

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**  
**GABRIELLA LUCIANA DE OLIVEIRA**

**NÍVEIS ELEVADOS DE IL-17, IL-23, MIP-1A, MCP-1 E LEUCÓCITOS GLOBAIS  
EM PACIENTES COM FIBROMIALGIA**

**FORMIGA – MG**  
**2017**

GABRIELLA LUCIANA DE OLIVEIRA

NÍVEIS ELEVADOS DE IL-17, IL-23, MIP-1A, MCP-1 E LEUCÓCITOS GLOBAIS EM  
PACIENTES COM FIBROMIALGIA

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao curso de Biomedicina do UNIFOR-MG,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Pereira  
Pernambuco.

FORMIGA – MG

2017

O48 Oliveira, Gabriella Luciana de.  
Níveis elevados de IL-17, IL-23, MIP-1A, MCP-1 e leucócitos  
globais em pacientes com fibromialgia / Gabriella Luciana de Oliveira. –  
2017.  
59 f.

Orientador: Andrei Pereira Pernambuco.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina)-Centro Universitário  
de Formiga-UNIFOR, Formiga, 2017.

1. Fibromialgia. 2. Imunologia. 3. Inflamação. I. Título.

CDD 616.079

Gabriella Luciana de Oliveira

NÍVEIS ELEVADOS DE IL-17, IL-23, MIP-1A, MCP-1 E LEUCÓCITOS GLOBAIS EM  
PACIENTES COM FIBROMIALGIA

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao curso de Biomedicina do UNIFOR-MG,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de bacharel em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Andrei Pereira Pernambuco  
Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Ana Dalva Costa  
UNIFOR-MG

---

Prof. Dr. Fernando Sérgio Barbosa  
UNIFOR-MG

Formiga, 16 de novembro de 2017.

*“O inimigo da verdade não é a mentira e sim, a convicção.”*

*Friedrich Nietzsche*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meus caminhos, e por nos dotar de sentidos, razão e intelecto, o que permitiu a realização deste trabalho. Obrigada pelas infinitas bênçãos, possibilitando a concretização dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andrei, pelas oportunidades durante o projeto de Iniciação Científica, pelas suas ideias, correções, críticas e elogios, os quais contribuíram imensamente para meu aprendizado. Agradeço pela motivação e apoio que foram fundamentais no desenvolvimento do estudo, assim como na minha formação.

Aos colegas da pesquisa, que contribuíram para execução desse projeto e por toda experiência e conhecimento compartilhado.

Aos meus familiares, principalmente meus pais, Marcos e Analine, e minha irmã, Bruna, por me permitirem chegar até aqui, graças ao apoio incondicional, carinho, amor e compreensão nos dias de mau humor e pouca conversa.

Aos amigos do curso, Douglas, Rosielle, Camila, Sarah, Dayane, Lorena e Mirelly, pela amizade e apoio nesses quatro anos.

Aos professores e à coordenadora do curso de Biomedicina, Daniela, por seus ensinamentos e grande contribuição teórica.

Aos pacientes e aos indivíduos do grupo controles que consentiram em participar, por sua disponibilidade e colaboração durante sua participação voluntária neste estudo.

E a todos que por acaso não tenham sido mencionados, mas que contribuíram para o sucesso deste trabalho.

## RESUMO

A Fibromialgia (FM) é caracterizada pela presença de dor crônica e generalizada, associada a sintomas como, fadiga, distúrbios do sono e alterações cognitivo-comportamentais. A sua fisiopatologia ainda não foi completamente elucidada, mas estudos sugerem a participação do sistema imunológico e conseqüentemente da resposta inflamatória envolvida na gênese e evolução desta condição. O objetivo do estudo foi avaliar e comparar a contagem da global de leucócitos e os níveis plasmáticos de citocinas (IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1) encontrados em pacientes com fibromialgia (FM) e controles saudáveis. Quarenta e quatro mulheres com FM e vinte e oito mulheres saudáveis com Índice de Massa Corporal (IMC) semelhante participaram deste estudo. A contagem de glóbulos brancos foi determinada pelo hemograma completo. Os níveis plasmáticos de citocinas foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA). A análise estatística foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov para distribuição de dados, o teste de Mann-Whitney ou Teste t independent para analisar diferenças intergrupos, teste de correlação de Spearman para associação entre as variáveis e a regressão múltipla para selecionar as variáveis preditivas. Os testes foram realizados pelo SPSS v.19 (SPSS Inc., Chicago, IL), com nível de significância definido para  $\alpha=0,05$ . Pacientes com FM apresentaram níveis significativamente maiores de leucócitos globais, IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 do que controles saudáveis. O número absoluto de leucócitos globais está diretamente e positivamente correlacionado com níveis plasmáticos de IL-23 e IL-17 em pacientes com FM. A IL-17 foi a única variável selecionada no modelo de predição dos níveis de leucócitos em pacientes com FM. Os níveis mais elevados de leucócitos globais, IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 mostrados por pacientes com FM apoiam o envolvimento do sistema imunológico na fisiopatologia dessa condição. A associação entre altos níveis de leucócitos globais com altos níveis plasmáticos de citocinas, principalmente IL-17, em pacientes com FM deve ser considerada durante o diagnóstico de FM e a tomada de decisão clínica.

Palavras-chave: Fibromialgia. Imunologia. Inflamação.

## ABSTRACT

Fibromyalgia (FM) is characterized by the presence of chronic and generalized pain, associated with symptoms such as fatigue, sleep disorders and cognitive-behavioral changes. Its pathophysiology has not yet been fully elucidated, but studies suggest the involvement of the immune system and inflammatory response involved in the genesis and evolution of this condition. The aim of the study was to evaluate and compare the global leukocyte count and plasma levels of cytokines (IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1) found in patients with fibromyalgia (FM) and healthy controls. Forty-four women with FM and twenty-eight healthy women combined by age and Body Mass Index (BMI) participated in this study. The white blood cell count was determined by the complete blood count. The plasmatic levels of cytokines were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The statistical analysis was performed by means of the Kolmogorov–Smirnov test for data distribution, the Mann–Whitney test or independent t-test to test for intergroup differences, Spearman’s correlation test for association between the variables and stepwise multiple regression to select the independent predictive variables. The tests were performed in SPSS v.19 (SPSS Inc., Chicago, IL), with significance level set to  $\alpha=0.05$ . Patients with FM had significantly higher levels of global leukocytes, IL-17, IL-23, MCP-1 and MIP-1a than healthy controls. The absolute number of global leukocytes is directly and positively correlated with plasmatic levels of IL-23 and IL-17 in FM patients. IL-17 was the only variable selected in the prediction model of leukocyte levels in FM patients. The higher levels of global leukocytes, IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 showed by FM patients support the involvement of the immune system in the pathophysiology of this condition. The association between high levels of global leukocytes with high plasmatic levels of cytokines, mainly IL-17, in FM patients should be considered during the FM’s diagnosis and clinical decision making.

Keywords: Fibromyalgia. Immunology. Inflammation.

## LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1 – Esquema representando a distribuição dos <i>tender points</i>. .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>Figura 2 - Comparação entre o número absoluto de leucócitos globais por mm<sup>3</sup> encontrados no sangue de pacientes com FM (FM) e controles saudáveis (HC). .....</b> | <b>25</b> |
| <b>Figura 3 – Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas encontradas em pacientes com FM (FM) e controles saudáveis (HC). .....</b>  | <b>27</b> |

## LISTA DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1 - Características sociodemográficas dos pacientes com FM e controles saudáveis.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>Tabela 2 - Hemograma dos pacientes com FM e controle saudáveis. ....</b>  | <b>24</b> |
| <b>Tabela 3 - Níveis de citocinas em pacientes com FM e controles saudáveis. ...</b>   | <b>26</b> |
| <b>Tabela 4 - Matriz de correlação entre leucócitos globais, idade, IMC e citocinas em pacientes com FM. ....</b>                          | <b>28</b> |
| <b>Tabela 5 - Matriz de correlação entre leucócitos globais, idade, IMC e citocinas em controles saudáveis.....</b>                        | <b>28</b> |
| <b>Tabela 6 - Regressão múltipla para avaliar a relação independente entre variáveis explicativas e níveis globais de leucócitos. ....</b> | <b>28</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH** – Hormônio adrenocorticotrófico
- CAR** - Colégio Americano de Reumatologia
- CBA** - Citometria de Fluxo
- DP** - Desvio Padrão
- EDTA** - Ácido Etilenodiaminotetracético
- EGS** - Escala de Gravidade dos Sintomas
- ELISA** - Ensaio Imunoenzimático
- FM** - Fibromialgia
- HPA** - Hipotálamo-hipófise-adrenal
- HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Performance
- IDG** - Índice de Dor Generalizada
- IL-12** - Interleucina 12
- IL-17** - Interleucina 17
- IL-23** - Interleucina 23
- ISRS** - Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina
- IMC** - Índice de Massa Corporal
- MCP-1** - Proteína Quimiotática de Monócitos-1
- MIP-1 $\alpha$**  - Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 $\alpha$
- MIP-1b** - Proteína Inflamatória de Macrófagos 1b
- NK** - Natural Killers
- PCR** - Reação em Cadeia de Polimerase
- SNC** - Sistema Nervoso Central
- SNP** - Sistema Nervoso Periférico
- Q-PCR** - Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa em Tempo Real
- TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- UNIFOR-MG** - Centro Universitário de Formiga-MG.

## SUMÁRIO

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>2</b>   | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....                                  | <b>13</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Síndrome da Fibromialgia</b> .....                             | <b>13</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Diagnóstico</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Tratamento</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Fisiopatologia</b> .....                                       | <b>16</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Mediadores Inflamatórios</b> .....                             | <b>18</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                  | <b>21</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Considerações éticas</b> .....                                 | <b>21</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Tipo de estudo</b> .....                                       | <b>21</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Participantes</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Critérios de inclusão ou exclusão</b> .....                    | <b>21</b> |
| <b>3.5</b> | <b>Coleta de dados</b> .....                                      | <b>22</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Análise estatística dos dados</b> .....                        | <b>23</b> |
| <b>4</b>   | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>5</b>   | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | <b>35</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>36</b> |
|            | <b>ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b> .....             | <b>45</b> |
|            | <b>APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> ... | <b>47</b> |
|            | <b>APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO</b> .....                        | <b>49</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A Fibromialgia (FM) é uma condição reumática que acomete cerca de 2% da população e que afeta principalmente mulheres, com proporção de até nove mulheres para cada homem (DADABHOY et al., 2008). A FM é caracterizada por dor crônica (mais de três meses), generalizada (lado direito e esquerdo do corpo, acima e abaixo da cintura média e pelo menos um ponto do esqueleto axial) (WOLFE; HAUSER, 2011). Além da dor, vários outros sintomas compreendem o quadro clínico de FM, entre eles, são: fadiga, depressão, síndrome do intestino irritável, má qualidade do sono, dores de cabeça, distúrbios cognitivos e rigidez matinal. No entanto, a manifestação desses sintomas pode variar amplamente entre os pacientes (WOLFE; HAUSER, 2011; SARZI-PUTTINI et al., 2012).

A heterogeneidade clínica apresentada pelos pacientes com FM é um fator que dificulta o diagnóstico desta condição, que continua sendo feita exclusivamente de forma clínica, já que não há biomarcadores para esta condição (DADABHOY et al., 2008). Além disso, a complexidade e quantidade dos sintomas da FM sugerem uma etiologia multifatorial para esta condição. Afinal, um único fator etiológico é incapaz de explicar a diversidade dos sintomas demonstrados pelos pacientes. Assim, vêm se tornando consenso que as alterações genéticas, cognitivas comportamentais, neuroendócrinas e imunológicas parecem interagir, resultando na gênese e evolução do quadro clínico da FM (CARVALHO et al., 2008).

Por sua vez, o envolvimento do sistema imunológico na síndrome de FM é um alvo frequente de estudos (CARVALHO et al., 2008; PERNAMBUCO et al., 2013; AL-ALLAF et al., 2002; NISHIKAI et al., 2001; TOGO et al., 2009; KAUFMANN et al., 2007; KOTTER, et al., 2007). Embora, em alguns casos, estes sejam contraditórios e inconclusivos, na maioria dos casos eles apoiam a participação da resposta imune no início e perpetuação dos sintomas mostrados pelos pacientes com FM (CARVALHO et al., 2008; PERNAMBUCO et al., 2013). A determinação do envolvimento da resposta imune na fisiopatologia da FM é relevante, principalmente pelo fato de que, atualmente, a terapia medicamentosa para esta condição consiste principalmente de antidepressivos, relaxantes musculares, analgésicos e antiinflamatórios não esteróides, que mesmo trabalhando em conjunto não promovem a remissão completa dos sintomas (BELLATO et al., 2012; BAZZICHI et al., 2011).

Diante deste contexto, o objetivo deste estudo foi buscar evidências para apoiar um possível papel da atividade imune na fisiopatologia da FM. Para este efeito, realizou-se uma análise comparativa dos valores do hemograma completo e níveis plasmáticos de: interleucina 17 (IL-17), interleucina 23 (IL-23), proteína inflamatória de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) encontrados em pacientes com FM diagnosticados de acordo com critérios do Colégio Americano de Reumatologia (CAR) (WOLFE; HAUSER, 2011) e controles saudáveis, combinados para sexo, idade e índice de massa corporal (IMC).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Síndrome da Fibromialgia

A Fibromialgia é definida pelo CAR como uma condição reumática que cursa com dor crônica e generalizada (WOLFE et al., 2013). A dor é o sintoma mais evidenciado e que geralmente, se desenvolve lentamente ao longo dos anos (SUMPTON; MOULIN, 2014).

Por se tratar de uma síndrome, alguns sintomas simultâneos são relatados, como fadiga, distúrbios do sono, transtornos de humor (ansiedade de depressão), síndrome das pernas inquietas e cefaleia crônica (SUMPTON; MOULIN, 2014).

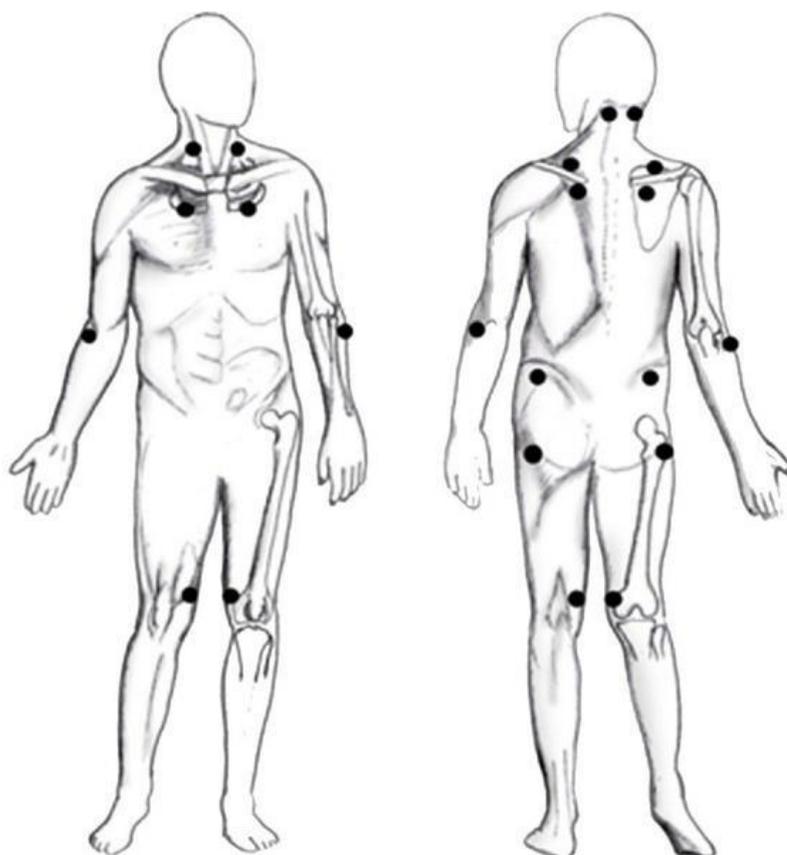
Uma das principais características dessa condição é a heterogeneidade clínica dos sintomas apresentados pelos pacientes, o que leva a grande dificuldade na conclusão do diagnóstico. Parte da dificuldade acerca do critério diagnóstico mais apropriado e também das dúvidas sobre tratamentos, é devido ao espaço ainda existente sobre a sua etiologia. Acredita-se, portanto, em uma origem multifatorial no desencadeamento da síndrome (DA COSTA et al., 2005). Diversos estudos indicam uma interação de vários fatores envolvidos na fisiopatologia dessa síndrome, como fatores genéticos, imunológicos, endócrinos, neurológicos e comportamentais (MALIN; LITTLEJOHN, 2015; PERNAMBUCO et al., 2016; PERNAMBUCO et al., 2013; YIGIT et al., 2013). Desse modo, a complexidade clínica da síndrome poderia ser explicada pela sua multifatorialidade etiológica (WIERWILLE, 2012).

A prevalência da FM é de 2% da população em geral (WOLFE et al., 2013). Pode ocorrer em ambos os sexos, mas acomete predominantemente o gênero feminino, em uma parcela de nove mulheres para cada homem (WALITT et al., 2015). O início dos sintomas é mais frequente na faixa etária de 30-55 anos (GOLDENBERG, 2008). A prevalência dessa síndrome torna alarmante o seu impacto social e econômico, visto que, entre 10%-25% dos pacientes são afastados do trabalho ou necessitam de condições especiais para realizarem suas funções (GOLDENBERG, 1995).

## 2.2 Diagnóstico

Na ausência de um biomarcador específico, o diagnóstico da FM é baseado na manifestação de dor e sintomas associados. O diagnóstico clínico baseia-se nas recomendações do CAR. Foi elaborado em 1990, com o intuito de padronizar os critérios de diagnóstico. Foram incluídos dois critérios: dor crônica, por mais de três meses, dor generalizada, e presença de dor em pelo menos 11 dos 18 pontos dolorosos (*tender points*) estabelecidos (WOLFE et al., 1990). Sintomas como distúrbios do sono, fadiga, depressão, ansiedade, rigidez matinal, cefaleia e síndrome do cólon irritável, não eram considerados durante o diagnóstico, mesmo compondo o quadro clínico da FM (WOLFE et al., 2010).

Figura 1 – Esquema representando a distribuição dos *tender points*.



Fonte: BELLATO et al., 2012

Com avanços em pesquisa e a partir de observações clínicas de profissionais que realizavam atendimentos em pacientes fibromialgicos, algumas críticas foram levantadas acerca da efetividade desses critérios. Dentre elas, a falta de relação

entre os sintomas somáticos e a avaliação dos *tender points*, levando à necessidade da criação de novos parâmetros. Desse modo, foi estabelecido em 2011 novos critérios, com o intuito de atribuir maior atenção aos sintomas associados à dor. Os novos critérios foram distribuídos em Índice de Dor Generalizada (IDG) e Escala de Gravidade dos Sintomas (EGS), englobando além da presença de dor, o sono, fadiga e sintomas cognitivos. O diagnóstico de FM é confirmado quando é apresentada pontuação maior ou igual a sete no IDG e maior ou igual a cinco no EGS ou pontuação entre três e seis no IDG e EGS maior ou igual a nove (WOLFE et al., 2011). Os critérios de 2011 não foram determinados com o intuito de substituir os critérios de 1990, mas para auxiliar em um diagnóstico de prática geral (SUMPTON; MOULIN, 2014).

Não há um exame laboratorial confirmado para o diagnóstico da fibromialgia. Contudo, os exames são utilizados para excluir outras doenças que se assemelham clinicamente com a síndrome, como alguns distúrbios reumatológicos e endócrinos (SUMPTON; MOULIN, 2014).

### **2.3 Tratamento**

A elaboração de uma conduta terapêutica eficaz é difícil, devido à heterogeneidade clínica e a falta de um esclarecimento preciso quando à fisiopatologia da síndrome (WIERWILLE, 2012). Assim, até o momento não há um tratamento definitivo para esta condição (CALANDRE; RICO-VILLADEMOROS, 2012; TERRY et al., 2012).

Uma forma do tratamento é realizado a partir da combinação de forma farmacológica e não farmacológica. Tem como objetivo a diminuição da dor, melhora do sono e restauração da função física, mental e emocional, melhorando assim a qualidade de vida de um modo geral (RUSSELL, 2008).

A terapia farmacológica baseia-se no uso de antidepressivos de diversas classes e analgésicos. Os antidepressivos tricíclicos são considerados o padrão no tratamento da FM (ÜCEYLER; HÄUSER; SOMMER; 2008). Porém, devido a efeitos indesejáveis frequentes, e uma redução da eficácia no curso do tratamento, geralmente é usado na prática por tempo limitado. Inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS), como fluoxetina, citalopram e paroxetina são efetivos no tratamento da síndrome, bem como em outras condições dolorosas

(GOLDENBERG; BURCKHARDT; CROFFORD; 2004). Estes fármacos apresentam maior eficácia quando comparado aos antidepressivos tricíclicos devido a sua seletividade, uma vez que não apresentam atividade em outros receptores, levando a uma redução de efeitos indesejáveis. O tratamento também é composto por analgésicos e anti-inflamatórios não-esteróides, atuando no controle da dor, a nível central e periférico (SMITH; BRACKEN; SMITH, 2011). Ansiolíticos e relaxantes musculares também auxiliam na terapia, através da liberação de endorfinas que atuam no alívio de dor, na melhoria do espasmo muscular e os distúrbios do sono (PAUER et al., 2012).

Também são utilizadas terapias não farmacológicas, como tratamento psicoterápico e fisioterapia. A terapia psicológica não é suficiente por si só, (KENDALL et al., 2000; REDONDO et al., 2004; THIEME; TURK; FLOR, 2007), mas auxilia nas estratégias para redução da dor (BERNARDY et al., 2010). A fisioterapia também é indicada e atua com diversos recursos, como técnicas de relaxamento, exercícios cinesioterápicos, acupuntura, trabalho de condicionamento cardiorrespiratório, hidroterapia, pilates e terapias manuais, visando a melhora dos sintomas, principalmente da dor (FONSECA; FARIA; PERNAMBUCO, 2016).

## **2.4 Fisiopatologia**

Ainda que sua patogênese não esteja completamente esclarecida, existem algumas possibilidades que envolvem o desencadeamento desta síndrome (BRAZ et al., 2011). Os resultados de dados encontrados na literatura sugerem que a fisiopatologia da FM seja uma decorrência da desregulação entre mecanismos de interação dos sistemas, com destaque para sistema imunológico. Essas alterações explicariam a manifestação e evolução dos sintomas da doença (GEISS et al., 2012).

Quanto a sua multifatorialidade, a característica consistente é a alteração no processo de dor, com influências no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). A sensibilização central é considerada o principal mecanismo envolvido e é definida pelo aumento da resposta à estimulação mediada pela sinalização do SNC (BELLATO et al., 2012). Além do aumento dos mecanismos neuronais, a ativação de células gliais também já foi descrita por desempenhar uma função importante na patogênese da síndrome, uma vez que

auxilia no processo de modulação da transmissão de dor na medula espinhal. Devido aos estímulos dolorosos, são liberadas citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas e óxido nítrico que estimulam e prolongam a hiperexcitabilidade da medula espinhal (WATKINS et al., 2001; WATKINS; MAIER, 2005). Vários neurotransmissores também foram demonstrados envolvidos na sensibilização central, como a serotonina que tem uma função significativa na modulação da dor (WATKINS; MAIER, 2005), regulação do humor e sono, explicando a associação de alguns sintomas somáticos da FM (RESSLER; NEMEROFF, 2000; JUHL, 1998). Também foi descrito o envolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) na FM, devido à relação da síndrome com o estresse. Foram demonstrados níveis elevados de cortisol e de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e provavelmente estão relacionados a níveis baixos de serotonina, uma vez que as fibras serotoninérgicas regulam a função do eixo HPA (CROFFORD, 2002; FERRACCIOL et al., 1990; NEECK, 2000).

Em relação ao sistema imunológico, já foi observada uma relação entre a FM e doenças autoimunes (MIDDLETON et al., 1994; WOLFE; MICHAUD, 2004). Além disso, as características da síndrome junto com as respostas da doença são um conjunto de mudanças adaptativas fisiológicas e comportamentais que podem ocorrer em resposta à infecção, inflamação ou trauma tecidual. Essa resposta é mediada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias periféricas, que então desencadeiam uma regulação positiva da produção de citocinas pró-inflamatórias no cérebro, principalmente por células gliais (MILLIGAN; WATKINS, 2009). O estresse agudo também tem sido relacionado ao aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias (GEISS; ROHLEDER; ANTON, 2012; KIM; MAES, 2003; ROHLEDER; ARINGER; BOENTERT, 2012). Além do estresse, a diminuição da duração e qualidade do sono também está sendo apontada como uma causa importante de elevação das citocinas pró-inflamatórias (ROHLEDER; ARINGER; BOENTERT, 2012; HAACK; SANCHEZ; MULLINGTON, 2007).

Também é indicada uma relação da síndrome com doenças infecciosas, como em um estudo onde 55% dos pacientes com FM relataram a associação de uma infecção ao aparecimento dos sintomas, sugerindo que a infecção é uma forma de gatilho. Outros autores também descreveram uma maior prevalência da FM em pacientes com vírus da hepatite B e C, HIV, vírus linfotrópico de células T humanas

e infecções por *Mycoplasma* (CASSISI; SARZI-PUTTINI; CAZZOLA, 2011; MOHAMMAD et al., 2012). Porém, esses resultados não são consistentes.

## 2.5 Mediadores Inflamatórios

Há inúmeras investigações sobre a participação do sistema imunológico na origem e desenvolvimento da doença. Apesar disso, os resultados divergem, não confirmando nem descartando as hipóteses (KOTTER et al., 2007; TOGO et al., 2009; NISHIKAI et al., 2001; CARVALHO et al., 2008). Mediadores inflamatórios são moléculas de atuação local ou sistêmica, produzidas e liberadas frente a um estímulo ou lesão. São originados no plasma, de tecidos lesados ou células inflamatórias e apresentam redundância funcional (NATHAN, 2002).

As citocinas são marcadores sugestivos de atividade imunológica e estudos recentes sugerem que apresentam um papel importante na patogênese desta síndrome, apontando uma participação na dor crônica e outros sintomas (WALLACE et al, 2001). Estas proteínas são pequenas, não estruturais com peso molecular entre 8 a 40.000. Acredita-se que sejam a chave do sistema imunológico, mas exercem um papel amplo na fisiologia, atuando em quase todos os órgãos e sistemas. Normalmente, atuam como um regulador da inflamação. A união seletiva de uma citocina com o seu receptor na superfície da membrana celular induz uma cascata de eventos intracelulares. O efeito das citocinas é breve, uma vez que seu efeito prolongado poderia ser prejudicial e, de fato, um alto nível de certas citocinas tem sido associado a diferentes doenças como a artrite reumatoide e a doença de Crohn (DINARELLO, 2000).

Acredita-se que a desproporção entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é o que causa uma sensibilização periférica crônica do sistema nervoso, afetando a forma como a dor é processada (AHRENS; SCHILTENWOLF; WANG, 2012; KIGUCHI; KOBAYASHI; KISHIOKA, 2012). Quando há danificação de qualquer tecido, as células inflamatórias se acumulam em volta, liberando quimiocinas e citocinas que suscitam sensibilização periférica. As citocinas demonstraram modificar o efeito da atividade neuronal e influenciar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

A IL-17 compreende um subconjunto de citocinas que participam de respostas inflamatórias agudas e crônicas. É uma citocina pró-inflamatória que desempenha

um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra infecções, mas que também está implicada em condições inflamatórias, como doenças autoimunes (OUYANG et al., 2008; MILNER, 2011; KUCHROO et al., 2012; AHMED; GAFFEN, 2010; TRINCHIERI, 2012; GALLIMORE; GODKIN, 2013). A produção patológica de IL-17 gera uma inflamação excessiva e danos no tecido aberto. Foi dada uma maior importância à essa citocina após a descoberta de um subconjunto de células TCD4+, a Th17, que produz IL-17 e demonstrado que a IL-17 é um dos principais impulsionadores para várias doenças autoimunes e inflamatórias. Os níveis elevados de IL-17 e Th17 foram associados a várias doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, como artrite reumatóide, psoríase e artrite psoriática, espondilite anquilosante, doença de Crohn e esclerose múltipla (LOCK et al., 2002; KAGAMI et al., 2010; LOWES et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2008).

A IL-23 é uma citocina que consiste em uma subunidade p40, que compartilha com IL-12 e uma subunidade p19. Estudos revelaram que o eixo IL-23/IL-17 (Th17), é fundamental para o desenvolvimento da autoimunidade (CUA et al., 2003; MURPHY et al., 2003). A descoberta da IL-23 e ao esclarecimento da sua atividade, levou a novos conhecimentos importantes na imunologia uma vez que a IL-23 tem papéis fundamentais na patogênese da autoimunidade, induzindo uma população de células com uma única assinatura de gene inflamatório (CUA et al., 2003; OPPMANN et al., 2000; KASTELEIN et al., 2007).

As quimiocinas são um grupo de moléculas relativamente pequenas e pertence à classe das citocinas pró-inflamatórias. Elas exercem um importante papel na ativação dos leucócitos, controlando atividades de recrutamento e de ativação em estados basal e inflamatório (LUSTER, 1998; CHARO; RANSOHOFF, 2006). Outros tipos celulares também sofrem ação das quimiocinas, como células epiteliais, endoteliais e músculo liso (LOCATI et al., 2002).

Em um processo fisiopatológico, as quimiocinas auxiliam no recrutamento e transmigração de leucócitos, eliminação de patógenos, remodelamento vascular e tecidual, cronificação da inflamação, apresentação de antígenos e reparo/cicatrização dos tecidos (LOCATI et al., 2002; ROSENKILDE; SCHWARTZ, 2004). Também atuam aumentando a sensibilidade à dor através de uma ação direta nos receptores de quimiocinas expressos nos nervos periféricos para os gânglios dorsais e a medula espinhal (CHARO; RANSOHOFF, 2006; ABBADIE, 2005). Desta forma, quimiocinas são consideradas importantes tanto na homeostase

quanto na patogênese de doenças e, uma vez que o principal sintoma da fibromialgia é dor, pode-se pensar que essas quimiocinas estejam envolvidas na fisiopatologia desta síndrome.

A MCP-1 apresenta uma importância significativa na ativação e recrutamento de linfócitos T, monócitos e basófilos durante a inflamação aguda. São importantes ativadores e quimioatrativos de linfócitos T, além de serem capazes de estimular a lise de células-alvo pelas células NK provenientes da corrente sanguínea (FERREIRA et al., 2005). Já a MIP-1a é descrita inicialmente como inibidor da proliferação das células-tronco e regulador da hematopoiese. Também é considerado um estimulador da produção e liberação de leucócitos da medula óssea (SHERRY et al., 1988).

Uma vez que as citocinas e quimiocinas podem desempenhar um papel em cada um dos sintomas principais da FM, uma produção de citocinas desreguladas em pacientes com FM é sugerido. No entanto, não há resultados consistentes sobre o padrão dessas moléculas nesses indivíduos (UÇEYLER; HOUSER; SOMMER, 2011). Ainda assim são alvos frequentes em diversas pesquisas que visam investigar os mecanismos da patogênese da FM.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Considerações éticas**

Este estudo foi iniciado após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética do Centro Universitário de Formiga – MG (UNIFOR-MG) através do número de aprovação 332.004. (ANEXO A). Todos os procedimentos adotados estão em conformidade com a Declaração de Helsinque. Para a participação no estudo, os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

#### **3.2 Tipo de estudo**

Este estudo é um estudo observacional, retrospectivo e transversal com o uso do grupo de controle.

#### **3.3 Participantes**

Após o recrutamento de voluntários através de propagandas em jornais e divulgação nas Unidades Básicas de Saúde, a amostragem foi realizada por conveniência, e as primeiras 44 mulheres com FM e as 28 primeiras mulheres saudáveis que preencheram os critérios de inclusão participaram do estudo. As mulheres previamente diagnosticadas com FM foram submetidas a uma triagem médica para confirmar o diagnóstico por um especialista que usou os critérios do CAR de 2011 (WOLFE; HAUSER, 2011).

#### **3.4 Critérios de inclusão ou exclusão**

Para participar do estudo, os pacientes com FM deviam apresentar: diagnóstico de FM por mais de dois anos, ter o diagnóstico confirmado por um especialista em medicina, idade entre 25 e 60 anos, IMC abaixo de 30 kg/m<sup>2</sup>, ter interrompido o tratamento com medicamentos anti-inflamatórios em pelo menos 30 dias antes da coleta de dados, não ter sido introduzido nenhum medicamento novo no mês anterior à coleta de dados e assinar o termo de consentimento.

Foram excluídos do estudo aqueles que: não assinaram ou não concordaram com o TCLE, aqueles que violaram o protocolo de coleta de dados, aqueles que introduziram novos medicamentos no mês anterior à coleta de dados, aqueles que usaram anti-inflamatórios esteróides e não esteróides nos últimos 30 dias, mulheres grávidas ou mães lactantes, mulheres com doenças inflamatórias sistêmicas ativas, mulheres com malignidade e mulheres já diagnosticadas com transtornos depressivos maiores.

Para compor o grupo controle, foram selecionadas mulheres saudáveis com IMC e idade semelhante à dos pacientes com FM. Os mesmos critérios de inclusão ou exclusão foram adotados para mulheres saudáveis, além do fato de que não poderiam ter nenhuma condição médica diagnosticada nos últimos três meses.

### **3.5 Coleta de dados**

Cinco mililitros de sangue periférico foram obtidos por punção da veia braquial, em sequência foi armazenado em um tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como o anticoagulante. A coleta de sangue foi realizada em um laboratório clínico. O mesmo laboratório realizou a contagem de células sanguíneas, de acordo com o protocolo padrão do laboratório.

Os níveis de IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 no plasma foram determinados por ELISA de acordo com a recomendação do fabricante. IL-17 (Uscn Life Science Inc., Wuhan, PR China), o limite de detecção do ensaio foi de 5,9 pg/ml; IL-23 (Abcam, San Francisco, CA), a sensibilidade do ensaio foi de 20 pg/ml; MIP-1a (Uscn Life Science Inc., Wuhan, PR China), 5,9 pg/ml e MCP-1 (Abcam, San Francisco, CA), a sensibilidade do ensaio foi de 2 pg/ml. Em todos os casos, o coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foi de <10% e <12%, respectivamente. A técnica ELISA assegurou confiabilidade e validade para a detecção de citocinas, os resultados obtidos por esta técnica são semelhantes aos obtidos por Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (Q-PCR), Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e Citometria de fluxo (CBA) (AMSEN; TOWN, 2009).

### 3.6 Análise estatística dos dados

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para análises intergrupos quando os dados apresentavam distribuição anormal e o Teste t independente quando os dados tinham distribuição normal. As correlações entre as variáveis foram realizadas utilizando o teste de correlação de Spearman. A regressão múltipla foi utilizada para selecionar a relação independente entre a contagem global de leucócitos e as variáveis preditivas. Ajustes do tipo stepwise foram feitos para controlar variáveis que são potenciais fatores de alteração para níveis de leucócitos. Todos os testes foram realizados em IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 19.0 (Armonk, NY), e o nível de significância foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Os resultados foram representados por média  $\pm$  desvio padrão (DP) e IC 95%.

## 4 RESULTADOS

Em relação às características sociodemográficas dos participantes, a tabela 1 demonstra a semelhança entre os membros dos dois grupos (TAB. 1).

Tabela 1 - Características sociodemográficas dos pacientes com FM e controles saudáveis.

| Variáveis     | Pacientes FM (N=44) |             | Controles saudáveis (N=28) |             | Valor $\rho$ |
|---------------|---------------------|-------------|----------------------------|-------------|--------------|
|               | Média $\pm$ DP      | 95% IC      | Média $\pm$ DP             | 95% IC      |              |
| <b>Idade</b>  | 43,75 $\pm$ 8,19    | 41,26-46,24 | 45,54 $\pm$ 4,51           | 43,78-47,29 | 0,29         |
| <b>Peso</b>   | 70,70 $\pm$ 9,43    | 67,84-73,57 | 69,79 $\pm$ 4,59           | 68,00-71,57 | 0,89         |
| <b>Altura</b> | 1,65 $\pm$ 0,05     | 1,63-1,66   | 1,64 $\pm$ 0,04            | 1,62-1,66   | 0,79         |
| <b>IMC</b>    | 25,85 $\pm$ 2,34    | 25,13-26,56 | 25,80 $\pm$ 1,94           | 25,05-26,55 | 0,93         |

Resultados do teste de Mann-Whitney ou Teste t independente para as diferenças entre os grupos em variáveis sociodemográficas. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão e 95% de intervalo de confiança (IC 95%).

Fonte: Da autora.

Os resultados deste estudo demonstram que não há diferença significativa entre controles saudáveis e pacientes com FM, em relação ao número absoluto ou relativo de: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, mielócitos, metamielócitos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos típicos, monócitos, linfócitos atípicos e plaquetas (TAB. 2).

Tabela 2 - Hemograma dos pacientes com FM e controle saudáveis.

| CBC   | Pacientes FM (N=44) |             | Controles saudáveis (N=28) |             | Valor $\rho$ |
|---|---------------------|-------------|----------------------------|-------------|--------------|
|   | Média $\pm$ DP      | 95% IC      | Média $\pm$ DP             | 95% IC      |              |
| <b>Eritrócitos (milhões/mm<sup>3</sup>)</b>         | 4,48 $\pm$ 0,31     | 4,39-4,58   | 4,35 $\pm$ 0,36            | 4,21-4,49   | 0,10         |
| <b>Hemoglobina (g/dl)</b>                           | 12,80 $\pm$ 0,87    | 12,53-13,07 | 12,50 $\pm$ 0,84           | 12,17-12,83 | 0,12         |
| <b>Hematócrito (%)</b>                              | 38,97 $\pm$ 2,53    | 38,20-39,74 | 38,18 $\pm$ 2,83           | 37,08-2,83  | 0,15         |
| <b>Global de Leucócitos (célula/mm<sup>3</sup>)</b> | 7.356 $\pm$ 1.916   | 6.735-7.977 | 5.979 $\pm$ 1.053          | 5.534-6.424 | 0,002**      |
| <b>Mielócitos (%)</b>                               | 0,0 $\pm$ 0,0       |             | 0,0 $\pm$ 0,0              |             |              |
| <b>Metamielócitos (%)</b>                           | 0,0 $\pm$ 0,0       |             | 0,0 $\pm$ 0,0              |             |              |
| <b>Bastonetes (%)</b>                               | 0,38 $\pm$ 0,65     | 0,18-0,58   | 0,28 $\pm$ 0,46            | 0,10-0,46   | 0,75         |
| <b>Segmentados (%)</b>                              | 67,32 $\pm$ 7,54    | 65,03-69,61 | 64,71 $\pm$ 5,08           | 62,74-66,69 | 0,11         |

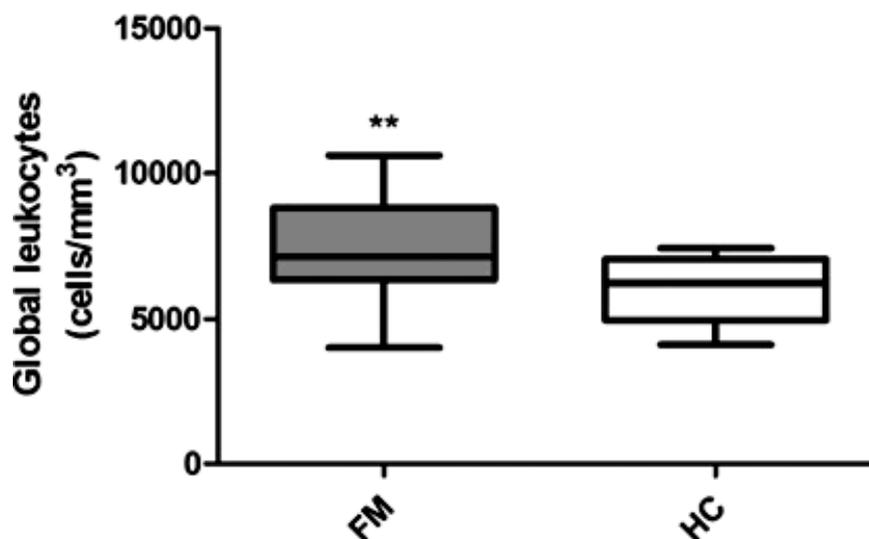
|  |                  |                 |                  |                 |      |
|--|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------|
| <b>Eosinófilos (%)</b>                   | 0,90 ± 0,98      | 0,54-1,38       | 1,14 ± 0,65      | 0,89-1,39       | 0,09 |
| <b>Basófilos (%)</b>                     | 0,0 ± 0,0        |                 | 0,0 ± 0,0        |                 |      |
| <b>Linfócitos Típicos (%)</b>            | 29,45 ± 7,14     | 27,28-31,63     | 31,57 ± 4,30     | 29,90-33,24     | 0,16 |
| <b>Monócitos</b>                         | 1,93 ± 0,97      | 1,63-2,22       | 2,10 ± 0,78      | 1,80-2,41       | 0,21 |
| <b>Linfócitos Atípicos (%)</b>           | 0,0 ± 0,0        |                 | 0,0 ± 0,0        |                 |      |
| <b>Plaquetas (célula/mm<sup>3</sup>)</b> | 307.909 ± 67.320 | 287.442-328.376 | 300.857 ± 61.315 | 277.081-324.633 | 0,65 |

Resultados do teste de Mann-Whitney ou Teste t independent para as diferenças entre os grupos em diferentes variáveis analisadas no estudo. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). (\*\*p<0.01).

Fonte: Do autor.

No entanto, os resultados demonstram que o número global de leucócitos por mm<sup>3</sup> de sangue em pacientes com FM é significativamente maior que o encontrado em mulheres saudáveis (p=0,002). No grupo de mulheres com FM, a mediana foi de 7150 células/mm<sup>3</sup>, e entre as mulheres saudáveis, a mediana encontrada foi de 6200 células/mm<sup>3</sup> (FIG. 2). A mediana encontrada em pacientes com FM é 12,67% e os valores médios são 18,71% maiores que os valores encontrados em mulheres saudáveis.

Figura 2 - Comparação entre o número absoluto de leucócitos globais por mm<sup>3</sup> encontrados no sangue de pacientes com FM (FM) e controles saudáveis (HC).



(\*\*p<0.01).

Fonte: Da autora.

Em relação aos níveis plasmáticos de citocinas: IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1, os dados mostram que os níveis plasmáticos de todas essas citocinas são significativamente diferentes entre pacientes com FM e controles saudáveis (TAB. 3).

Tabela 3 - Níveis de citocinas em pacientes com FM e controles saudáveis.

| Citocinas                       | Pacientes FM (N=44) |               | Controles saudáveis (N=28) |               | Valor $\rho$ |
|---------------------------------|---------------------|---------------|----------------------------|---------------|--------------|
|                                 | Média $\pm$ DP      | 95% IC        | Média $\pm$ DP             | 95% IC        |              |
| <b>IL-17</b>                    | 50,00 $\pm$ 35,63   | 37,95-62,06   | 21,17 $\pm$ 8,53           | 17,56-24,77   | <0,0001***   |
| <b>IL-23</b>                    | 155,10 $\pm$ 13,16  | 150,08-159,40 | 142,7 $\pm$ 7,96           | 139,40-145,90 | 0,0373*      |
| <b>MIP-1<math>\alpha</math></b> | 78,00 $\pm$ 20,47   | 70,74-85,25   | 67,07 $\pm$ 20,95          | 57,78-76,36   | 0,0383*      |
| <b>MCP-1</b>                    | 27,98 $\pm$ 14,13   | 23,20-32,76   | 18,02 $\pm$ 12,12          | 12,90-23,14   | <0,0001**    |

Resultados do teste de Mann-Whitney ou Test t independent em comparação com as diferenças entre os grupos em diferentes citocinas analisadas no estudo. Os resultados são expressos em média  $\pm$  DP e 95% de intervalo de confiança (IC 95%). \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ .

Fonte: Da autora.

As análises intergrupos revelaram que os níveis de IL-17 ( $p < 0.001$ ), IL-23 ( $p = 0.0373$ ), MIP-1a ( $p = 0.0383$ ) e MCP-1 ( $p < 0.001$ ) são significativamente maiores em pacientes com FM do que em controles saudáveis, pareados pelo gênero, idade e IMC (FIG. 3).

A análise da correlação entre o número absoluto de leucócitos globais por  $\text{mm}^3$  de sangue e os níveis plasmáticos de citocinas (IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1), idade e IMC em pacientes com FM mostraram que o número absoluto de leucócitos globais por  $\text{mm}^3$  de sangue está associado significativamente e positivamente aos níveis séricos de IL-17 ( $r = 0,52$  e  $p = 0,002$ ) e IL-23 ( $r = 0,40$  e  $p = 0,018$ ). As outras variáveis não apresentaram relação estatisticamente significativa com o número de células brancas por  $\text{mm}^3$  de sangue (TAB. 4).

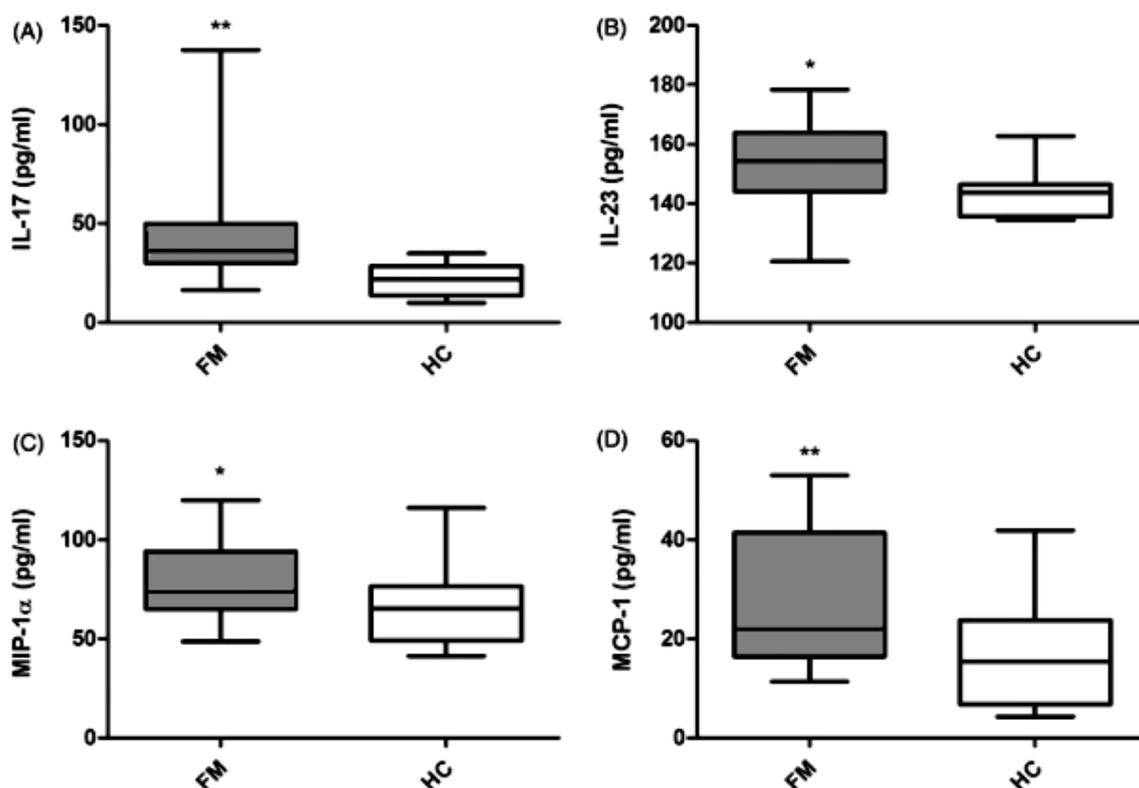
Entre os controles saudáveis, os níveis de leucócitos globais por  $\text{mm}^3$  de sangue não foram correlacionados com os níveis plasmáticos de IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1, idade ou IMC (TAB. 5).

A análise de regressão múltipla mostrou que, no grupo de pacientes com FM, entre todos os modelos possíveis, o único modelo ( $R^2_{aj} = 51,6\%$ ) testado que explicou os níveis de leucócitos globais em pacientes com fibromialgia foi o que continha apenas a variável explicativa IL-17. Esta variável permaneceu independentemente associada aos níveis globais de leucócitos. Neste modelo, para

cada aumento de 1 pg/mL da IL-17, observou-se um aumento médio de 38,54 células/mm<sup>3</sup> nos níveis globais de leucócitos (TAB. 6).

No grupo controle, entre todos os modelos testados, foram gerados dois modelos: Modelo A ( $R^2_{aj}=35,7\%$ ) contendo apenas a IL-23, esta citocina foi associada independentemente com níveis globais de leucócitos. Neste modelo, para cada aumento de 1 pg/mL de IL-23 observou-se uma redução média de 71,52 células/mm<sup>3</sup> nos níveis globais de leucócitos. O modelo B ( $R^2_{aj}=63,6\%$ ) foi composto pelas variáveis explicativas IL-23 e MCP-1, que foram independentemente associadas aos níveis globais de leucócitos. Neste modelo, cada aumento de 1 pg/ml de IL-23 representa uma diminuição média de 97,77 células/mm<sup>3</sup> e, cada aumento de 1 pg/ml de MCP-1 em média de uma diminuição de 43,95 células/mm<sup>3</sup> na global de leucócitos (TAB. 6). Em nenhum dos grupos, as variáveis MIP-1a, idade e IMC foram associadas aos níveis globais de leucócitos.

Figura 3 – Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas encontradas em pacientes com FM (FM) e controles saudáveis (HC).



[A] Níveis de IL-17; [B] níveis de IL-23; [C] níveis de MIP-1a e [D] níveis de MCP-1. (\* $p<0.05$  e \*\* $p<0.01$ ).

Fonte: Da autora.

Tabela 4 - Matriz de correlação entre leucócitos globais, idade, IMC e citocinas em pacientes com FM.

|                             |                            | Global de Leucócitos | IL-17   | IL-23  | MIP-1 $\alpha$ | MCP-1 | Idade  | IMC   |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------|---------|--------|----------------|-------|--------|-------|
| <b>Global de leucócitos</b> | Coefficiente de Correlação | 1000                 | 0,520** | 0,403* | 0,300          | 0,112 | -0,166 | 0,037 |
|                             | Valor de $\rho$            | -                    | 0,002   | 0,018  | 0,113          | 0,550 | 0,311  | 0,825 |

Matriz de correlação entre o número absoluto de leucócitos globais e níveis plasmáticos de IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1, idade e IMC em pacientes com FM. O teste realizado para a análise foi o teste de correlação de Spearman. (\* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ ).

Fonte: Da autora.

Tabela 5 - Matriz de correlação entre leucócitos globais, idade, IMC e citocinas em controles saudáveis.

|                             |                            | Global de Leucócitos | IL-17 | IL-23  | MIP-1 $\alpha$ | MCP-1  | Idade  | IMC   |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------|-------|--------|----------------|--------|--------|-------|
| <b>Global de leucócitos</b> | Coefficiente de Correlação | 1000                 | 0,016 | -0,169 | -0,302         | -0,166 | -0,035 | 0,336 |
|                             | Valor de $\rho$            | -                    | 0,947 | 0,464  | 0,195          | 0,485  | 0,870  | 0,109 |

Matriz de correlação entre o número absoluto de leucócitos globais e níveis plasmáticos de IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 encontrados em controles saudáveis. O teste realizado para a análise foi o teste de correlação de Spearman.

Fonte: Da autora.

Tabela 6 - Regressão múltipla para avaliar a relação independente entre variáveis explicativas e níveis globais de leucócitos.

| Pacientes FM (N=44)  |         |          |               |            | Controle saudável (N=28) |         |          |                  |            |
|----------------------|---------|----------|---------------|------------|--------------------------|---------|----------|------------------|------------|
| Global de leucócitos |         |          |               |            | Global de leucócitos     |         |          |                  |            |
| Modelo A             | $\beta$ | $\rho$   | 95% IC        | $R^2_{aj}$ | Modelo A                 | $\beta$ | $\rho$   | 95% IC           | $R^2_{aj}$ |
| IL-17                | 38.540  | <0,001** | 22.331-54.749 | 0,516      | IL-23                    | -71.528 | 0,011**  | -123.72 a -19.32 | 0,357      |
|                      |         |          |               |            | <b>Modelo B</b>          |         |          |                  |            |
|                      |         |          |               |            | IL-23                    | -97.772 | <0.001** | -140.94 a -54.60 | 0,636      |
|                      |         |          |               |            | MCP-1                    | -43.956 | 0,006**  | -72.83 a -15.07  |            |

Todas as variáveis explicativas (IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1, idade e IMC) foram inseridas em regressão múltipla para identificar os melhores preditores para a variável de resultado (global de leucócitos). No grupo de pacientes com FM - Modelo A: IL-17 e no grupo de controles saudáveis - Modelo A: IL-23 e Modelo B: IL-23, MCP-1 foram selecionados entre todos os modelos possíveis. (\*\* $p < 0.01$ ).

Fonte: Da autora.

## 5 DISCUSSÃO

Algumas evidências apontam para um papel importante do sistema imunológico na manifestação e perpetuação de vários sintomas experimentados por pacientes com FM (CARVALHO et al., 2008; PERNAMBUCO et al., 2013; AL-ALLAF et al., 2002). Afinal, sabe-se que a resposta imune é um fenômeno altamente particular, que varia muito de caráter e intensidade em diferentes indivíduos e, portanto, pode contribuir para a variabilidade clínica apresentada por esses pacientes (NASCIMENTO, 2008). A este respeito, acredita-se que o sistema imunológico possa ser uma chave a ser considerada durante o diagnóstico de FM e durante o processo de tomada de decisão clínica por profissionais que lidam com a síndrome de FM.

No presente estudo, o grupo de pacientes com FM e o grupo de controles saudáveis não diferiu significativamente em relação ao sexo, idade, peso, estatura e IMC. Apenas mulheres foram recrutadas neste estudo, porque a FM afeta até nove mulheres para cada homem (BELLATO et al., 2012). Em ambos os grupos, a idade média das mulheres excedeu 42 anos. No Brasil, a fase pré-menopausa começa em torno de 42 anos, período de atividade física, mental e laboral completa (FONSECA et al., 2010). É importante salientar que este estudo não avaliou se as mulheres haviam entrado ou não no período da menopausa. Se considerarmos apenas a idade média em que a menopausa ocorre entre mulheres brasileiras, 48,1 anos (FONSECA et al., 2010), cerca de 32% das mulheres no grupo FM e 36% dos participantes no grupo HC já se encontravam na menopausa. Essa semelhança entre os grupos é importante, uma vez que altos níveis de IL-17 foram mostrados em mulheres pós-menopáusicas com deficiência de estrogênio (MOLNAR et al., 2004), bem como altos níveis de MCP-1 (YASUI et al., 2009). Em relação ao IMC, os participantes em ambos os grupos estavam acima do peso. Sabe-se que o IMC está diretamente associado a maiores níveis de citocinas inflamatórias (SUMARAC-DUMANOVIC et al., 2009). Neste estudo, não incluímos mulheres que foram diagnosticadas com transtornos de depressão maior, doenças autoimunes e inflamatórias, malignidades e que usaram drogas anti-inflamatórias. Afinal, essas condições podem interferir diretamente nos níveis de citocinas inflamatórias (PERNAMBUCO et al., 2013; STURGEON et al., 2014). A semelhança entre os grupos reduz a ocorrência de viés e torna os achados ainda mais relevantes.

Os resultados mostraram níveis significativamente maiores de leucócitos globais, IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 em pacientes com FM em comparação com controles saudáveis. A média de leucócitos globais encontrada em pacientes com FM foi de  $7356 \pm 1916$  células por  $\text{mm}^3$ . De acordo com a literatura, apenas valores de leucócitos maiores que 11.000 por  $\text{mm}^3$  podem ser descritos como leucocitose (NASCIMENTO, 2008). Portanto, é importante notar que os pacientes neste estudo não apresentaram quadro típico de leucocitose. No entanto, a diferença significativa encontrada entre pacientes com FM e controles saudáveis não pode ser ignorada, pois, isso pode estar sinalizando a presença de uma resposta imune de baixo potencial nesses pacientes (NASCIMENTO, 2008; FRANCISCHETTI et al., 2010).

Neste estudo, os leucócitos globais médios foram significativamente maiores em pacientes com FM do que em controles saudáveis. O estudo de Carvalho et al. (2008) que também avaliou os pacientes FM brasileiros não corroborou os dados aqui apresentados. No estudo mencionado, foi demonstrado níveis elevados em pacientes com FM, mas não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes com FM e os controles saudáveis (CARVALHO et al., 2008). O mesmo resultado encontrado por Carvalho et al. (2008) também pode ser visto nos resultados de Souza et al. (2003). No entanto, os resultados do presente estudo são corroborados por Macedo et al., os autores descobriram não apenas um aumento significativo no recrutamento de leucócitos em pacientes com FM, mas também evidenciaram um aumento significativo na adesão de leucócitos em pacientes com FM (MACEDO et al., 2007).

Além da diferença significativa entre controles e pacientes em relação aos leucócitos globais, este estudo também mostrou que as demais variáveis (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, mielócitos, metamielócitos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos típicos, monócitos, linfócitos atípicos e plaquetas) não diferiram significativamente entre os dois grupos. Esses achados corroboram com outros estudos (CARVALHO et al., 2008; SOUZA et al., 2003). No entanto, a falta de significância estatística não pode ocultar a potencial importância clínica dos aumentos observados nos pacientes com FM em quase todas as variáveis analisadas neste estudo. Este ligeiro aumento quando observado à luz de técnicas mais sofisticadas, como a microscopia confocal, a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou a citometria de fluxo, entre outros, podem revelar dados importantes omitidos durante o exame de sangue. Essas técnicas podem identificar a presença

de subconjuntos de células com base em marcadores específicos na superfície e/ou interior celular (CARVALHO et al., 2008; NEESON et al., 2003; ABDALLA et al., 2003). Esta hipótese é apoiada pelos resultados de Carvalho et al. (2008) que não encontraram alterações significativas nos leucócitos sanguíneos de pacientes com FM em comparação com controles, mas, ao se analisar as subpopulações de células imunes por citometria de fluxo, demonstrou que as subpopulações de células ativadas foram significativamente maiores em pacientes com FM. Os dados apresentados não nos permitem confirmar as descobertas acima, uma vez que as subpopulações de células imunes não foram analisadas no presente estudo.

Este estudo também demonstrou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 em pacientes com FM. Todas estas citocinas têm alto potencial pró-inflamatório, uma vez que induzem a expressão de outras citocinas, quimiocinas e metaloproteinases (KORN et al., 2009; HILLYER et al., 2009; DESHMANE et al., 2009; FENG et al., 2009). Além disso, eles participam da sinalização em várias vias celulares, tais como: STAT3, NF- $\kappa$ B e MAPK causando o início ou a perpetuação da resposta inflamatória (KIM; MOALEM-TAYLOR et al., 2011; SHANKAR et al., 2012). Também é importante notar que todas essas citocinas foram associadas a condições autoimunes como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, miocardite autoimune, dentre outras. (CHEN et al., 2011; KURTUCUN et al., 2012; GOSER et al., 2005).

Em relação a IL-17, componentes deste grupo de pesquisa foram os primeiros a demonstrarem altos níveis desta potente molécula inflamatória no plasma de pacientes com FM (PERNAMBUCO et al., 2013) e os resultados do presente estudo confirmam os achados anteriores. A IL-17 é produzida principalmente por linfócitos TH17, mas pode ser produzidos por células natural killers, células dendríticas e neutrófilos (CUA; TATO, 2010). Níveis elevados de IL-17 já foram identificados em outras condições autoimunes tais como artrite reumatoide, espondilite anquilosante, síndrome de Sjögren e esclerose múltipla (ZHANG et al., 2012; MIELIAUSKAITE et al., 2012; YOSHIZAKI et al., 2011; ROMERO-SANCHEZ et al., 2011). É importante notar que os altos níveis de IL-17 demonstrados neste estudo podem aumentar os sintomas da FM. Afinal, de acordo com a leitura, os níveis de IL-17 estão diretamente relacionados à intensidade de sintomas como dor (MENG et al., 2013), depressão (CHEN et al., 2011) e ansiedade (LIU et al., 2012).

De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar e demonstrar níveis elevados de IL-23 em pacientes com FM. Esse achado é importante porque a IL-23 tem um papel fundamental no equilíbrio entre células T reguladoras e células T efectoras, esse equilíbrio é essencial para a modulação da autoimunidade (IZCUE et al., 2008).

A IL-23 é uma potente citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células dendríticas e macrófagos, é capaz de estimular as células TH17 para promover o início ou a perpetuação da resposta imune e a inflamação crônica mediada por células TH17 (TOUSSIROT, 2012). Níveis elevados de IL-23 foram descritos em várias condições inflamatórias crônicas, como doença articular, doenças intestinais e doenças desmielinizantes (WELSBY et al., 2016). Além disso, a IL-23 tornou-se um importante alvo terapêutico para condições autoimunes e, portanto, os agentes anti IL-23 estão sendo desenvolvidos (RIOS-NAVARRO et al., 2015). Não foi identificado nenhum estudo sobre o papel da IL-23 na síndrome FM, o que impede a comparação com os achados aqui apresentados.

Quanto aos níveis de MIP-1a, mudanças significativas também foram encontradas em pacientes com FM. Nos seres humanos, existem duas formas principais, MIP1-a [CCL3] e MIP1-b [CCL4], ambas são produzidas por macrófagos, células dendríticas e linfócitos, são cruciais na resposta infecciosa e inflamatória, pois atraem monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células T e células B (SNYDER-CAPPIONE et al, 2010). Zhang et al. (2008) não encontraram diferenças significativas nos níveis de MIP-1a em comparação com controles saudáveis e pacientes com FM. De acordo com Tomioka e Matsui (2014), esta citocina é um biomarcador das doenças neuroinflamatórias e desmielinizantes, como a esclerose múltipla. Desse modo, é necessário enfatizar que um importante trabalho de revisão destaca o papel da neuroinflamação na patogênese da síndrome de FM. Os autores também sugerem que a neuroinflamação é um importante contribuinte das características clínicas apresentadas pelos pacientes FM (LITTLEJOHN et al., 2015). O presente estudo não avaliou a presença de neuroinflamação em pacientes com FM, mas os níveis elevados de MCP-1a encontrados em pacientes com FM podem sugerir a presença de neuroinflamação nesses pacientes.

Em relação ao MCP-1 [CCL2], os níveis aumentados identificados neste estudo, corroboram os achados de Zhang et al. (2008) e Bote et al. (2012). O MCP-1 é produzido por vários tipos de células, tais como: células endoteliais, células

epiteliais, fibroblastos, monócitos, astrócitos e células microgлияis (MELGAREJO et al., 2009). MCP-1 recruta células dendríticas, monócitos e linfócitos T para locais de lesão tecidual e infecção (MELGAREJO et al., 2009). A superexpressão de MCP-1 foi observada em várias condições, tais como arteriosclerose, artrite e câncer. No entanto, é necessário enfatizar que o papel do MCP-1 nestas condições não é bem compreendido (DESHMANE et al., 2009). O que é conhecido até agora é que tanto o MCP-1 como seu receptor [CCR2] são superexpressos nos gânglios da base em modelos de dor neuropática e podem induzir e melhorar o fenômeno da hiperalgesia (WHITE et al., 2009). Na FM, não há evidências para apoiar o papel da MCP-1 na dor percebida pelo paciente com esta condição. Neste estudo, a associação entre os níveis de citocinas e os principais sintomas de FM não foi testada, uma vez que a intensidade dos sintomas não foi avaliada através de questionários específicos e validados.

Embora não haja muitas evidências científicas que ligam os níveis de IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 aos principais sintomas de FM (dor, ansiedade, depressão, distúrbios do sono e fadiga), é necessário enfatizar que outras citocinas inflamatórias tais como IL-1 IL-6, IL-8 e TNF já foram associadas a estes sintomas (MENG et al., 2013; SVENSSON et al., 2010; ANG et al., 2011). A origem de IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 em pacientes com FM não foi abordada neste estudo, mas possivelmente é produzida, pelo menos em parte, por linfócitos T ativados ou linfócitos CD5 + e CD5-B, já que já foi demonstrado um aumento do número dessas células em pacientes brasileiros com FM (CARVALHO et al., 2008).

Neste estudo, a associação positiva e significativa entre o número absoluto de leucócitos e os níveis plasmáticos de IL-17 e IL-23 suporta o envolvimento dessas moléculas no recrutamento de leucócitos em pacientes com FM. Esta descoberta também é importante no contexto da sinalização celular, uma vez que a IL-23 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das células TH17, responsável pela produção de IL-17 (ZHOU et al., 2007). Neste contexto, um aumento nos níveis de IL-23 pode resultar em níveis elevados de IL-17, e ambos podem contribuir para o recrutamento de leucócitos globais observados aqui.

Embora as análises de correlação tenham demonstrado a associação positiva de IL-17 e IL-23 com níveis globais de leucócitos em pacientes com FM, apenas a IL-17 permaneceu no modelo de regressão múltipla como variável preditiva dos níveis globais de leucócitos encontrados em pacientes com FM. Este resultado

destaca o papel importante da IL-17 na fisiopatologia da FM e a coloca como um potencial alvo terapêutico. Entre os controles saudáveis, não houve associação entre leucócitos globais e níveis de IL-17, IL-23, MIP1-a e MCP-1. E, a regressão múltipla stepwise mostrou que os níveis de IL-23 e MCP-1 estão negativamente associados aos níveis globais de leucócitos encontrados em controles saudáveis. A diferença encontrada entre pacientes com FM e controles saudáveis quanto às variáveis que explicam o desfecho pode sugerir a presença de um padrão distinto de imunomodulação em pacientes com FM, mediada por células TH17 (PERNAMBUCO et al., 2013; KORN et al., 2009).

É importante notar que idade e IMC podem ser considerados fatores de alteração para leucócitos globais. No entanto, nem no grupo de pacientes com FM nem no grupo de controle saudável, essas variáveis não se correlacionaram com os níveis de leucócitos. Do mesmo modo, essas variáveis não permaneceram em nenhum dos modelos que explicam o resultado do estudo. Assim, a associação independente entre IL-17, independentemente da idade e do IMC em pacientes com FM, reforça a participação do sistema imunológico na fisiopatologia desta condição.

É necessário ressaltar que, apesar da limitação do número de pacientes, os resultados deste estudo devem ser considerados no momento do diagnóstico e/ou no momento de implementar a abordagem terapêutica para pacientes com FM, seja farmacológico ou não. Atualmente, o diagnóstico desta condição é essencialmente clínico (WOLFE; HAUSER, 2011; BAZZICHI et al., 2011) e o tratamento consiste na interação de várias classes de drogas, mesmo sem suporte científico para tal interação (MEASE et al., 2011).

## 6 CONCLUSÃO

Os níveis mais elevados de leucócitos globais, IL-17, IL-23, MIP-1a e MCP-1 em pacientes com FM e a associação positiva entre IL-17, IL-23 e global de leucócitos em pacientes com FM apoiam o envolvimento do sistema imunológico nesta condição. No momento do diagnóstico ou na tomada de decisão clínica, é importante considerar essa relação.

## REFERÊNCIAS

ABBADIE, C. Chemokines, chemokine receptors and pain. **Trends Immunol**, v. 26, p. 529-534, 2005.

ABDALLA, A.O. et al. Kinetics of cytokine gene expression in human CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets using quantitative real-time PCR. **Scand J Immunol**, v. 58, p. 601-606, 2003.

AHMED, M.; GAFFEN, S. L. IL-17 in obesity and adipogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 31, n. 6, p. 449-453, 2010.

AHRENS, C.; SCHILTENWOLF, M.; WANG, H. Cytokines in sychoneuroendocrineimmunological context of nonspecific musculoskeletal pain. **Schmerz**, v.26, p. 383–8, 2012.

AL-ALLAF, A.W.; OTTEWELL, L.; PULLAR, T. The prevalence and significance of positive antinuclear antibodies in patients with fibromyalgia syndrome: 2–4 years follow-up. **Clin Rheumatol**, v. 21, p.472–477, 2002.

AMSEN, D.; DE VISSER, K. E.; TOWN, T. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. **Methods Mol Biol**, v. 511, p.107–142, 2009.

ANG, D. C. et al. MCP-1 and IL-8 as pain biomarkers in fibromyalgia: A pilot study. **Pain Med**, v. 12, p.1154–1161, 2011.

BAZZICHI, L. et al. Fibromyalgia: A critical digest of the recent literature. **Clin Exp Rheumatol**, v. 29, p. S1–11, 2011.

BELLATO, E. et al. Fibromyalgia syndrome: Etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Pain Res Treatment**, v. 2012, p. 1-17, 2012.

BERNARDY, K. et al. Efficacy of cognitive-behavioral therapies in fibromyalgia syndrome – a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. **J Rheumatol**, v.37, n. 10, p. 1991–2005, 2010.

BOTE, M. E. et al. Inflammatory/ stress feedback dysregulation in women with fibromyalgia. **Neuroimmunomodulation**, v. 19, p. 343–351, 2012.

BRAZ, A. S. et al . Uso da terapia não farmacológica, medicina alternativa e complementar na fibromialgia. **Rev. Bras. Reumatol**, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 275-282, Jun 2011.

CALANDRE, E. P.; RICO-VILLADEMOROS, F. The role of antipsychotics in the management of fibromyalgia. **CNS Drugs**, v. 26, n. 2, p. 135-53, Feb 2012.

CARVALHO, L. S. et al. May genetic factors in fibromyalgia help to identify patients with differentially altered frequencies of immune cells? **Clin Exp Immunol**, v. 154, p. 346–352, 2008.

CASSISI, G.; SARZI-PUTTINI, P.; CAZZOLA, M. Chronic widespread pain and fibromyalgia: could there be some relationships with infections and vaccinations? **Clin Exp Rheumatol**, v. 29, p.118–126, 2011.

CHAITOW, L. **Síndrome da Fibromialgia**. Ed. Manole: São Paulo, 2002.

CHARO, I.F.; RANSOHOFF, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v.354, p. 610–621, 2006.

CHEN, D.Y. et al. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n.4, p. 1-10, 2011.

CHEN, Y. et al. Emerging tendency towards autoimmune process in major depressive patients: A novel insight from Th17 cells. **Psychiatry Res**, v. 188. p. 224–230, 2011.

CROFFORD, L.J. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 31, n.1, p. 1–13, 2002.

CUA, D.J.; TATO C.M. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 479–489, 2010.

CUA, D.J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v.421 p. 744–748, 2003.

DA COSTA, S. R. M. R. et al. Características de pacientes com síndrome da fibromialgia atendidos em hospital de Salvador-BA, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 15, n. 2, p. 64-70, 2005.

DADABHOY, D. et al. Biology and therapy of fibromyalgia. Evidence-based biomarkers for fibromyalgia syndrome. **Arthritis Res Ther**, v. 10, v. 4, 211, 2008.

DESHMANE, S.L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. **J Interferon Cytokine Res**, v.29, p.313–326, 2009.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v.118, p.503–8, 2000.

FERRACCIOLI, G. et al. Neuroendocrinologic findings in primary fibromyalgia (soft tissue chronic pain syndrome) and in other chronic rheumatic conditions (rheumatoid arthritis, low back pain). **Journal of Rheumatology**, v.17, n.7, p.869–873, 1990.

FERREIRA, A. M. et al. The effect of MCP-1 depletion on chemokine and chemokine-related gene expression: evidence for a complex network in acute inflammation. **Cytokine**, v. 30, n. 2, p. 64-71, Apr. 21, 2005.

FENG, J. et al. Missense mutations in the MEFV gene are associated with fibromyalgia syndrome and correlate with elevated IL-1beta plasma levels. **PLoS One**, v. 4, n. 12, e8480, 2009.

FONSECA, A. et al. Dados demográficos, epidemiológicos e clínicos de mulheres brasileiras climatéricas. **Casa Leitura Médica**, São Paulo, 2010.

FONSECA, A. C. S.; FARIA, P. C.; PERNAMBUCO, A. P. Comparação da eficácia de dois tratamentos não farmacológicos para pacientes com fibromialgia: Um estudo piloto. **Revista Conexão Ciência**, v. 11, n.1, p. 21-26, jun. 2016.

FRANCISCHETTI, I. et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia reperfusão. **Braz J Cardiovasc Surg**, v. 25, p.575-584, 2010.

GALLIMORE, A. M.; GODKIN, A. Epithelial barriers, microbiota, and colorectal cancer. **N Engl J Med**, v. 368, n.3, p.282-284, 2013.

GEISS, A.; ROHLEDER, N.; ANTON, F. Evidence for an association between an enhanced reactivity of interleukin-6 levels and reduced glucocorticoid sensitivity in patients with fibromyalgia. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n.5, p. 671–684, 2012.

GOLDENBERG, D. L.; BURCKHARDT, C.; CROFFORD, L. Management of fibromyalgia syndrome. **JAMA**, v. 292, p. 2388–2395, 2004.

GOLDENBERG, D. L. Fibromyalgia: why such controversy? **Ann Rheum Dis**, v. 54, n.1, p. 3-5, 1995.

GOLDENBERG, D.L. Multidisciplinary modalities in the treatment of fibromyalgia. **J Clin Psychiatry**, v.69, p. 30–34, 2008.

GOSER, S. et al. Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha in induction of experimental autoimmune myocarditis and effective anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy. **Circulation**, v. 112, p. 3400–3407, 2005.

HILLYER, P. et al. Investigating the role of the interleukin-23/-17A axis in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v.48, p.1581–1589, 2009.

HAACK, M.; SANCHEZ, E.; MULLINGTON, J.M. Elevated inflammatory markers in response to prolonged sleep restriction are associated with increased pain experience in healthy volunteers. **Sleep**, v.30, n.9, p.1145–52, 2007.

IZCUE, A. et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T Cell dependent colitis. **Immunity**, v. 28, p.559–570, 2008.

JUHL, J. H. Fibromyalgia and the serotonin pathway. **Alternative Medicine Review**, v. 3, n.5, p. 367–375, 1998.

KAGAMI, S. et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 5, p. 1373–1383, 2010

KAUFMANN, I. et al. Lymphocyte subsets and the role of TH1/ TH2 balance in stressed chronic pain patients. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, p. 272–280, 2007.

- KASTELEIN, R. A. et al. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. **Annual review of immunology**, v. 25, p. 221–242, 2007.
- KENDALL, S. A. et al. A pilot study of body awareness programs in the treatment of fibromyalgia syndrome. **Arthritis Care Res**, v. 13, p. 304–311, 2000.
- KIGUCHI, N.; KOBAYASHI, Y.; KISHIOKA, S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. **Curr Opin Pharmacol**, v. 12, p.55–61, 2012.
- KIM, C. F.; MOALEM-TAYLOR, G. Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice. **J Pain**, v. 12, p.370–383, 2011.
- KORN, T. et al. IL-17 and Th17 cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 485–517, 2009.
- KIM, Y. K.; MAES, M. The role of the cytokine network in psychological stress. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 15, p. 143–55, 2003.
- KOBAYASHI, T. et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gut**, v. 57, n.12, p.1682– 1689, 2008.
- KOTTER, I. et al. Is there a predisposition for the development of autoimmune diseases in patients with fibromyalgia? Retrospective analysis with long term follow-up. **Rheumatol Int**, v. 27, p. 1031–1039, 2007.
- KUCHROO, V. K. et al. Dysregulation of immune homeostasis in autoimmune diseases. **Nat Med**, v. 18, n. 1, p. 42–47, 2012.
- KURTUNCU, M. et al. Effect of short-term interferonbeta treatment on cytokines in multiple sclerosis: Significant modulation of IL-17 and IL-23. **Cytokine**, v. 59, p. 400–402, 2012.
- LITTLEJOHN, G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, p. 639–648, 2015.
- LIU, Y.; HO, R.C.; MAK, A. The role of interleukin (IL)-17 in anxiety and depression of patients with rheumatoid arthritis. **Int J Rheumat Dis**, v. 15, p. 183–187, 2012.
- LOCATI, M. et al. The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. **Allergy**, v. 57, n. 11, p. 972-82, 2002.
- LOCK, C. et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. **Nat Med**, v. 8, n. 5, p.500–508, 2002.
- LOWES, M. A. et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. **J Invest Dermatol**, v. 128, n.5, p.1207–1211, 2008.

LUSTER, A. D. Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v. 338, n. 7 p. 436-45, 1998.

MACEDO, J. A. et al. Adhesion molecules and cytokine expression in fibromyalgia patients: Increased I-selectin on monocytes and neutrophils. **J Neuroimmunol**, v. 188, p.159–166, 2007.

MALIN, K.; LITTLEJOHN, G. O. Rumination modulates stress and other psychological processes in fibromyalgia. **Eur J Rheumatol**, v. 2, n. 4, p. 143-148, 2015.

MEASE, P. J.; DUNDON, K.; SARZI-PUTTINI, P. Pharmacotherapy of fibromyalgia. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 25, p. 285–297, 2011.

MELGAREJO, E. Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, p. 998–1001, 2009.

MENG, X. et al. Spinal interleukin-17 promotes thermal hyperalgesia and NMDA NR1 phosphorylation in an inflammatory pain rat model. **Pain**, v.154, p. 294–305, 2013.

MIDDLETON, G.D. The prevalence and clinical impact of fibromyalgia in systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 37, n. 8, 1181–1188, 1994.

MIELIAUSKAITE, D. et al. Expression of IL-17, IL-23 and their receptors in minor salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. **Clin Dev Immunol**, 187258, 2012.

MILLIGAN, E.D.; WATKINS, L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n.1, p.23–36, 2009.

MILNER, J. D. IL-17 producing cells in host defense and atopy. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n.6, p. 784– 788, 2011.

MOHAMMAD, A. et al. Prevalence of fibromyalgia among patients with chronic hepatitis C infection: relationship to viral characteristics and quality of life. **J Clin Gastroenterol**, v. 46, n.5, p.407–12, 2012.

MOLNAR, I.; BOHATY, I.; SOMOGYINE-VARI, E. High prevalence of increased interleukin-17A serum levels in postmenopausal estrogen deficiency. **Menopause**, v. 21, p. 749–752, 2014.

MURPHY, C. A. et al. Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **J. Exp. Med**, v. 198, p. 1951–1957, 2003.

NASCIMENTO, M. L. P. Linfocitopenias: Valores normais para leucócitos totais e a relação com os monócitos. **NewsLab**, v. 86, 2008.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002.

NEECK, G. Neuroendocrine and hormonal perturbations and relations to the serotonergic system in fibromyalgia patients. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 29, n.113, p. 8–12, 2000.

NEESON, P.J. Lymphocytefacilitated tumour cell adhesion to endothelial cells: The role of high affinity leucocyte integrins. **Pathology**, v. 35, p. 50–55, 2003.

NISHIKAI, M. Autoantibodies to a 68/48 kDa protein in chronic fatigue syndrome and primary fibromyalgia: A possible marker for hypersomnia and cognitive disorders. **Rheumatology**, v.40, p.806–810, 2001.

OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, p.715–725, 2000.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**. v. 28, n.4, p.454–467, 2008.

PAUER, L. et al. Long-term maintenance of response across multiple fibromyalgia symptom domains in a randomized withdrawal study of pregabalin. **Clin J Pain**, v. 28, n.7, p. 609-14, 2012.

PERNAMBUCO, A. P. et al. Increased levels of IL-17A in patients with fibromyalgia. **Clin Exp Rheumatol**, v. 31, n. 6, p. 60-3, 2013.

PERNAMBUCO, A. P. et al. Involvement of Oxidative Stress and Nitric Oxide in Fibromyalgia Pathophysiology: A Relationship to be Elucidated. **Fibrom Open Access**, v. 1, n.1, p. 105, 2016.

REDONDO, J. R. et al. Long-term efficacy of therapy in patients with fibromyalgia: a physical exercise-based program and a cognitive-behavioral approach. **Arthritis Rheum**, v. 51, p.184–192, 2004.

RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. **Depression and Anxiety**, v. 121, p. 2–19, 2000.

RIOS-NAVARRO, C. et al. Differential effects of anti-TNF-alpha and anti-IL-12/23 agents on human leukocyte–endothelial cell interactions. **Eur J Pharmacol**, v. 765, p. 355–365, 2015.

ROMERO-SANCHEZ, C. et al. Association between Th-17 cytokine profile and clinical features in patients with spondyloarthritis. **Clin Exp Rheumatol** 29: 828–834, 2011.

ROHLEDER, N; ARINGER, M; BOENTERT, M. Role of interleukin-6 in stress, sleep, and fatigue. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1261, p. 88–96, 2012.

ROSENKILDE, M. M.; SCHWARTZ, T. W. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. **APMIS**, v. 112, n. 7-8, p. 481-95, 2004.

RUSSELL, I. J. Fibromyalgia syndrome: approach to management. **CNS Spectr**, v. 13, p. 27–33, 2008.

SARZI-PUTTINI, P. et al. Dysfunctional syndromes and fibromyalgia: A 2012 critical digest. **Clin Exp Rheumatol**, v. 30, p. 143–151, 2012.

SHANKAR, E. et al. High-fat diet activates pro-inflammatory response in the prostate through association of Stat-3 and NF-kappaB. **Prostate**, v. 72, p. 233–243, 2012.

SHERRY, B. et al. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. **J Exp Med**, v. 168, n. 6, p. 2251-9, 1988.

SMITH, H. S.; BRACKEN, D.; SMITH, J. M. Pharmacotherapy for Fibromyalgia. **Front Pharmacol**, v. 2: 17, 2011.

SNYDER-CAPPIONE, J. E. et al. A comprehensive ex vivo functional analysis of human NKT cells reveals production of MIP1-alpha and MIP1-beta, a lack of IL-17, and a Th1-bias in males. **PLoS One**, v.5, e15412, 2010.

SOUZA, E. et al . Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos de sangue periférico de pacientes com fibromialgia primária. **Rev Brasil Reumatol**, v. 43, p.337–342, 2003.

STURGEON, J. A. Proinflammatory cytokines and DHEA-S in women with fibromyalgia: Impact of psychological distress and menopausal status. **J Pain Res**, v. 7, p. 707–716, 2014.

SUMARAC-DUMANOVIC, M. et al. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. **Int J Obes**, v. 33, p. 151–156, 2009.

SUMPTON, J. E.; MOULIN, D. E. Fibromyalgia. **Handb Clin Neurol**, v. 119, p. 513-27, 2014.

SVENSSON, C. I. Interleukin-6: A local pain trigger? **Arthritis Res Ther**, v. 12, p. 145, 2010.

TERRY, R.; PERRY, R.; ERNST, E. An overview of systematic reviews of complementary and alternative medicine for fibromyalgia. **Clin Rheumatol**, v. 31, n. 1, p. 55-66, 2012.

THIEME, K.; TURK, D. C.; FLOR, H. Responder criteria for operant and cognitive-behavioral treatment of fibromyalgia syndrome. **Arthritis Rheum**, v. 57, p. 830–836, 2007.

TOGO, F. et al. Plasma cytokine fluctuations over time in healthy controls and patients with fibromyalgia. **Exp Biol Med**, v. 234, p. 232–240, 2009.

TOMIOKA, R.; MATSUI, M. Biomarkers for multiple sclerosis. **Intern Med**, v. 53, p. 361–365, 2014.

TOUSSIROT, E. The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. **Inflammat Allergy Drug Targets**, v. 11, p. 159–168, 2012.

TRINCHIERI, G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annu Rev Immunol**, v. 30 p. 677–706, 2012.

ÜCEYLER, N.; HÄUSER, W.; SOMMER, C. A systematic review on the effectiveness of treatment with antidepressants in fibromyalgia syndrome. **Arthritis Rheum**, v. 59, p.1279 – 1298, 2008.

ÜÇEYLER, N.; HÄUSER, W.; SOMMER, C. Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome. **BMC Musculoskelet Disord**, v.12, p. 245, 2011.

WALLACE, D. J. et al. Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilotstudy. **Rheumatology**, v.40, p.743–9, 2001.

WALITT, B. et al. The Prevalence and Characteristics of Fibromyalgia in the 2012 National Health Interview Survey. **Plos One**, v. 10, n. 9, p.1-16, 2015.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Spinal cord glia: new players in pain. **Pain**, v. 93, n. 3, p. 201–205, 2001.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, v. 2, p. 139–155, 2005.

WELSBY, I.; GORIELY, S. Regulation of interleukin-23 expression in health and disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 941, p. 167–189, 2016.

WHITE, F. A.; FELDMAN, P.; MILLER, R. J. Chemokine signaling and the management of neuropathic pain. **Mol Interv**, v. 9, p. 188–195, 2009.

WIERWILLE, L. Fibromyalgia: diagnosing and managing a complex syndrome. **J Am Acad Nurse Pract**, v. 24, n. 4, p. 184-92, 2012

WOLFE, F. et al. Fibromyalgia prevalence, somatic symptom reporting, and the dimensionality of polysymptomatic distress: results from a survey of the general population. **Arthritis Care and Research**, v. 65, n.5, p. 777-85, 2013.

WOLFE, F.; HAUSER, W. Fibromyalgia diagnosis and diagnostic criteria. **Ann Med**, v. 43, p. 495–502, 2011.

WOLFE, F.; MICHAUD, K. Severe rheumatoid arthritis (RA), worse outcomes, comorbid illness, and sociodemographic disadvantage characterize RA patients with fibromyalgia. **Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 4, p. 695–700, 2004.

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, 2011.

WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 62, n. 5, p. 600-10, 2010.

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, 1990.

YASUI, T. et al. Interleukin-7 is associated with monocyte chemoattractant protein-1 and soluble E-selectin levels in peripheral blood of newly post-menopausal women. **J Reprod Immunol**, v. 81, p. 97–102, 2009.

YIGIT, S. et al. Association between fibromyalgia syndrome and polymorphism of the IL-4 gene in a Turkish population. **Gene**, v. 527, n. 1, p. 62-4, 2013.

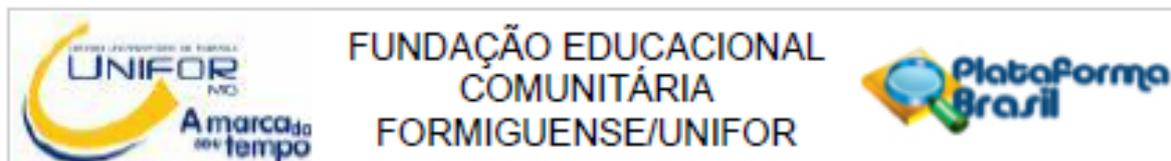
YOSHIZAKI, A. et al. Elevated serum interleukin-27 levels in Autoimmune changes in fibromyalgia patients with systemic sclerosis: Association with T cell, B Cell and fibroblast activation. **Ann Rheumat Dis**, v. 70, p. 194–200, 2011.

ZHANG, L. et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v. 7, e31000, 2012.

ZHANG, Z. et al. High plasma levels of MCP-1 and eotaxin provide evidence for an immunological basis of fibromyalgia. **Exp Biol Med**, v. 233, p.1171–1180, 2008.

ZHOU, L. et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol**, v. 8, p.967–974, 2007.

## ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Pode a fibromialgia ser considerada uma doença autoimune?

**Pesquisador:** Andrei Pereira Pemambuco

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 16341613.0.0000.5113

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO EDUCACIONAL COMUNITARIA FORMIGUENSE

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO EDUCACIONAL COMUNITARIA FORMIGUENSE

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 332.004

**Data da Relatoria:** 11/07/2013

**Apresentação do Projeto:**

Pode a fibromialgia ser considerada uma doença autoimune?

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo primário:**

Avaliar as concentrações de alguns biomarcadores da autoimunidade entre portadores da síndrome da fibromialgia e a influência destes sobre o comportamento das células sanguíneas.

**Objetivos secundários:**

- 1) Avaliar os níveis de IL-17A presentes no plasma de portadores de fibromialgia e controles saudáveis;
- 2) Avaliar os níveis de IL-23 presentes no plasma de portadores de fibromialgia e controles saudáveis;
- 3) Avaliar os níveis de IgG presentes no plasma de portadores de fibromialgia e controles saudáveis;
- 4) Avaliar os níveis de MIP-3- presentes no plasma de portadores de fibromialgia e controles saudáveis;
- 5) Avaliar os níveis de MCP-1 presentes no plasma de portadores de fibromialgia e controles

**Endereço:** Avenida Dr. Arnaldo de Senna, 328

**Bairro:** Água Vermelha

**CEP:** 35.570-000

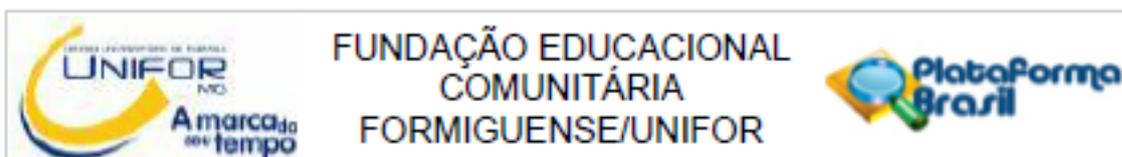
**UF:** MG

**Município:** FORMIGA

**Telefone:** (37)3329-1438

**Fax:** (37)3322-4747

**E-mail:** comitedeetica@uniforg.edu.br



Continuação do Parecer: 332.004

saudáveis;

- 6) Avaliar os níveis de C3 presentes no plasma de portadores de fibromialgia e controles saudáveis;
- 7) Avaliar o número absoluto de células (hemácias, plaquetas e leucócitos) no sangue total de portadores de fibromialgia e controles saudáveis;
- 8) Avaliar a correlação entre as variáveis supracitadas.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Foi ressaltado que serão tomados todos os cuidados necessários para minimizar os riscos ocasionais, durante a coleta da amostra de sangue dos pacientes - dor, hematoma e/ou infecção.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os resultados deste estudo poderão contribuir para a melhora da compreensão da etiologia da fibromialgia, sobretudo, no que se refere à participação do sistema imune nesta condição. O conhecimento aumentado sobre os mecanismos envolvidos na gênese e evolução da fibromialgia, poderá servir como ponto de partida para a criação de novos tratamentos, incluindo fármacos, que possam ser mais eficientes no combate a fibromialgia, amenizando ou curando seus sintomas, evitando o aumento de sua prevalência e de gastos públicos e privados dela decorrentes.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Nos critérios de inclusão, foi sanado pelo pesquisador como será realizado o diagnóstico da fibromialgia e, na metodologia do projeto foi incluído o teste de correlação de Pearson para análise dos dados paramétricos

#### **Recomendações:**

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências levantadas na análise anterior foram sanadas pelo pesquisador.

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

#### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Avenida Dr. Amaldo de Senna, 328  
 Bairro: Água Vermelha CEP: 35.570-000  
 UF: MG Município: FORMIGA  
 Telefone: (37)3329-1438 Fax: (37)3322-4747 E-mail: comitedeetica@unifor.br

**APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_, de nacionalidade \_\_\_\_\_, atualmente com \_\_\_\_\_ anos de idade, estado civil \_\_\_\_\_, profissão \_\_\_\_\_, residente \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ e portador do RG \_\_\_\_\_, estou sendo convidado pelo pesquisador responsável a participar de um estudo denominado “Pode a fibromialgia ser considerada uma doença autoimune?”, cujos objetivos são: avaliar as concentrações de alguns biomarcadores da autoimunidade entre portadores da síndrome da fibromialgia e a influência destes sobre o comportamento das células sanguíneas.

A minha participação no referido estudo será no sentido de colaborar voluntariamente, fornecendo amostras de sangue, além de informações referentes aos aspectos comportamentais ao responder aos questionários propostos. Fui alertado de que, posso esperar alguns benefícios, tais como: melhora da saúde e dos aspectos relacionados à saúde, tais como alívio das dores, redução da ansiedade, melhora na qualidade do sono, redução da fadiga e melhora nos padrões de enfrentamento da doença, já que os pesquisadores realizarão palestras para as voluntárias com este intuito.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Desta forma também há a possibilidade de não se obter qualquer resultado positivo, entretanto a possibilidade de ocorrer riscos ou desconfortos é mínima já que se trata de um estudo observacional.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Fui informado que o pesquisador e responsável pelo referido projeto é Andrei Pereira Pernambuco, vinculado ao Centro Universitário de Formiga – MG. Estou ciente que com ele poderei manter contato pelos telefones: (37) 3241-9201 (Itaúna – MG) / (37) 9905-9495 (Celular Formiga – MG), ou ainda poderei contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do UNIFOR-MG pelo telefone (37) 3229-1400.

Sei que minha assistência será assegurada durante toda pesquisa, bem como me foi garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, afinal, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

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

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de depósito em conta-corrente. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Desta forma, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, dato e assino este termo de consentimento livre e esclarecido.

Formiga ,..... de ..... de 2013.

---

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

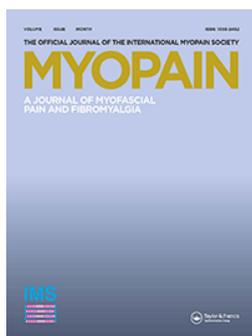
---

Assinatura do pesquisador responsável pela obtenção  
do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

---

Andrei Pereira Pernambuco  
Pesquisador responsável

## APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO

**MYOPAIN**

**A journal of myofascial pain and fibromyalgia**

ISSN: 2470-8593 (Print) 2470-8607 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/imup21>

## Increased Levels of IL-17, IL-23, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 and Global Leukocytes in Fibromyalgia Patients

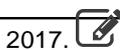
**Andrei Pereira Pernambuco, Angélica Cristina Sousa Fonseca, Gabriella Luciana de Oliveira, Priscila Conceição Faria, Raimisson Vieira Silva, Cecília Meireles, Saulo Elyas Arantes, Fernanda Cristina Silva & Débora d'Ávila Reis**

**To cite this article:** Andrei Pereira Pernambuco, Angélica Cristina Sousa Fonseca, Gabriella Luciana de Oliveira, Priscila Conceição Faria, Raimisson Vieira Silva, Cecília Meireles, Saulo Elyas Arantes, Fernanda Cristina Silva & Débora d'Ávila Reis (2017): Increased Levels of IL-17, IL-23, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 and Global Leukocytes in Fibromyalgia Patients, MYOPAIN, DOI: [10.1080/24708593.2017.1357664](https://doi.org/10.1080/24708593.2017.1357664)

**To link to this article:** <http://dx.doi.org/10.1080/24708593.2017.1357664>



Published online: 02 Aug



2017. Submit your article



to this journal



View related articles



View Crossmark

CrossMark

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=imup21>

---

ARTICLES

---



## Increased Levels of IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1 and Global Leukocytes in Fibromyalgia Patients

Andrei Pereira Pernambuco, <sup>PHD</sup> 1,2,3, Angélica Cristina Sousa Fonseca<sup>1</sup>,  
 Gabriella Luciana de Oliveira<sup>1</sup>, Priscila Conceição Faria<sup>1</sup>, Raimisson Vieira Silva<sup>1</sup>,  
 Cecília Meireles<sup>1</sup>, Saulo Elyas Arantes<sup>1</sup>, Fernanda Cristina Silva<sup>1</sup>, and Débora d'Ávila Reis, <sup>PHD</sup> 2

<sup>1</sup>CEPEP, Centro Universitário de Formiga, Formiga, Brazil, <sup>2</sup>Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil and <sup>3</sup>Universidade de Itau'na, Itau'na, Minas Gerais, Brazil

### ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate and compare the blood leukocytes and plasmatic levels of cytokines [IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1] found in patients with fibromyalgia [FM] and healthy controls.

**Methods:** Forty-four women with FM and 28 healthy women matched by age and Body Mass Index [BMI] participated in this study. The white blood cell count was determined by the complete blood count [CBC]. The plasmatic levels of cytokines were determined by enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]. The statistical analysis was performed by means of the Kolmogorov–Smirnov test for data distribution, the Mann–Whitney test or independent *t*-test to test for intergroup differences, Spearman's correlation test for association between the variables and stepwise multiple regression to select the independent predictive variables. The tests were performed in SPSS v.19 (SPSS Inc., Chicago, IL), with significance level set to a 0.05.

**Results:** Patients with FM had significantly higher levels of global leukocytes, IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 than healthy controls. The absolute number of global leukocytes is directly and positively correlated with plasmatic levels of IL-17 and IL-23 in FM patients. IL-17 was the only variable selected in the prediction model of leukocyte levels in FM patients.

**Conclusions:** The higher levels of global leukocytes, IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 showed by FM patients support the involvement of the immune system in the pathophysiology of this condition. The association between high levels of global leukocytes with high plasmatic levels of cytokines, mainly IL-17, in FM patients should be considered during the FM's diagnosis and clinical decision making.

**KEYWORDS:** fibromyalgia, leukocytes, pathophysiology, immune response, inflammation

### INTRODUCTION

Fibromyalgia [FM] is a rheumatic condition manifested by about 2.5% of the population, and which mainly affects women, at a ratio of up to nine women to every man (1). FM is characterized by chronic pain [longer than three months], generalized [right and left side of the body, above and below the average waistline and at least one point of the axial skeleton] (2). In addition to pain, several other symptoms comprise the clinical picture of FM, among them, are: fatigue, depression, irritable bowel

syndrome, poor quality sleep, headaches, cognitive disturbances and morning stiffness. However, a manifestation of these symptoms can widely vary between patients (2,3).

The clinical heterogeneity presented by patients with FM is a factor that hinders the diagnosis of this condition, which it has been made solely by clinical form so far, and currently there has been no biomarker for this condition (1). Moreover, ample manifestation and complexity of FM symptoms suggest a multifactorial etiology for this condition, after all, a single

---

etiologic factor is unable to explain the diversity of the symptoms shown by patients. Thus, it has become consensus that genetic alterations, cognitive behavioral, neuroendocrine and immunological seem to interact resulting in the genesis and evolution of the clinical picture of the FM (4).

In turn, the involvement of the immune system in FM syndrome is a frequent target of studies (4–10). Although in some instances, these are contradictory and inconclusive, in most of the cases they support the participation of immune response in onset and perpetuation of the symptoms shown by patients with FM (4,5). The determination of the involvement of the immune response in the pathophysiology of FM is relevant mainly for the fact that, currently drug therapy for this condition consists mainly of tricyclic antidepressants [amitriptyline and nortriptyline], other antidepressants [duloxetine, milnacipran, venlafaxine, citalopram, fluoxetine and paroxetine], muscle relaxants [cyclobenzaprine], anticonvulsants [pregabalin and gabapentin], pain relievers [acetaminophen], nonsteroidal anti-inflammatory drugs [aspirin, ibuprofen and naproxen], that even working together do not promote full remission of the symptoms (11,12).

Given this context, the aim of this study was to seek evidence to support a possible role of immune activity in the pathophysiology of FM. For this purpose was conducted a comparative analysis of white blood cells [WBC] values, and plasma levels of: interleukin 17 [IL-17], interleukin 23 [IL-23], macrophage inflammatory protein 1a [MIP-1a] and monocyte chemotactic protein [MCP-1] found in FM patients diagnosed according to American College of Rheumatology criteria (2) and healthy controls, matched for gender, age and body mass index [BMI].

## MATERIALS AND METHODS

### Ethical considerations

This study was initiated after approval of the research project by the Ethics Committee of Centro Universitário de Formiga - MG (UNIFOR- MG) through the approval number 332.004. All procedures adopted are in line with the Declaration of Helsinki. For participation in the study volunteers signed an instrument of consent for participating in the study.

### Type of study

This study is observational, retrospective and cross-sectional study with control group use.

### Participants

After the active encouragement of voluntary through advertisements in newspapers, disclosure in Basic Health Care Units, the sampling was done by convenience, and the first 44 women with FM and the first 28 healthy women who met the criteria for inclusion and exclusion were included in the study. The women previously diagnosed with FM underwent a medical screening to confirm the diagnosis by a specialist who used the criteria of the American College of Rheumatology 2011 (2).

### Inclusion and exclusion criteria

To participate in the study patients with FM should have: FM diagnosis for more than two years, have the diagnosis confirmed by a medical specialist, aged between 25 and 60 years, BMI below 30 kg/m<sup>2</sup>, stopping treatment with anti-inflammatory drugs at least 30 days before data collection [painkillers and muscle relaxants were allowed], not introduced to any new drug in the month before data collection and have signed the instrument of consent.

Prevented from participating in the study were those who: did not sign the consent form, those who violated the data collection protocol, those that were introduced to new drugs in the month before data collection, those who used anti-inflammatory steroid and non-steroids in the last 30 days, pregnant women or nursing mothers, women with active systemic inflammatory diseases, women with malignancy and women already diagnosed with major depressive disorders.

To compose the control group, were selected healthy women with a BMI and age similar to that of patients with FM. The same inclusion and exclusion were adopted for healthy women, besides the fact that they could not have any medical condition diagnosed in the last three months.

### Data collection

Five milliliters of peripheral blood was obtained by puncture of the brachial vein using ethylenediamine tetraacetic acid [EDTA] as the anticoagulant. The blood collection was performed in a clinical laboratory. The same laboratory performed the blood cell count tests, according to the standard protocol.

The levels of IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 in plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA] according to the manufacturer's recommendation. IL-17 [Uscn Life Science Inc., Wuhan, PR China], the limit of detection of the assay was 5.9 pg/ml; IL-23 [Abcam, San Francisco, CA], the sensitivity of the assay was 20 pg/ml;

MIP-1a [Uscn Life Science Inc., Wuhan, PR China], 5.9 pg/ml and; MCP-1 [Abcam, San Francisco, CA], the sensitivity of the assay was 2 pg/ml. In all the cases, the coefficient of variation intra-assay and inter-assay were 510% and 512%, respectively. The ELISA technique has ensured reliability and validity

for the detection of cytokines, the results obtained by this technique are similar to those obtained by real-time quantitative polymerase chain reaction [Q-PCR], high-performance liquid chromatography [HPLC] and cytokine bead array [CBA] (13).

#### Statistical analysis of the data

The Kolmogorov–Smirnov test was used to evaluate the distribution of the data. The Mann–Whitney test was used for intergroup analysis when the data had abnormal distribution and, independent *t*-test was used when the data had normal distribution. The correlations between the variables were performed using Spearman’s correlation test. Stepwise multiple regression was used to select the independent relationship between global leucocytes and predictive variables. The adjustments were made in order to control variables that are potential confounders for leukocyte levels. All tests were performed in IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0 [Armonk, NY], and the level of significance was of 5% [ $\alpha \leq 0.05$ ]. The results were represented by mean  $\pm$  standard deviation [SD], and 95% CI. For improving the visualization of the results, these were presented in graphs and tables.

## RESULTS

The sociodemographic characteristics of the participants at the baseline demonstrate the similarity between the members of the two groups [Table 1].

Results of the Mann–Whitney test or independent *t*-test for the differences between groups in sociodemographic variables. The results are expressed in mean  $\pm$  SD and 95% confidence interval [95% CI].

The results of this study demonstrate that there is no significant difference between healthy controls

and patients with FM regarding with the absolute or relative number of: erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, myelocytes, metamyelocytes, rod cells, segmented cells, eosinophils, basophils, typical lymphocytes, monocytes, atypical lymphocytes and platelets [Table 2].

Results of the Mann–Whitney test or independent *t*-test for the differences between groups in different variables were analyzed in the study. The results are expressed in mean  $\pm$  SD and 95% confidence interval [95% CI],  $**p \leq 0.01$ .

However, the findings demonstrate that global number of leukocytes per  $\text{mm}^3$  of blood in FM patients is significantly higher than that found in healthy women [ $p \leq 0.002$ ]. In the group of women with FM, the median was 7150 cells/ $\text{mm}^3$ , and among the healthy women, the median found was 6200 cells/ $\text{mm}^3$  [Figure 1]. The median values found in patients with FM are 12.67% and the mean values are 18.71% higher than the values found in healthy women.

In relation to the plasmatic levels of cytokines: IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1, the data show that the plasma levels of all these cytokines are significantly different among FM patients and healthy controls [Table 3].

Results of the Mann–Whitney test or independent *t*-test compared to the differences between groups in different cytokines were analyzed in the study. The results are expressed in mean  $\pm$  SD and 95% confidence interval [95% CI].  $*p \leq 0.05$  and  $**p \leq 0.01$ .

The intergroup analyses revealed that the levels of IL-17 [ $p \leq 0.001$ ], IL-23 [ $p \leq 0.0373$ ], MIP-1a [ $p \leq 0.0383$ ] and MCP-1 [ $p \leq 0.001$ ] are significantly higher in FM patients than in healthy controls, matched for gender, age and BMI [Figure 2].

The analysis of correlation between the absolute number of global leukocytes per  $\text{mm}^3$  of blood and the plasma levels of cytokines [IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1], age and BMI in patients with FM have shown that the absolute number of global leukocytes per  $\text{mm}^3$  of blood is associated significantly and

TABLE 1. Sociodemographic characteristics of FM patients and healthy controls at the baseline.

| Variables | FM patients [N = 44]          |             | Healthy controls [N = 28]     |             | p Value |
|-----------|-------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------|---------|
|           | Mean $\pm$ standard deviation | 95% CI      | Mean $\pm$ standard deviation | 95% CI      |         |
| Age       | 43.75 $\pm$ 8.19              | 41.26–46.24 | 45.54 $\pm$ 4.51              | 43.78–47.29 | 0.29    |
| Weight    | 70.70 $\pm$ 9.43              | 67.84–73.57 | 69.79 $\pm$ 4.59              | 68.00–71.57 | 0.89    |
| Height    | 1.65 $\pm$ 0.05               | 1.63–1.66   | 1.64 $\pm$ 0.04               | 1.62–1.66   | 0.79    |
| BMI       | 25.85 $\pm$ 2.34              | 25.13–26.56 | 25.80 $\pm$ 1.94              | 25.05–26.55 | 0.93    |

Results of Mann-Whitney test or T Independent test for the differences between groups in sociodemographic variables. The results are expressed in mean  $\pm$  standard deviation and 95% confidence interval (95% CI).

TABLE 2. Complete blood count [CBC] of FM patients and healthy controls.

| CBC  | FM patients [N ¼ 44]      |               | Healthy controls [N ¼ 28] |               | p Value |
|--|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------|
|  | Mean ± standard deviation | 95% CI        | Mean ± standard deviation | 95% CI        |         |
| Erythrocyte [millions/mm <sup>3</sup> ]    | 4.48±0.31                 | 4.39–4.58     | 4.35±0.36                 | 4.21–4.49     | 0.10    |
| Hemoglobin [g/dl]                          | 12.80±0.87                | 12.53–13.07   | 12.50±0.84                | 12.17–12.83   | 0.12    |
| Hematocrit [%]                             | 38.97±2.53                | 38.20–39.74   | 38.18±2.83                | 37.08–39.28   | 0.15    |
| Global leukocytes [cells/mm <sup>3</sup> ] | 7356±1916                 | 6735–7977     | 5979±1053                 | 5534–6424     | 0.002** |
| Myelocytes [%]                             | 0.0±0.0                   | ...           | 0.0±0.0                   | ...           | ...     |
| Metamyelocytes [%]                         | 0.0±0.0                   | ...           | 0.0±0.0                   | ...           | ...     |
| Rod cells [%]                              | 0.38±0.65                 | 0.18–0.58     | 0.28±0.46                 | 0.10–0.46     | 0.75    |
| Segmented cells [%]                        | 67.32±7.54                | 65.03–69.61   | 64.71±5.08                | 62.74–66.69   | 0.11    |
| Eosinophils [%]                            | 0.90±0.98                 | 0.54–1.38     | 1.14±0.65                 | 0.89–1.39     | 0.09    |
| Basophils [%]                              | 0.0±0.0                   | ...           | 0.0±0.0                   | ...           | ...     |
| Typical lymphocytes [%]                    | 29.45±7.14                | 27.28–31.63   | 31.57±4.30                | 29.90–33.24   | 0.16    |
| Monocytes [%]                              | 1.93±0.97                 | 1.63–2.22     | 2.10±0.78                 | 1.80–2.41     | 0.21    |
| Atypical lymphocytes [%]                   | 0.0±0.0                   | ...           | 0.0±0.0                   | ...           | ...     |
| Platelets [cells/mm <sup>3</sup> ]         | 307909±67320              | 287442–328376 | 300857±61315              | 277081–324633 | 0.65    |

Results of Mann-Whitney test or T Independent test for the differences between groups in different variables analyzed in the study. The results are expressed in mean ± standard deviation and 95% confidence interval (95% CI). \*\* $p \leq 0.01$ .

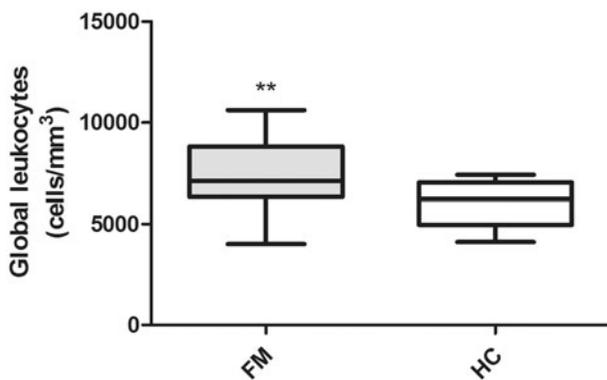


FIGURE 1. Boxplot comparing the absolute number of global leukocytes per mm<sup>3</sup> found in blood of FM patients [FM] and healthy controls [HC]. The gray box represents the FM patients and white box the healthy controls. \*\* $p \leq 0.01$ .

positively with serum levels of IL-17 [ $r \ 0.52$  and  $p \ 0.002$ ] and IL-23 [ $r \ 0.40$  and  $p \ 0.018$ ]. The other variables showed no statistically significant relationship with the number of white cells per mm<sup>3</sup> of blood [Table 4].

Correlation matrix between the absolute number of global leukocytes and plasmatic levels of IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1, age and BMI was found in FM patients. The test performed to the analysis was the Spearman correlation test.  $*p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$ .

Among the healthy controls, the levels of global leukocytes per mm<sup>3</sup> of blood were not correlated with the plasmatic levels of IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1, age or BMI [Table 5].

Correlation matrix between the absolute number of global leukocytes and plasmatic levels of IL-17,

IL-23, MIP-1a and MCP-1 was found in healthy controls. The test performed to the analysis was the Spearman correlation test.

Finally, the multiple stepwise regression analysis showed that in the group of FM patients, among all possible models tested a single model [ $R_a^2 \ 41.6\%$ ] containing only the explanatory variable IL-17 was generated. This variable remained independently associated with global leukocyte levels. In this model, for each increase of 1 pg/mL of the IL-17, an average increase of 38.54 cells/mm<sup>3</sup> was noted in global leukocytes levels. In the control group, among all models tested, two models were generated: Model A [ $R_a^2 \ 35.7\%$ ] containing only the IL-23, this cytokine was independently associated with global leukocyte levels. In this model, for each increase of 1 pg/mL of IL-23 was observed an average reduction of 71.52 cells/mm<sup>3</sup> in the global leukocytes levels. Model B [ $R_a^2 \ 63.6\%$ ] was composed of the explanatory variables IL-23 and MCP-1, which were independently associated with the global leukocyte levels. In this model, each increase of 1 pg/ml of IL-23 represents an average decrease of 97.77 cells/mm<sup>3</sup> and, each increase of 1 pg/ml of MCP-1 an average of a decrease of 43.95 cells/mm<sup>3</sup> in the global leukocytes. In none of the groups, the variables MIP-1a, age and BMI were associated with the global leukocyte levels [Table 6].

All the explanatory variables [IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1, age and BMI] were inserted into stepwise multiple regression to identify the best predictors for the outcome variable [global leukocytes]. In the group of patients with FM – Model A: IL-17 and in the group of healthy controls – Model

TABLE 3. Levels of cytokines in FM patients and healthy controls.

| Cytokine | FM patients [N ¼ 44]      |               | Healthy controls [N¼ 28]  |               | p Value       |
|----------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------|
|          | Mean ± standard deviation | 95%CI         | Mean ± standard deviation | 95%CI         |               |
| IL-17    | 50.00 ± 35.63             | 37.95–62.06   | 21.17 ± 8.53              | 17.56–24.77   | 50.0001*<br>* |
| IL-23    | 155.10 ± 13.16            | 150.08–159.40 | 142.7 ± 7.96              | 139.40–145.90 | 0.0373*       |
| MIP-1a   | 78.00 ± 20.47             | 70.74–85.25   | 67.07 ± 20.95             | 57.78–76.36   | 0.0383*       |
| MCP-1    | 27.98 ± 14.13             | 23.20–32.76   | 18.02 ± 12.12             | 12.90–23.14   | 50.0001*<br>* |

Results of Mann-Whitney test or T Independent test compared to the differences between groups in different cytokines analyzed in the study. The results are expressed in mean ± standard deviation and 95% confidence interval (95% CI). \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ .

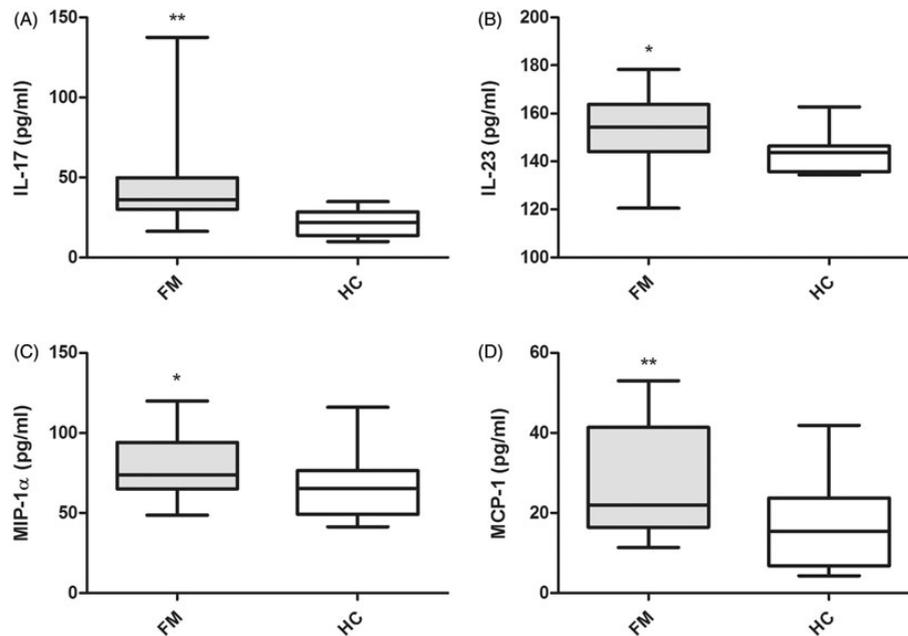


FIGURE 2. Boxplot comparing the plasmatic levels of cytokines found in FM patients [FM] and healthy controls [HC]. The gray boxes represent the FM patients and white boxes the healthy controls. [A] Levels of IL-17; [B] levels of IL-23; [C] levels of MIP-1a and [D] levels of MCP-1. \* $p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$ .

TABLE 4. Correlation matrix between global leukocytes, age, BMI and cytokines in FM patients.

|                   |                         | Global leukocytes | IL-17   | IL-23  | MIP1-a | MCP-1 | Age    | BMI   |
|-------------------|-------------------------|-------------------|---------|--------|--------|-------|--------|-------|
| Global leukocytes | Correlation coefficient | 1.000             | 0.520** | 0.403* | 0.300  | 0.112 | -0.166 | 0.037 |
|                   | p Value                 | –                 | 0.002   | 0.018  | 0.113  | 0.550 | 0.311  | 0.825 |

Correlation matrix between the absolute number of global leukocytes and plasmatic levels of IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1, age and BMI in FM patients. The test performed to the analysis was the Spearman correlation test. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ .

A: IL-23 and Model B: IL-23, MCP-1 were selected among all possible models. \*\* $p \leq 0.01$ .

## DISCUSSION

Some evidences point out to an important role in the immune system in manifestation and/or perpetuation of various symptoms experienced by patients

with FM (4–6). After all, it is known that the immune response is a highly particular phenomenon, which varies greatly from character and intensity in different individuals and therefore could contribute to clinical variability presented by these patients (14). In this regard, it is believed that the immune system can be a key to be considered during the diagnosis of FM and during the process

TABLE 5. Correlation matrix between global leukocytes, age, BMI and cytokines in healthy controls.

|                   |                         | Global leukocytes | IL-17 | IL-23  | MIP1-a | MCP-1  | Age    | BMI   |
|-------------------|-------------------------|-------------------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Global leukocytes | Correlation coefficient | 1.000             | 0.016 | -0.169 | -0.302 | -0.166 | -0.035 | 0.336 |
|                   | <i>p</i> Value          | –                 | 0.947 | 0.464  | 0.195  | 0.485  | 0.870  | 0.109 |

Correlation matrix between the absolute number of global leukocytes and plasmatic levels of IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 found in healthy controls. The test performed to the analysis was the Spearman correlation test.

TABLE 6. Multiple regression to assess the independent relationship between explanatory variables and global leukocyte levels.

| FM patients [N¼44] |             |          |               |                              | Healthy controls [N¼28] |          |          |                              |       |
|--------------------|-------------|----------|---------------|------------------------------|-------------------------|----------|----------|------------------------------|-------|
| Global leukocytes  |             |          |               |                              | Global leukocytes       |          |          |                              |       |
|                    | $\emptyset$ | <i>p</i> | 95% CI        | R <sup>2</sup> <sub>aj</sub> |                         | <i>p</i> | 95% CI   | R <sup>2</sup> <sub>aj</sub> |       |
| Model A            | 38.540      | ≤0.001** | 22.331–54.749 | 0.516                        | Model A                 | –71.528  | 0.011**  | –123.72 to –19.32            | 0.357 |
| IL-17              |             |          |               |                              | IL-23                   |          |          |                              |       |
|                    |             |          |               |                              | Model B                 | –97.772  | ≤0.001** | –140.94 to –54.60            | 0.636 |
|                    |             |          |               |                              | IL-23                   |          |          |                              |       |
|                    |             |          |               |                              | MCP-1                   | –43.956  | 0.006**  | –72.83 to –15.07             |       |

All the explanatory variables (IL-17, IL-23, MIP-1a, MCP-1, age and BMI) were inserted into stepwise multiple regression to identify the best predictors for the outcome variable (global leukocytes). In the group of patients with FM - Model A: IL-17 and in the group of healthy controls - Model A: IL-23 and Model B: IL-23, MCP-1 were selected among all possible models. \*\**p*≤0.01.

of clinical decision making by professionals who deal with FM syndrome.

In this study, the group of patients with FM and the group of healthy controls did not differ significantly in relation to sex, age, weight, height and BMI. Only women were recruited for this study, because the FM affect up to nine women for every man (11). In both groups, the average age of women exceeded 42 years. In Brazil, the premenopausal phase begins at around 42 years old, period of full physical, mental and labor activity (15). Importantly, this study did not evaluate whether the women had entered or not in the climacteric period. If we consider only the average age at which menopause occurs among Brazilian women, 48.1 years old (15), about 32% of women in the FM group and 36% of participants in the HC group are already in menopause. This similarity between the groups is important since high levels of IL-17 have been shown in postmenopausal estrogen deficiency women (16), as well as high levels of MCP-1 (17). Regarding BMI, participants in both groups were overweight. It is known that the BMI is directly associated with higher levels of inflammatory cytokines (18). In this study, we did not include women who have been diagnosed with major depression disorders, autoimmune and inflammatory diseases, malignancy and who used anti-inflammatory drugs. After all, these conditions can interfere directly in the inflammatory cytokines levels (5,19). The similarity between the groups reduces the occurrence of bias and makes the findings even more relevant.

The findings of this study showed significantly higher levels of global leukocytes, IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 in patients with FM compared to healthy controls. The mean global leukocytes found in patients with FM were  $7356 \pm 1916$  cells per  $\text{mm}^3$ . According to the readings, only values of leukocytes greater than  $11.000$  per  $\text{mm}^3$  can be described as leukocytosis (14). Therefore, it is important to note that the patients in this study did not show typical picture of leukocytosis. However, the significant difference found between FM patients and healthy controls cannot be ignored, as this may be signaling the presence of a low potential immune response in these patients (14,20).

In this study, the average global leukocytes was significantly higher in patients with FM than that in healthy controls. The study of Carvalho et al. who also evaluated Brazilian FM patients did not corroborate the data presented here. In the mentioned study, the authors showed a marginal high levels in FM patients, but no significant differences between FM patients and the healthy controls was observed (4). The same outcome found by Carvalho et al. could also be seen in the results of Souza et al. (21). However, the present study results are corroborated by Macedo et al., the authors found not only a significant increase in the recruitment of leukocytes in patients with FM, but also, provided evidence of a significant increase in adhesion of leukocytes in FM patients (22).

Besides the significant difference between controls and patients with regard to the global leukocytes,

this study also showed that the remaining variables [erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, myelocytes, metamyelocytes, rod cells, segmented cells, eosinophils, basophils, typical lymphocytes, monocytes, lymphocytes atypical and platelets] did not differ significantly between the two groups. These findings corroborate with other studies (4,21). However, the lack of statistical significance cannot mask the potential clinical importance of marginal increases observed in FM patients in almost all the variables analyzed in this study. This slight increase when viewed in the light of more sophisticated techniques such as, confocal microscopy, the polymerase chain reaction [PCR] or flow cytometry, among others, can reveal important data omitted during the examination of blood test. These techniques can identify the presence of cell subsets based on specific markers in the surface and/or cellular interior (4,23,24). This hypothesis is supported by the results of Carvalho et al. who did not find significant changes in blood leukocytes of patients with FM compared to controls, but by analyzing subpopulations of immune cells by flow cytometry showed that the activated cells subpopulations was significantly higher in patients with FM (4). The data of this study do not allow us to confirm the above findings, since subpopulations of immune cells were not analyzed in the present study.

This study also demonstrated a significant increase in plasma levels of IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 in patients with FM. All of these cytokines have high pro-inflammatory potential since they induce the expression of other cytokines, chemokines and metalloproteinases (25–28). Furthermore, they participate in signaling of various cellular pathways, for example, STAT3, NF- $\kappa$ B and MAPK causing the onset or perpetuation of the inflammatory response (29,30). It is also important to note that all of these cytokines have been associated with autoimmune conditions such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, autoimmune myocarditis, among others (31–33). However, studies about the participation of these cytokines in FM are rare.

With respect to IL-17, we were the first group to demonstrate high levels of this potent inflammatory molecule in the plasma of patients with FM (5) and the results of the present study confirm our earlier findings. The IL-17 is produced mainly by lymphocytes TH17, but may be produced by natural killer cells, dendritic cells and neutrophils (34). Elevated levels of IL-17 had already been identified in other autoimmune conditions such as rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, Sjögren's syndrome and

multiple sclerosis (35–38). It is important to note that high levels of IL-17 demonstrated in this study may enhance the symptoms of FM. After all, according to the reading, IL-17 levels are directly related to the intensity of symptoms such as of pain (39), depression (40) and anxiety (41).

According to our knowledge, this is the first study to investigate and demonstrate elevated levels of IL-23 in FM patients. This finding is important because IL-23 has a key role in the balance between regulatory T cells and effector T cells, this balance is essential for the modulation of autoimmunity (42). IL-23 is a potent proinflammatory cytokine produced primarily by dendritic cells and macrophages, it is capable of stimulating the TH17 cells to promote the onset or perpetuation of the immune response and chronic inflammation mediated by TH17 cells (43). Elevated levels of IL-23 have been described in several chronic inflammatory conditions, such as joint disease, intestinal diseases and demyelinating diseases (44). Moreover, IL-23 has become an important therapeutic target for autoimmune conditions and therefore agents anti IL-23 are being developed (45). No study on the role of IL-23 in the FM syndrome has been identified, which prevents the comparison between the findings.

Concerning to the levels of MIP-1a, significant changes were also found in patients with FM. In humans, there are two main forms, MIP1-a [CCL3] and MIP1-b [CCL4] both are produced by macrophages, dendritic cells and lymphocytes. They are crucial in infectious and inflammatory response, since they attract monocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, T cells and cells B (46). Zhang et al. found no significant differences in MIP-1a levels when compared to healthy controls and FM patients (47). According to Tomioka and Matsui, this cytokine is a biomarker of the neuroinflammatory and demyelinating diseases such as multiple sclerosis (48). In this sense, it is necessary to emphasize that an important review paper highlights the role of neurogenic neuroinflammation in the pathogenesis of FM syndrome. The authors also suggest that neuroinflammation is an important contributor of the clinical features presented by FM patients (49). The present study did not evaluate the presence of neuroinflammation in patients with FM, but the high levels of MCP-1a found in FM patients may suggest the presence of neuroinflammation in these patients.

Regarding MCP-1 [CCL2], the increased levels identified in this study, corroborate the findings of Zhang et al. and Bote et al. (47,50). MCP-1 is

produced by many cell types, such as: endothelial cells, epithelial cells, fibroblasts, monocytes, astrocytes and microglial cells (51). MCP-1 recruits dendritic cells, monocytes and T lymphocyte to sites of tissue injury and infection (51). The overexpression of MCP-1 has been observed in several conditions, such as arteriosclerosis, arthritis and cancer. However, it is necessary to emphasize that the role of MCP-1 in these conditions is not well understood (27). What is known so far is that both MCP-1 and its receptor [CCR2] are overexpressed in dorsal root ganglia of neuropathic pain models and can induce and enhance the hyperalgesia phenomenon (52). In FM, there is no evidence to support the role of MCP-1 in pain perceived by the patient with this condition. In this study, the association between cytokine levels and the main symptoms of FM was not tested since the intensity of the symptoms was not evaluated through specific and validated questionnaires.

Although there are not many scientific evidence linking IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 levels to the main symptoms of FM [pain, anxiety, depression, sleep disturbances and fatigue], it is necessary to emphasize that other inflammatory cytokines such as IL-1 IL-6, IL-8 and TNF have already been associated with these symptoms (39,53,54). The origin of IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 in FM patients was not addressed in this study, but it is possibly produced, at least in part, by activated T lymphocytes or CD5+ and CD5- B lymphocytes, since we have previously demonstrated increased numbers of these cells in FM patients (4).

In this study, the positive and significant association between the absolute number of leucocytes and plasmatic levels of IL-17 and IL-23 supports the involvement of these molecules in leukocyte recruitment in FM patients. This finding is also important in the context of cell signaling, since IL-23 plays a key role in the development of TH17 cells, the responsible for IL-17 production (55). In this context, an increase in IL-23 levels results in elevated IL-17 levels, and both can contribute to the recruitment of global leukocytes observed here. Although correlation analyses have demonstrated the positive association of IL-17 and IL-23 with global leukocyte levels in FM patients, only IL-17 remained in the stepwise multiple regression model as a predictive variable of global leukocyte levels found in FM patients. This result highlights the important role of IL-17 in the pathophysiology of FM and places it as a potential therapeutic target. Among healthy controls, there was no association between global leukocytes and levels of IL-17, IL-23, MIP1-a and

MCP-1. And, the stepwise multiple regression showed that the levels of IL-23 and MCP-1 are negatively associated with the global leukocyte levels found in healthy controls. The difference found between patients with FM and healthy controls regarding the variables that explain the outcome may suggest the presence of a distinct pattern of immunomodulation in FM patients, mediated by TH17 cells (5,25).

It is important to note that age and BMI can be considered confounding factors for global leukocyte. However, neither in the FM patients group nor in the healthy control group, these variables did not correlate with leukocyte levels. Likewise, these variables did not remain in any of the models that explain the outcome of the study. Thus, the independent association between IL-17, regardless of age and BMI in FM patients reinforces the participation of the immune system in the pathophysiology of this condition.

It is necessary to highlight that, in spite of the limitation in number of patients the results of this study should be considered at the time of diagnosis and/or at the time to implement therapeutic approach for patients with FM, whether pharmacological or not. Currently, the diagnosis of this condition is essentially clinical (2,12) and the treatment consists in the interaction of several classes of drugs, even without having scientific support for such interaction (56).

## CONCLUSIONS

The higher levels of global leukocytes, IL-17, IL-23, MIP-1a and MCP-1 in patients with FM and the positive association between IL-17, IL-23 and global leukocytes levels in FM patients support the involvement of the immune system in this condition. At the time of the diagnosis and/or clinical decision making, it is important to consider this relationship.

## DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

## FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais [FAPEMIG] and Centro Universitário de Formiga – MG [UNIFOR-MG].

## REFERENCES

1. Dadabhoy D, Crofford LJ, Spaeth M, Russell IJ, Clauw DJ: Biology and therapy of fibromyalgia. Evidence-based

- biomarkers for fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther* 10: 211, 2008.
2. Wolfe F, Hauser W: Fibromyalgia diagnosis and diagnostic criteria. *Ann Med* 43: 495–502, 2011.
  3. Sarzi-Puttini P, Atzeni FD, Franco M, Buskila D, Alciati A, Giacomelli C, Rossi A, Bazzichi L: Dysfunctional syndromes and fibromyalgia: A 2012 critical digest. *Clin Exp Rheumatol* 30: 143–151, 2012.
  4. Carvalho LS, Correa H, Silva GC, Campos FS, Baiao FR, Ribeiro LS, Faria AM, d'Avila Reis D: May genetic factors in fibromyalgia help to identify patients with differentially altered frequencies of immune cells? *Clin Exp Immunol* 154: 346–352, 2008.
  5. Pernambuco AP, Schetino LP, Alvim CC, Murad CM, Viana RS, Carvalho LS, Reis DA: Increased levels of IL-17A in patients with fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol* 31(6 Suppl 79): S60–S63, 2013.
  6. Al-Allaf AW, Ottewell L, Pullar T: The prevalence and significance of positive antinuclear antibodies in patients with fibromyalgia syndrome: 2–4 years' follow-up. *Clin Rheumatol* 21: 472–477, 2002.
  7. Nishikai M, Tomomatsu S, Hankins RW, Takagi S, Miyachi K, Kosaka S, Akiya K: Autoantibodies to a 68/48 kDa protein in chronic fatigue syndrome and primary fibromyalgia: A possible marker for hypersomnia and cognitive disorders. *Rheumatology (Oxford)* 40: 806–810, 2001.
  8. Togo F, Natelson BH, Adler GK, Ottenweller JE, Goldenberg DL, Struzik ZR, Yamamoto Y: Plasma cytokine fluctuations over time in healthy controls and patients with fibromyalgia. *Exp Biol Med (Maywood)* 234: 232–240, 2009.
  9. Kaufmann I, Eisner C, Richter P, Hüge V, Beyer A, Chouker A, Schelling G, Thiel M: Lymphocyte subsets and the role of TH1/TH2 balance in stressed chronic pain patients. *Neuroimmunomodulation* 14: 272–280, 2007.
  10. Kotter I, Neuscheler D, Gunaydin I, Wernet D, Klein R: Is there a predisposition for the development of autoimmune diseases in patients with fibromyalgia? Retrospective analysis with long term follow-up. *Rheumatol Int* 27: 1031–1039, 2007.
  11. Bellato E, Marini E, Castoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE, Blonna D: Fibromyalgia syndrome: Etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pain Res Treatment* 2012: 426130, 2012.
  12. Bazzichi L, Sernissi F, Consensi A, Giacomelli C, Sarzi-Puttini P: Fibromyalgia: A critical digest of the recent literature. *Clin Exp Rheumatol* 29: S1–11, 2011.
  13. Amsen D, de Visser KE, Town T: Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. *Methods Mol Biol* 511: 107–142, 2009.
  14. Nascimento MLP: Linfocitopenias: Valores normais para leucócitos totais e a relação com os monócitos. São Paulo: NewsLab editor; 2008.
  15. Fonseca A, Bagnoli V, Arie W, Azevedo Neto R, Couto Jr E, Baracat E: Dados demográficos, epidemiológicos e clínicos de mulheres brasileiras climatéricas, Casa Leitura Médica, São Paulo, 2010.
  16. Molnar I, Bohaty I, Somogyine-Vari E: High prevalence of increased interleukin-17A serum levels in postmenopausal estrogen deficiency. *Menopause* 21: 749–752, 2014.
  17. Yasui T, Saijo A, Uemura H, Tsuchiya N, Yuzurihara M, Kase Y, Irahara M: Interleukin-7 is associated with monocyte chemoattractant protein-1 and soluble E-selectin levels in peripheral blood of newly post-menopausal women. *J Reprod Immunol* 81: 97–102, 2009.
  18. Sumarac-Dumanovic M, Stevanovic D, Ljubic A, Jorga J, Simic M, Stamenkovic-Pejkovic D, Starcevic V, et al: Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. *Int J Obes (Lond)* 33: 151–156, 2009.
  19. Sturgeon JA, Darnall BD, Zwickey HL, Wood LJ, Hanes DA, Zava DT, Mackey SC: Proinflammatory cytokines and DHEA-S in women with fibromyalgia: Impact of psychological distress and menopausal status. *J Pain Res* 7: 707–716, 2014.
  20. Francischetti I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB: Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. *Braz J Cardiovasc Surg* 25: 575–584, 2010.
  21. Souza EJDRe, Nogueira-Machado JA, Silva FdCLE, Chaves MM, Costa DC: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos de sangue periférico de pacientes com fibromialgia primária. *Rev Brasil Reumatol* 43: 337–342, 2003.
  22. Macedo JA, Hesse J, Turner JD, Ammerlaan W, Gierens A, Hellhammer DH, Muller CP: Adhesion molecules and cytokine expression in fibromyalgia patients: Increased I-selectin on monocytes and neutrophils. *J Neuroimmunol* 188: 159–166, 2007.
  23. Neeson PJ, Thurlow PJ, Jamieson GP, Bradley C: Lymphocyte-facilitated tumour cell adhesion to endothelial cells: The role of high affinity leucocyte integrins. *Pathology* 35: 50–55, 2003.
  24. Abdalla AO, Kiaii S, Hansson L, Rossmann ED, Jeddi-Tehrani M, Shokri F, Osterborg A, et al: Kinetics of cytokine gene expression in human CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets using quantitative real-time PCR. *Scand J Immunol* 58: 601–606, 2003.
  25. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK: IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 27: 485–517, 2009.
  26. Hillyer P, Larche MJ, Bowman EP, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Schewitz LP, Giddins G, et al: Investigating the role of the interleukin-23/-17A axis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 48: 1581–1589, 2009.
  27. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J Interferon Cytokine Res* 29: 313–326, 2009.
  28. Feng J, Zhang Z, Li W, Shen X, Song W, Yang C, Chang F, et al: Missense mutations in the MEFV gene are associated with fibromyalgia syndrome and correlate with elevated IL-1beta plasma levels. *PLoS One* 4: e8480, 2009.
  29. Kim CF, Moalem-Taylor G: Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice. *J Pain* 12: 370–383, 2011.
  30. Shankar E, Vykhovanets EV, Vykhovanets OV, MacLennan GT, Singh R, Bhaskaran N, Shukla S, Gupta S: High-fat diet activates pro-inflammatory response in the prostate through association of Stat-3 and NF-kappaB. *Prostate* 72: 233–243, 2012.
  31. Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL: Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis Res Ther* 13: R126, 2011.
  32. Kurtuncu M, Tuzun E, Turkoglu R, Petek-Balci B, Icoz S, Pehlivan M, Birisik O, et al: Effect of short-term interferon-beta treatment on cytokines in multiple sclerosis: Significant modulation of IL-17 and IL-23. *Cytokine* 59: 400–402, 2012.
  33. Goser S, Ottl R, Brodner A, Dengler TJ, Torzewski J, Egashira K, Rose NR, et al: Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha in induction of experimental autoimmune myocarditis and effective anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy. *Circulation* 112: 3400–3407, 2005.
  34. Cua DJ, Tato CM: Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 479–489, 2010.
  35. Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, Hu NW, et al: Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One* 7: e31000, 2012.
  36. Mieliauskaitė D, Dumalakiene I, Ruginė R, Mackiewicz Z: Expression of IL-17, IL-23 and their receptors in minor salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Dev Immunol* 2012: 187258, 2012.
  37. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Muroi E, Ogawa F, et al: Elevated serum interleukin-27 levels in