome. **Rheumatol Int**, v. 23, n. 3, p. 104-7, May 2003.

HENRY, J. L. Concepts of pain sensation and its modulation. **J Rheumatol Suppl**, v. 19, p. 104-12, Nov 1989.

HEYMANN, R. E.; HELFENSTEIN, M.; FELDMAN, D. A double-blind, randomized, controlled study of amitriptyline, nortriptyline and placebo in patients with fibromyalgia. An analysis of outcome measures. **Clin Exp Rheumatol**, v. 19, n. 6, p. 697-702, Nov-Dec 2001.

KATZ, R. S.; WOLFE, F.; MICHAUD, K. Fibromyalgia diagnosis: a comparison of clinical, survey, and American College of Rheumatology criteria. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 1, p. 169-76, Jan 2006.

LEE, S. Y. et al. The COMT and DRD3 genes interacted in bipolar I but not bipolar II disorder. **World J Biol Psychiatry**, v. 12, n. 5, p. 385-91, Aug 2011.

LIGHT, A. R. et al. Gene expression alterations at baseline and following moderate exercise in patients with Chronic Fatigue Syndrome and Fibromyalgia Syndrome. **J Intern Med**, v. 271, n. 1, p. 64-81, Jan 2012.

LIGHT, K. C. et al. Genetics and Gene Expression Involving Stress and Distress Pathways in Fibromyalgia with and without Comorbid Chronic Fatigue Syndrome. **Pain Res Treat**, v. 2012, p. 427869, 2012.

MAO, X. et al. Meta-analysis of the influence of DRD3 Ser9Gly variant on susceptibility for essential tremor. **J Clin Neurosci**, v. 20, n. 12, p. 1644-9, Dec 2013.

MULERT, C. et al. A Ser9Gly polymorphism in the dopamine D3 receptor gene (DRD3) and event-related P300 potentials. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1335-44, Jun 2006.

New criteria proposes using pain, symptoms to diagnose fibromyalgia. **Mayo Clin Womens Healthsource**, v. 14, n. 12, p. 3, Dec 2010.

PETERSEL, D. L.; DROR, V.; CHEUNG, R. Central amplification and fibromyalgia: disorder of pain processing. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 1, p. 29-34, Jan 2011.

POTVIN, S. et al. DRD3 Ser9Gly polymorphism is related to thermal pain perception and modulation in chronic widespread pain patients and healthy controls. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 969-75, Sep 2009.

POTVIN, S. et al. Temporal summation of pain is not amplified in a large proportion of fibromyalgia patients. **Pain Res Treat**, v. 2012, p. 938595, 2012.

RAHMAN, A.; UNDERWOOD, M.; CARNES, D. Fibromyalgia. **BMJ**, v. 348, p. g1224, 2014.

SMITH, H. S.; BARKIN, R. L. Fibromyalgia syndrome: a discussion of the syndrome and pharmacotherapy. **Dis Mon**, v. 57, n. 5, p. 248-85, May 2011.

SUNDERMANN, B. et al. Diagnostic Classification Based on Functional Connectivity in Chronic Pain: Model Optimization in Fibromyalgia and Rheumatoid Arthritis. **Acad Radiol**, v. 21, n. 3, p. 369-77, Mar 2014.

TEE, S. F.; TANG, P. Y.; LOH, H. C. No evidence for association between DRD3 and COMT with schizophrenia in a Malay population. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 3, p. 1850-5, 2011.

VARGAS-ALARCON, G. et al. Catechol-O-methyltransferase gene haplotypes in Mexican and Spanish patients with fibromyalgia. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n. 5, p. R110, 2007.

WOLFE, F. Fibromyalgia. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 16, n. 3, p. 681-98, Aug 1990.

_____. New American College of Rheumatology criteria for fibromyalgia: a twenty-year journey. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 62, n. 5, p. 583-4, May 2010.

_____. Sleep problems and risk of fibromyalgia--untenable conclusions: comment on the article by Mork et al. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 5, p. 1692-3; author reply 1693-4, May 2012.

WOLFE, F. et al. Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. **J Rheumatol**, v. 38, n. 6, p. 1113-22, Jun 2011.

WOLFE, F. et al. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. **Arthritis Rheum**, v. 38, n. 1, p. 19-28, Jan 1995.

WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. **Arthritis Rheum**, v. 33, n. 2, p. 160-72, Feb 1990.

YUNUS, M. B. Central sensitivity syndromes: a new paradigm and group nosology for fibromyalgia and overlapping conditions, and the related issue of disease versus illness. **Semin Arthritis Rheum**, v. 37, n. 6, p. 339-52, Jun 2008.

YUNUS, M. B.; ALDAG, J. C. The concept of incomplete fibromyalgia syndrome: comparison of incomplete fibromyalgia syndrome with fibromyalgia syndrome by 1990 ACR classification criteria and its implications for newer criteria and clinical practice. **J Clin Rheumatol**, v. 18, n. 2, p. 71-5, Mar 2012.

