

**Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP**  
**Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Biotecnologia de Plantas Medicinais e**  
**Microorganismos**

***Determinação do polimorfismo dos genes 5HT2A e COMT  
em pacientes com fibromialgia***

**Josie Budag Matsuda**

**Ribeirão Preto**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Josie Budag Matsuda**

***Determinação do polimorfismo dos genes 5HT2A e COMT  
em pacientes com fibromialgia***

Dissertação apresentada ao curso de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia com concentração em Plantas Medicinais e Microorganismos

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira**

**Ribeirão Preto**

**2007**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação ao meu esposo Luis Otavio, pela paciência, incentivo e compreensão durante todo este período dedicado à pesquisa;

Aos meus pais Horst e Iria e ao meu irmão Ricardo, por toda força e incentivo aos estudo.

## AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter me proporcionado esta fase da vida, onde tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, conquistando novas amizades.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Suzelei de Castro França Coordenadora do Programa de Mestrado em Biotecnologia, que sempre esteve disponível para ouvir e discutir sobre o projeto.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Lúcia Fachin, por todo o seu carinho e dedicação ao orientar o trabalho.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Maria Soares Pereira, por disposição oferecida.

Ao Prof Dr Mozart de Azevedo Marins, e à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sonia Marli Zingaretti, professores do departamento de Biotecnologia em Plantas Medicinais e Microorganismos, por terem esclarecido muitas dúvidas.

À Bianca Waléria Bertoni, por ter me auxiliado nos cálculos estatísticos.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lucienir Maria da Silva, reumatologista do Centro Clínico Electro Bonini da Unaerp, por sua colaboração nos atendimentos dos pacientes.

Às técnicas do laboratório de biologia molecular Patrícia e Simone, por toda atenção dispensada.

À estagiária Flávia Regina Barbosa, por ter me auxiliado em todo o processo prático dos experimentos.

À Juliana Coppede por ter me auxiliado nos meus primeiros passos na biologia molecular.

E à todos os pacientes voluntários, que auxiliaram para que esta pesquisa fosse possível.

## **i. RESUMO**

Fibromialgia é uma síndrome reumática caracterizada por dor difusa e crônica, frequentemente associadas a fadiga, distúrbios do sono, rigidez matinal, ansiedade, depressão, parestesias, dificuldade de memória, tontura, cefaléia crônica e, em alguns casos, dispnéia. Devido ao quadro doloroso e ao caráter crônico, a síndrome geralmente tem impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes. Estudos apontam prevalência em torno de 2% e 3% na população adulta, afetando aproximadamente dez a vinte vezes mais mulheres do que homens. Este estudo se mostra relevante, pois há poucos estudos mais aprofundados sobre a epidemiologia da doença, já que a causa e os mecanismos que provocam a fibromialgia não estão perfeitamente esclarecidos. Entretanto, a fibromialgia tem afetado com grande frequência pessoas em idade de produção, e apesar de todos os estudos realizados até hoje, não há um método diagnóstico, nem um tratamento eficaz para tal patologia. Embora os mecanismos fisiológicos que controlam a fibromialgia não tem sido elucidados precisamente, fatores neuroendócrinos são de grande importância. Além disso, alguns fatores genéticos ou mecanismos moleculares podem estar envolvidos na fibromialgia. A diminuição de serotonina e outros neurotransmissores provoca maior sensibilidade aos estímulos dolorosos e podem estar implicados na diminuição do fluxo de sangue que ocorre nos músculos e tecidos superficiais encontrados na fibromialgia. O objetivo deste estudo foi correlacionar os polimorfismos do gene receptor de serotonina 5HT2A e do gene codifica a enzima catecol -O-metiltransferase COMT com a fibromialgia. No presente estudo, foram realizadas coletas de sangue em indivíduos com fibromialgia para posterior extração de DNA genômico e caracterização por digestão com enzima de restrição dos polimorfismos do gene 5-HT2A e do gene COMT comparados com indivíduos saudáveis. A análise do polimorfismo T102C do gene receptor 5HT2A demonstrou que todos os genótipos não apresentaram diferenças entre o grupo com fibromialgia e grupo controle. Entretanto, alguns sintomas típicos da fibromialgia podem estar associados ao genótipo T/C, como a poliúria e histórico familiar de depressão. Os resultados do polimorfismo do gene COMT demonstraram que os genótipos L/L e L/H não foram estatisticamente significativos para distinguir pacientes e controles. Entretanto o genótipo H/H demonstrou ser estatisticamente significativo e está associado com a fibromialgia, assim, esta associação abre a perspectiva de um diagnóstico precoce para a doença.

## ii. SUMMARY

Fibromyalgia is a rheumatic syndrome characterized by diffuse and chronic pain, frequently associated with fatigue, sleep disorders, morning stiffness, anxiety, depression, paresthesia, memory impairment, dizziness, chronic headache and, in some cases, breathlessness. Due to its painful and chronic nature, the syndrome generally has a negative impact on the quality of life of the patients. Studies indicate a prevalence of fibromyalgia in the adult population ranging from 2 to 3%, with the disease affecting 10 to 20 times more women than men. This study is relevant because only few detailed investigations on the epidemiology of fibromyalgia are available and the cause and mechanisms underlying the disease are not completely understood. Fibromyalgia frequently affects individuals of productive age, and despite the large number of studies conducted so far, no diagnostic method or effective treatment is available. Although the physiological mechanisms that control fibromyalgia have not been precisely established, neuroendocrine factors seem to play an important role. In addition, some genetic factors or molecular mechanisms might be involved in the disease. A reduction in serotonin and other neurotransmitters increases the sensitivity to painful stimuli and might be implicated in the reduced blood flow in muscles and superficial tissues observed in fibromyalgia. The objective of the present study was to determine the association of polymorphisms in the serotonin (5-HT<sub>2A</sub>) receptor gene and in the gene encoding the enzyme catechol-O-methyltransferase (COMT) with fibromyalgia. In the present study, blood samples were collected from patients with fibromyalgia for subsequent extraction of genomic DNA and characterization of 5-HT<sub>2A</sub> and COMT gene polymorphisms by restriction enzyme digestion with and the results were compared to healthy individuals. Analysis of the T102C polymorphism of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene demonstrated no differences in the genotypes studied between the fibromyalgia and control groups. However, some typical symptoms of fibromyalgia might be associated with the T/C genotype, such as polyuria and a family history of depression. Analysis of the COMT gene polymorphism demonstrated no significant difference in the L/L or L/H genotype between patients and controls. However, a significant difference was observed for the H/H genotype which is associated with fibromyalgia. Thus, this association opens perspectives for an early diagnosis of the disease.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Localização dos tender points.....	10
<b>Figura 2:</b> Critérios de diagnósticos classificação da fibromialgia estabelecido em 1990 pelo colégio Americano de Reumatologia.....	11
<b>Figura 3:</b> Gráfico demonstrando a idade dos indivíduos com Fibromialgia submetidos a tratamento alopático.....	23
<b>Figura 4:</b> Gráfico do período (em anos) de sintomas de dores musculares reportados pelos pacientes com Fibromialgia.....	23
<b>Figura 5-</b> Gráfico demonstrando o estado civil dos indivíduos com Fibromialgia.....	24
<b>Figura 6:</b> Tipos de medicamentos (em porcentagem) utilizados no tratamento de pacientes com fibromialgia .....	25
<b>Figura 7:</b> Eletroforese em gel de agarose 2,0% demonstrando a digestão esperada do produto de PCR com o primer 5HT2A.....	26
<b>Figura 8:</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a amplificação da banda esperada de 185pb do DNA genômico extraído a partir das amostras de sangue coletadas.....	28
<b>Figura 9:</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida 8,0% demonstrando a digestão esperada do produto de PCR com o primer COMT.....	29
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida 8,0% demonstrando a digestão esperada do produto de PCR com o primer COMT.....	30
<b>Figura 11:</b> Alinhamento da seqüência do produto de PCR com a seqüência do gene receptor da serotonina depositada no banco de dados.....	32
<b>Figura 12:</b> Alinhamento do produto de PCR com a seqüência do gene COMT depositada no banco de dados.....	33

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Frequência dos polimorfismos do gene 5HT2A dos pacientes com fibromialgia submetidos a tratamento alopático convencional e indivíduos controle .....	27
<b>Tabela 2:</b> Relação entre a frequência(em %) dos polimorfismos do gene 5HT2A e dados epidemiológicos da fibromialgia obtidos através da aplicação do questionário.....	28
<b>Tabela 3:</b> Frequência dos polimorfismos do gene COMT dos pacientes com fibromialgia e indivíduos controle.....	31

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Fibromialgia.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Epidemiologia.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Fisiopatologia.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Tratamento.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Genética Molecular.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Banco de material genético.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Local de desenvolvimento do estudo.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Descrição da amostra.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.1 Seleção dos sujeitos.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3 Coleta de dados.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3.1 Entrevista.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3.2 Coleta de sangue.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4 Extração de DNA.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5 Detecção dos polimorfismos do gene 5HT2A.....</b>	<b>19</b>
<b>4.6 Detecção dos polimorfismos do gene COMT.....</b>	<b>20</b>
<b>4.7 Sequenciamento dos produtos de PCR.....</b>	<b>22</b>
<b>4.8 Análise dos dados.....</b>	<b>22</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Dados dos questionários .....</b>	<b>23</b>
<b>5.2 Detecção dos polimorfismos do gene 5HT2A.....</b>	<b>26</b>
<b>5.3 Detecção dos polimorfismos do gene COMT.....</b>	<b>28</b>
<b>5.4 Sequenciamento dos produtos de PCR amplificados.....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO 1: Questionário.....</b>	<b>37</b>

<b>ANEXO.2: Comitê de ética:.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO 3: Comitê de ética.....</b>	<b>39</b>

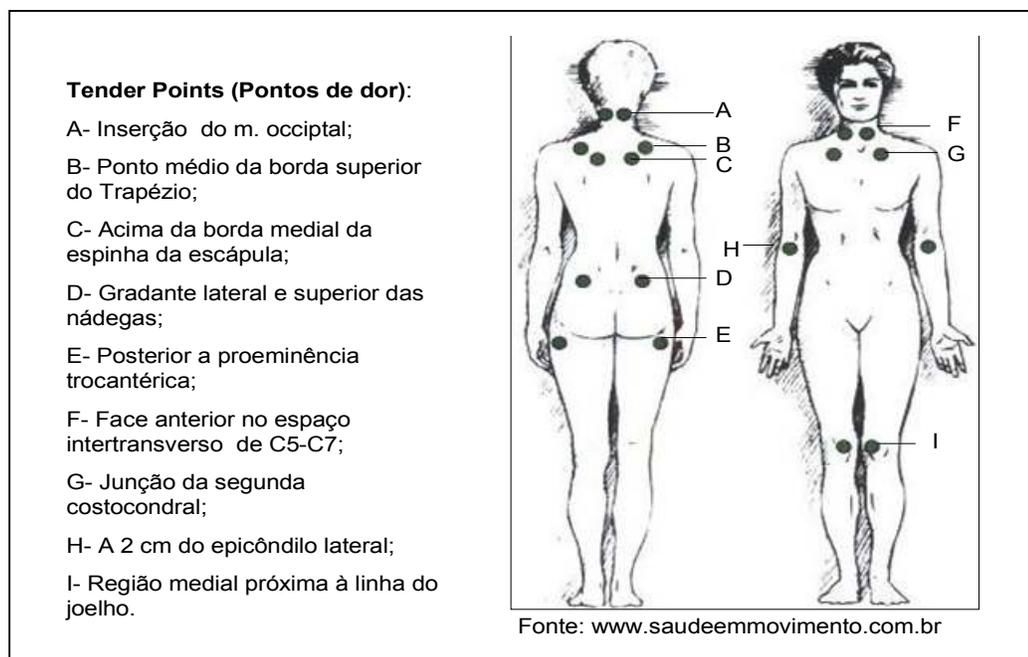
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Fibromialgia

Historicamente a fibromialgia, tem sido apresentada por vários séculos sob vários nomes, incluindo o mais insatisfatório: “Fibrosite”. Em 1987, a fibromialgia foi reconhecida como uma síndrome distinta pela American Medical Association, passando então a ser denominada de Síndrome Fibromialgia (SFM) (Chaitow, 2002).

“Fibromialgia é uma síndrome de dor difusa e crônica, caracterizada pela presença de pelo menos 11, dos 18 pontos anatomicamente específicos chamados de tender points, dolorosos à palpação de cerca de 4kgf”(Wolfe et al., 1990). A localização desses tender points é apresentada na Figuras 1. Os critérios de diagnósticos da fibromialgia (Figura 2) foram propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) em um estudo realizado por Wolfe e colaboradores (1990).

Segundo Wolfe et al. (1990) a dor difusa é o sintoma principal da fibromialgia, outros sintomas como rigidez, fadiga, distúrbio do sono, parestesia, dificuldades de memória, palpitação, tontura, sensação de inchaço, dor torácica, cefaléia crônica, ansiedade, depressão, irritabilidade, zumbido, epigastralgia, dispnéia, enjôo, dificuldade de digestão, fenômeno de Raynaud, dismenorréia e cólon irritável (Wolfe et al., 1990; Helfenstein & Feldman, 2002; Riberto & Battistella, 2002).



**Figura 1:** Localização dos tender points

- Dor difusa: dor no lado esquerdo do corpo, dor no lado direito do corpo, dor acima da linha da cintura e dor abaixo da linha da cintura. Adicionalmente dor no esqueleto axial (segmento cervical, torácico ou lombar da coluna vertebral) deve estar presente há pelo menos três meses.
- Dor à palpação, com uma pressão de aproximadamente 4kg/cm<sup>2</sup>, em pelo menos 11 dos 18 tender points (apontados na figura ao lado)



Fonte:www.fibromialgia.umh.es

**Figura 2:** Critérios de diagnósticos da fibromialgia estabelecido em 1990 pelo colégio Americano de Reumatologia

Muitas discussões têm sido geradas em virtude dos critérios de diagnósticos contarem apenas com características subjetivas, a dor. Pois não há exames laboratoriais ou radiológicos que confirmem ou excluam o diagnóstico, já que os pacientes não apresentam alterações evidentes de órgãos ou sistemas, apesar dos elevados níveis de dor, fadiga e outros sintomas associados semelhantes aos pacientes com outras doenças, mas sem uma fisiopatologia evidente, como na artrite reumatóide (Martinez et al., 1994).

## 1.2 Epidemiologia

A fibromialgia afeta aproximadamente 10 a 20 vezes mais mulheres do que homens, sugerindo-se que aspectos neuro-hormonais ou características psicológicas podem ser implicados no que é chamada de “doença típica das mulheres”. Ainda assim, acredita-se que os homens tendem a ser mais brandos, sendo possível que a fibromialgia em homens esteja sendo subnotificada (Cavalcante et al., 2006; Dobbro et al., 1998; Yunus et al, 2000).

A faixa etária em que se consta maior incidência da fibromialgia é dos 20 aos 50 anos, sendo que a idade média do início dos sintomas varia entre 29 e 37 anos, e o diagnóstico geralmente ocorre entre os 40 e 50 anos, com uma média de 9,3 anos entre o início dos sintomas e o diagnóstico (Brady et al., 2001; Antônio, 2001).

Embora seja uma patologia discreta em relação à morbidade e mortalidade, a fibromialgia gera uma grande incapacidade. As limitações nas atividades de vida diária foram descritas tão intensas na fibromialgia quanto na artrite reumatóide (REILLY et al., 1993; HAWLEY et al., 1991). White et al.(1999), afirmam que a fibromialgia causa um impacto negativo na qualidade de vida nas pessoas em idade produtiva de trabalho, uma vez que os sintomas levam a uma perda de função motora e cognitiva, atingindo a capacidade para o trabalho e, conseqüentemente à queda na renda familiar. A incapacidade funcional e a interferência dos sintomas em todas as esferas da vida diária - trabalho, vida familiar e lazer, agravam aspectos psicológicos como depressão e ansiedade (White et al., 1999).

Pacientes com crises fibromiálgicas apresentam quadro clínico tão agravante quanto os pacientes com outras doenças crônicas, como artrite reumatóide, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica e lúpus eritematoso sistêmico (Berber et al., 2005).

### **1.3 Fisiopatologia**

A fisiopatologia da fibromialgia é incerta, há pesquisas que atribuem sua instalação a alterações sistêmicas, metabólicas e neuroquímicas. Muitos doentes não identificam eventos que possam ter desencadeado estes sintomas; os que o fazem, refere-se a infecções virais, traumatismos, anormalidades emocionais ou uso de certos medicamentos (Kaziyama et al, 2005).

As mudanças que ocorrem no tecido envolvido no aparecimento da fibromialgia iniciam-se através de um predomínio simpático localizado, associado com alterações na concentração do íon de hidrogênio e do equilíbrio do cálcio e sódio nos fluidos teciduais. Essas mudanças associam-se a vasoconstrição e conseqüente hipoxia/isquemia. A dor surge quando tais alterações afetam os sensores e proprioceptores da dor. Um espasmo muscular e contrações tetânicas localizadas, nodulares dos feixes musculares, além de uma estimulação vasomotora e musculomotora, criam um círculo vicioso de impulsos autopetpetuadores. Há padrões variados e complexos desses sintomas nas áreas “gatilho” ou tender points. Sensações como dor generalizadas podem se manifestar, bem como uma modificação da atividade muscular em razão da contração, resultando em encurtamento muscular, espasmo, entre outros.(Chaitow, 2001).

Os recentes estudos a respeito dos neurotransmissores envolvidos na fibromialgia chamam a atenção para a serotonina. Esta tem papel na modulação da dor , agindo como um neurotransmissor inibitório da liberação de substância P pelos neurônios aferentes,

provenientes de um estímulo nociceptivo periférico. Os estudos têm demonstrado uma diminuição do nível de serotonina, além de seus precursores (triptofano) e metabólitos (ácido 5-hidroxiindolacético) no soro sanguíneo dos pacientes com fibromialgia, comparados a indivíduos controle. Essa alteração a nível plasmático poderia explicar a amplificação da dor no pacientes (Wolfe et al., 1997; Russel , 1998)

Pacientes com fibromialgia são mais vulneráveis a estresse e apresenta maior sensibilidade a dor. O estresse diário como insônia, barulho e luz excessiva comumente têm um impacto mais negativo em pacientes com fibromialgia (Davis et al., 2001).

#### **1.4 Tratamento**

O tratamento continua sendo um desafio para os profissionais da saúde, mas a idéia principal de tratamento inclui o controle da dor e da fadiga, a melhora do padrão do sono, o controle das anormalidades do humor, a melhora da funcionalidade e reintegração psicossocial. Há, portanto necessidade de interação assistencial interdisciplinar. O desconhecimento da fisiopatologia dificulta o estabelecimento de estratégias terapêuticas para doentes com fibromialgia. A prevenção da recorrência dos sintomas melhora a qualidade de vida e também são fundamentais na reabilitação dos doentes com fibromialgia.

Segundo McCain (1994), apenas 50% dos doentes melhora após as intervenções disponíveis. Entre as intervenções terapêuticas estão os tratamentos com psicotrópicos associados a analgésicos são mais eficazes do que o placebo, porém proporcionam apenas uma melhora da dor, da fadiga, da rigidez e das anormalidades do sono não REM (Kaziyama et al, 2005).

Além disso, uma ampla gama de suplementos (vitaminas; minerais; aminoácidos; enzimas; melatonina; ervas medicinais e antioxidantes) é usada no tratamento da fibromialgia, mas sem comprovação terapêutica (Chaitow, 2002).

Assim sendo a fibromialgia continua sendo uma doença de cura incerta, o que acaba provocando sentimentos de vulnerabilidade e desamparo ao paciente (Berber et al., 2005).

#### **1.5 Genética molecular**

Crescentemente um dos objetivos na medicina molecular é a caracterização de mutações ou polimorfismos no DNA genômico (ou em mRNA) e sua correlação com prognósticos. Isso é realizado em três níveis:

\* No nível populacional com objetivo de encontrar mutações ou polimorfismos para efeito de “screening” genético, para prevenir as doenças genéticas mais comuns;

\* No nível de famílias transmitindo doenças hereditárias, para definir a mutação responsável e prestar aconselhamento genético, bem como o diagnóstico pré-natal ou mesmo pré-concepção;

\* No nível de tumores onde genes que ocorrem mutações que contribuem para o surgimento dos oncogenes (do grego *onkos*= tumor) (Boim, 2003).

Recentes estudos no campo da biologia molecular têm confirmado a importância da genética no estudo dos fatores envolvidos na etiologia de distúrbios afetivos e possivelmente a fibromialgia. Pesquisas têm correlacionado o mau funcionamento do sistema de receptores de serotonina em pacientes com fibromialgia e outros distúrbios afetivos (Wolfe et al. 1997). Os sintomas de ansiedade e neurose foram atribuídos a um polimorfismo no promotor do gene que regula o transporte de serotonina, o transportador de serotonina é responsável pela inativação da liberação de serotonina no complexo sináptico. A possibilidade da contribuição da serotonina (5-HT) na etiologia da doença se deve não apenas na eficácia de recaptadores de serotonina na redução das dores crônicas, mas também aos baixos níveis de serotonina no sangue e aos baixos níveis do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) no líquido cerebrospinal em pacientes com dores idiopáticas (Bondy et al., 1999). A disfunção para serotonina está relacionada com a fisiopatologia da fibromialgia, causando uma perda na qualidade do sono, e dores severas pelo corpo. Polimorfismos, de subunidades de genes receptores de serotonina HTR3A e HTR3B e 5HT2A também podem estar relacionados com a fisiopatologia da doença (Bondy et al., 1999; Gürsoy et al., 2001; Frank et al., 2004).

Além disso, a fibromialgia também pode estar associada com a disfunção neuroendócrina caracterizada por uma função anormal da adrenal-pituitária-hipotálamo, incluindo a hiper atividade do hormônio adrenocorticotrópico, relacionado com resposta adrenal diminuída. A enzima Catechol-O-methyltransferase (COMT) inativa as catecolaminas. Estudo realizado demonstrou uma correlação do polimorfismo de COMT em pacientes com fibromialgia, caracterizando a proteína responsável por alguns sintomas da doença (Gürsoy et al, 2003).

## **1.6 Banco de material genético:**

O armazenamento de amostras é uma prática comum em laboratórios do mundo inteiro. Contudo, o armazenamento isoladamente não é um procedimento que traz efetivos benefícios para o próprio paciente. Logo, os dados dos bio-bancos somente se justificam se utilizados para fins de pesquisa, que na área da saúde pode ser rapidamente transposta para as atividades diagnósticas e terapêuticas, resultando em benefícios para a sociedade. De acordo com a finalidade principal da sua obtenção, os bancos podem ser diferenciados em bancos de pesquisa e de diagnóstico. Os bancos de pesquisa são formados por DNA obtidos de indivíduos, de familiares e, algumas vezes, de populações inteiras, sabidamente portadoras ou afetadas por uma característica genética. As informações obtidas a partir destas amostras também podem ser utilizadas em aconselhamento genético, ou seja, na detecção de portadores ou estabelecimento de possíveis prognósticos (Mir et al., 2004). Assim sendo, através da confecção de um banco de DNA é possível realizar estudos de polimorfismos ligados a fibromialgia, contribuindo desta forma para um diagnóstico pré-sintomático da doença.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Correlacionar os polimorfismos do gene 5HT2A e do gene COMT com a fibromialgia.

### **2.2 Objetivos específicos**

Confecção de um Banco de DNA no Departamento de Biotecnologia da UNAERP a partir do sangue de pacientes com fibromialgia.

Amplificação do gene 5HT2A e do gene COMT em pacientes com fibromialgia, comparados com indivíduos controles.

Análise dos dados epidemiológicos da doença obtidos através da aplicação dos questionários.

### 3. JUSTIFICATIVA

Este estudo se mostra relevante, uma vez que pouco tem sido pesquisado no campo da epidemiologia da doença, uma vez que a causa e os mecanismos que provocam a fibromialgia não estão perfeitamente esclarecidos. Entretanto, a Fibromialgia tem afetado com grande frequência pessoas em idade de produção, e apesar de todos os estudos realizados até hoje, não há um método diagnóstico, nem um tratamento eficaz para tal patologia. Embora os mecanismos fisiológicos que controlam a fibromialgia não tem sido elucidados precisamente, fatores neuroendócrinos são de grande importância. Além disso, alguns fatores genéticos ou mecanismos moleculares podem estar envolvidos na fibromialgia. A diminuição de serotonina e outros neurotransmissores provoca maior sensibilidade aos estímulos dolorosos e podem estar implicados na diminuição do fluxo de sangue que ocorre nos músculos e tecidos superficiais encontrados na fibromialgia.

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor chave no sistema nervoso central. É sugerido que a disfunção serotoninérgica possa estar envolvida na patofisiologia da síndrome de fibromialgia (FS) o que torna importante a confecção de um banco de DNA e a detecção dos polimorfismos dos receptores de serotonina em pacientes com fibromialgia, no sentido de estabelecer uma possível associação destes polimorfismos com a doença. A fibromialgia também pode estar associada com a disfunção neuroendócrina caracterizada por uma função anormal da adrenal-pituitária-hipotálamo, incluindo a hiper atividade do hormônio adrenocorticotrópico, relacionado com resposta adrenal diminuída. A enzima Catechol-O-methyltransferase (COMT) inativa as catecolaminas. Estudo realizado demonstrou uma correlação do polimorfismo de COMT em pacientes com fibromialgia, caracterizando a proteína responsável por alguns sintomas da doença (Gürsoy et al, 2003).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Local de desenvolvimento do estudo**

Os pacientes com fibromialgia que fizeram parte deste trabalho foram atendidos no Centro Clínico Electro Bonini da Unaerp, voluntários saudáveis não submetidos a nenhum membro do grupo de estudo foram utilizados como controle. As amostras foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biotecnologia em Plantas Mediciniais da Unaerp.

Todos os pacientes e controles foram informados do termo de consentimento e submetidos a um questionário para auxiliar na etiologia da doença (anexo 1). O projeto foi submetido e aprovado pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos desta Universidade e todas as medidas necessárias foram tomadas (anexo 2).

### **4.2 Descrição da amostra**

Amostra consistia de 51 indivíduos com diagnósticos de fibromialgia, e 51 indivíduos saudáveis.

#### **4.2.1 Seleção dos sujeitos e avaliação médica**

O critério de inclusão dos pacientes foi estabelecido com base nas características clínicas da síndrome (dor generalizada, que persiste por no mínimo três meses, fadiga, sono não restaurador, presença de no mínimo 11 tender points), sendo que indivíduos que apresentavam outras enfermidades reumáticas e endócrinas associadas a fibromialgia também foram incluídas. O diagnóstico da fibromialgia foi baseado no critério desenvolvido pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1990, realizado no presente trabalho pela Profa Dra Lucienir Maria da Silva, reumatologista do Centro Clínico Electro Bonini da Unaerp.

### **4.3 Coleta de dados**

#### **4.3.1 Entrevista**

Para cada paciente foi aplicado um questionário (em anexo) contendo informações referentes a epidemiologia da doença.

#### 4.3.2 Coleta de sangue

Para confeccionar o banco de DNA e analisar os polimorfismos genéticos em pacientes diagnosticados com fibromialgia, utilizamos 5ml de amostras de sangue periférico coletados com sistema Vacutainer™, e mantidos em tubos Vacutainer™ contendo anticoagulante K<sub>2</sub>EDTA(7,2mg).

#### 4.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de 300µl das amostras de sangue utilizando o Kit DNA purification System da Promega, ou Wizard da Promega, seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.5 Detecção dos polimorfismos do gene 5HT2A

Utilizamos os primers HT2AFWD 5' –CCTCATCTGCTACAAGTTCTGGCTT-3' e o HT2A-REV 5'-GCATTCTGCAGCTTTTTCTCTAGGG- 3' modificados a partir de Gursoy et al. (2001), para amplificar o DNA genômico dos pacientes e dos controles. A reação de PCR foi realizada utilizando os seguintes reagentes:

Tampão de PCR 10x	5 µl
Solução dNTP (2mM de cada Dntp*)	2 µl
Primer HT2A-FWD (10µM)	1,5 µl
Primer HT2A-VER (10µM)	1,5 µl
Taq Polimerase (5U/µL)	1µl
DNA genômico (1µg)	5 µl
Água deionizada	34µl
Volume Total	50 µl

\* A partir de uma solução estoque de 100mM, 2 $\mu$ L de cada dNTP foram adicionados em 98 $\mu$ L de água.

O protocolo de amplificação dos insertos foi realizado em um termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller com capacidade para 96 amostras: 40 ciclos a 95°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguida por uma extensão final de 10 minutos a 72°C, ciclo descrito por Gursay, 2001.

Para avaliar a qualidade da amplificação dos genes, foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo brometo de etídeo (10 mg/mL) a 80V, durante 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foi realizada utilizando transiluminador U.V.

A digestão do produto de PCR, foi realizada utilizando a enzima de restrição MspI (Promega), é uma enzima de corte freqüente com sítio de restrição 5'....C▼CG G....3'  
3'....G GC▲C....5'

A digestão foi realizada a 37°C por 18 horas em um banho-maria.

Enzima MspI	0,33 $\mu$ l (10U/ $\mu$ L)
Tampão 10x	3 $\mu$ l
Água deionizada	1,66 $\mu$ l
Produto da reação de PCR	25 $\mu$ l
Volume Total	30 $\mu$ l

Para avaliar o resultado da digestão do produto de PCR, foi realizado eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo brometo de etídeo (10 mg/mL) a 80V, durante 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foi realizada utilizando transiluminador U.V.

#### 4.6 Detecção dos polimorfismos do gene COMT

Utilizamos os primers COMT FWD 5'-GGAGCTGGGGGCCTACTGTG-3' e o COMT REV 5'-GGCCCTTTTCCAGGTCTGACA-3' para detectar a transição G-A na

posição 1947 amplificando o DNA genômico dos pacientes e controles. Para reação de PCR foram utilizadas as seguintes concentrações e volume:

Tampão de PCR 10x	5 µl
Solução dNTP (2mM de cada dNTP*)	2 µl
Primer COMT-FWD (10µM)	1,5 µl
Primer COMT-REV (10µM)	1,5 µl
Taq Polimerase (5U/µL)	1µl
DNA genômico (1µg)	5 µl
Água deionizada	34µl
Volume Total	50 µl

O protocolo de amplificação dos insertos foi realizado em um termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller com capacidade para 96 amostras: 40 ciclos a 95°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguida por uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para avaliar a qualidade da amplificação dos genes, foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo brometo de etídeo (10 mg/mL) a 80V, durante 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foi realizada utilizando transiluminador U.V.

A digestão do produto de PCR, foi realizada utilizando a enzima de restrição Hsp92 II (Promega), é uma enzima de corte freqüente com sítio de restrição 5`... CATG▼...3`

3`...▲GTAC ...5`

A digestão foi realizada a 37°C por 18 horas em um banho-maria.

Enzima Hsp92 II	0,33 $\mu$ l (10U/ $\mu$ L)
Tampão 10x	3 $\mu$ l
Água deionizada	1,66 $\mu$ l
Reação de PCR	25 $\mu$ l
Volume Total	30 $\mu$ l

As digestões foram resolvidas em um gel de poliacrilamida (8%), em uma cuba Hoefer de eletroforese vertical, com tampão TAE 1X. As bandas de DNA digeridos foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo (20 minutos em solução com brometo de etídeo).

#### **4.7 Sequenciamento dos produtos de PCR**

Para confirmar os polimorfismos obtidos, os produtos de PCR foram seqüenciados pela metodologia de Sanger *et al.*, 1977, utilizando-se a enzima T7 DNA polimerase Versão 2.0 (Pharmacia) e *primers* universais (forward e reverse), a corrida foi no ABI 377 por 8 horas. As seqüências foram resolvidas em gel de poliacrilamida 6%, na presença de 8M de uréia. A análise das seqüências foi feita em banco de dados com o programa BLAST disponível na Internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) .

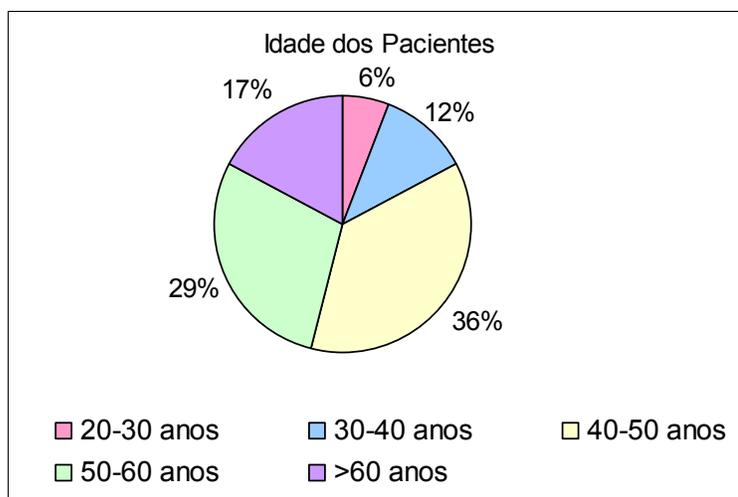
#### **4.8 Análise dos dados**

Para análise dos resultados dos polimorfismos genéticos foi utilizado o teste Tukey no programa SISVAR.

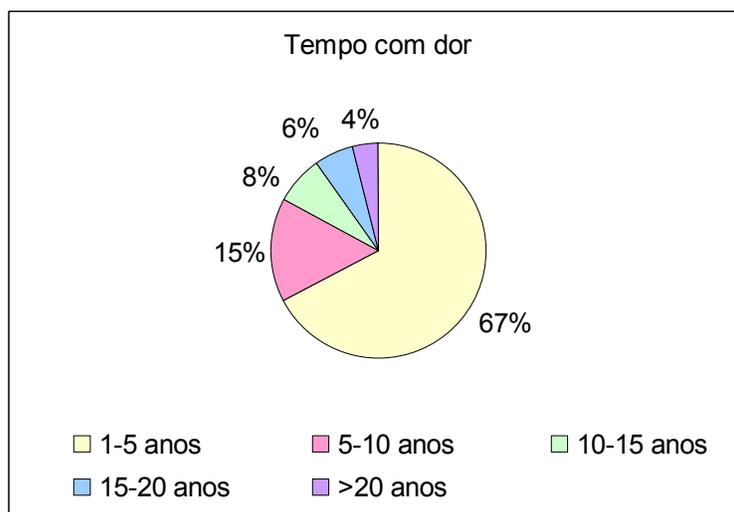
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Dados dos questionários

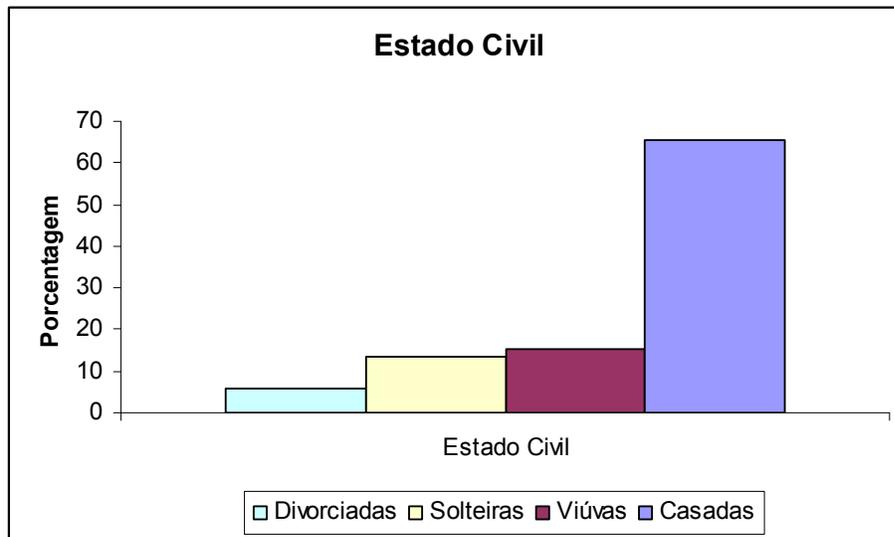
O grupo com indivíduos diagnosticados com fibromialgia foi composto por 51 indivíduos com idade média e desvio padrão  $50 \pm 12$  anos (Figura 3). No total, somente 2 indivíduos eram do sexo masculino. Os pacientes apresentavam um tempo de dor em média  $7 \pm 6$  anos (Figura 4). No grupo estudado 65% dos indivíduos eram casados (Figura 5).



**Figura 3:** Gráfico demonstrando a idade dos indivíduos com Fibromialgia



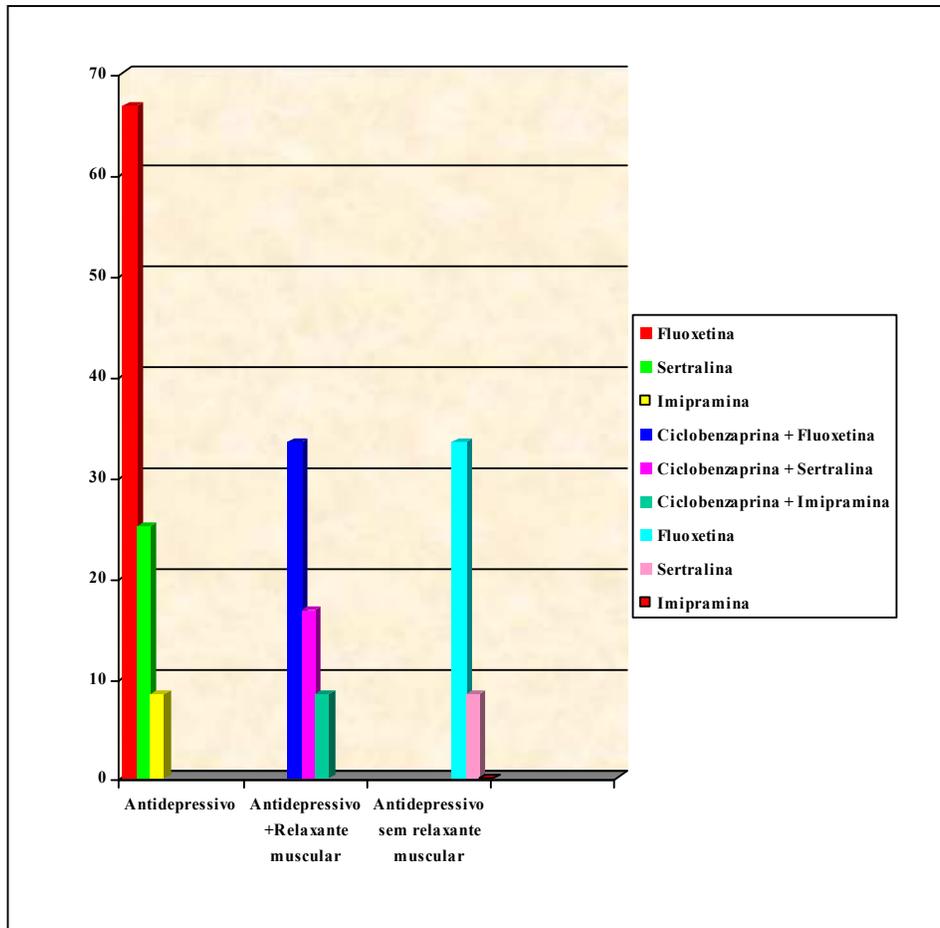
**Figura 4:** Gráfico do período (em anos) de sintomas de dores musculares reportados pelos pacientes com Fibromialgia



**Figura 5-** Gráfico demonstrando o estado civil dos indivíduos com Fibromialgia

Sobre os tratamentos medicamentosos os resultados preliminares demonstraram que 58,49% dos pacientes fazem uso ou já usaram algum antiinflamatório para aliviar as dores musculares, mas relatam que com o uso desta categoria de medicamento ocorre apenas um alívio temporário da dor. Com relação aos relaxantes musculares, especificamente o Ciclobenzaprina, 69,81% fazem uso ou já usaram, porém nem todos os pacientes tiveram boa adaptação a este medicamento, relatando ocorrer efeitos colaterais durante o tratamento. 73,58% utilizam ou já utilizaram antidepressivo no tratamento da Fibromialgia. Entre os antidepressivos 48,07% destacam-se usando Fluoxetina, 5,76% usam Amitriptilina, 5,76% usam Sertralina, 1,92% usam Cloridrato de Paroxetina e 1,92% usam Citalopran, todos citados anteriormente classificam-se como antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, mas também ocorre o uso de antidepressivos tricíclicos, na qual 9,61% usam Imipramina. Os resultados também demonstraram que apenas 1,96 utilizam Alprazolam (Ansiolítico) para o tratamento da Fibromialgia (Figura 6).

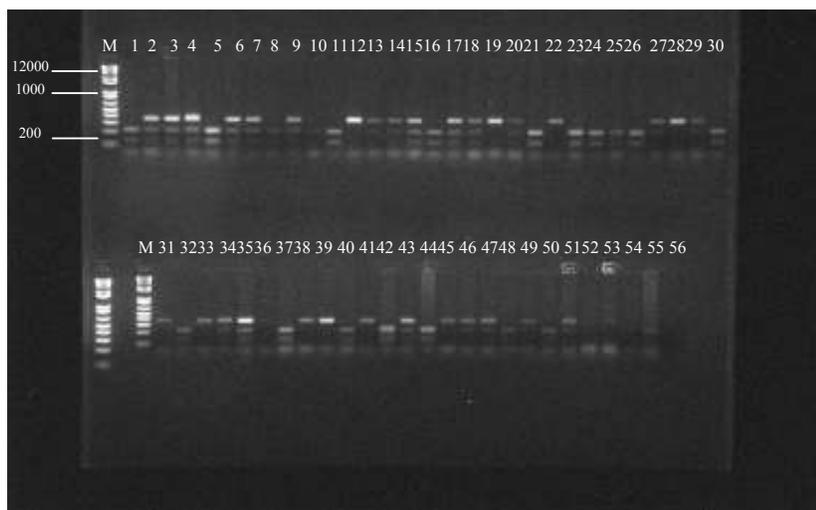
Muitas pessoas procuram outros tratamentos para alívio do quadro de dor. Entre estes tratamentos estão a Fisioterapia com 38,46% dos pacientes, Hidroginástica com 25% e Caminhada com 23,07% dos pacientes.



**Figura 6:** Tipos de medicamentos (em porcentagem) utilizados no tratamento de pacientes com fibromialgia

## 5.2 Detecção dos polimorfismos do gene 5HT2A

Na Figura 7, é possível observar a digestão do produto de PCR amplificado pelo primer 5HT2A utilizando a enzima Msp I.



**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose 2,0% demonstrando a digestão esperada do produto de PCR com o primer 5HT2A. M- Marcador de peso molecular 1Kb Plus Invitrogen(1µg); Poços : 1-55 produto de PCR de indivíduos com Fibromialgia Poço 56- controle negativo

Recentemente o polimorfismo no gene 5HT2A foi identificado e definido como uma transição T – C na posição 102. Este gene possui dois alelos 1 e 2 e três genótipos: T/T que possui apenas uma banda de 342pb; T/C uma banda de 342 uma de 215 e 126 e C/C uma banda de 215 e outra de 126 (Gürsoy et al.; 2001). Neste trabalho, foram analisados 51 pacientes com fibromialgia e 51 indivíduos controle, o diagnóstico dos polimorfismos evidenciou que nos pacientes com fibromialgia as frequências foram 25.49% C/C, 49.02% T/C e 25.49% T/T e no grupo controle estão presentes com 17.65% C/C, 62.74% T/C e 19.61% T/T (Tabela 1). Para analisar estes resultados realizou-se o teste Tukey no programa Sisvar com  $p= 0,05$ , demonstrando que os três genótipos não possuem diferenças significativas entre o grupo com fibromialgia e grupo controle. Porém, alguns sintomas típicos da fibromialgia, podem estar mais presentes no genótipo T/C, como a poliúria e histórico familiar de depressão (Tabela 2). Os resultados do presente trabalho contradizem os obtidos por Gürsoy et al. (2001) que demonstraram que os pacientes com fibromialgia de genótipo T/T apresentam mais sintomas psiquiátricos do que os genótipos T/C e C/C. Este fato pode ser devido a diferenças populacionais nos diferentes países, e também

possivelmente a não digestão da banda 342pb que geraria o genótipo T/C. As amostras de genótipo T/T (que gera uma banda única de 342pb) foram novamente digeridas para confirmar os resultados e constatamos que a maioria das amostras possuíam genótipo T/C (bandas de 342, 215 e 126pb).

Pesquisas têm correlacionado o mau funcionamento do sistema de receptores de serotonina em pacientes com FM e outras disordens afetivas (Wolfe et al. 1997). Os sintomas de ansiedade e neurose foram atribuídos a um polimorfismo no promotor do gene que regula o transporte de serotonina. O transportador de serotonina é responsável pela inativação da liberação da serotonina no complexo sináptico. Pacientes com Fibromialgia apresentam uma maior frequência deste genótipo em relação ao controle, apresentando sintomas de depressão e estresse psicológico. A disfunção para serotonina está relacionada com a fisiopatologia da FM, causando uma perda na qualidade de sono, e dores severas pelo corpo. Polimorfismos, de subunidades de genes receptores de serotonina 5HT2A e 5HT2B também podem estar relacionados com a fisiopatologia da doença (Frank et al., 2004). Estes resultados reforçam a evidência da relação dos distúrbios do metabolismo da serotonina com os sintomas de disordens afetivas em pacientes com Fibromialgia. Estudos genéticos adicionais com um maior número de amostras são promissores nesta área.

**Tabela 1:** Frequência dos polimorfismos do gene 5HT2A dos pacientes com fibromialgia e indivíduos controle .

Genótipos	N Pacientes (%)	N Controle (%)
C/C	25,49 <sup>a</sup>	17,65 <sup>a</sup>
T/C	49,02 <sup>a</sup>	62,74 <sup>a</sup>
T/T	25,49 <sup>a</sup>	19,61 <sup>a</sup>

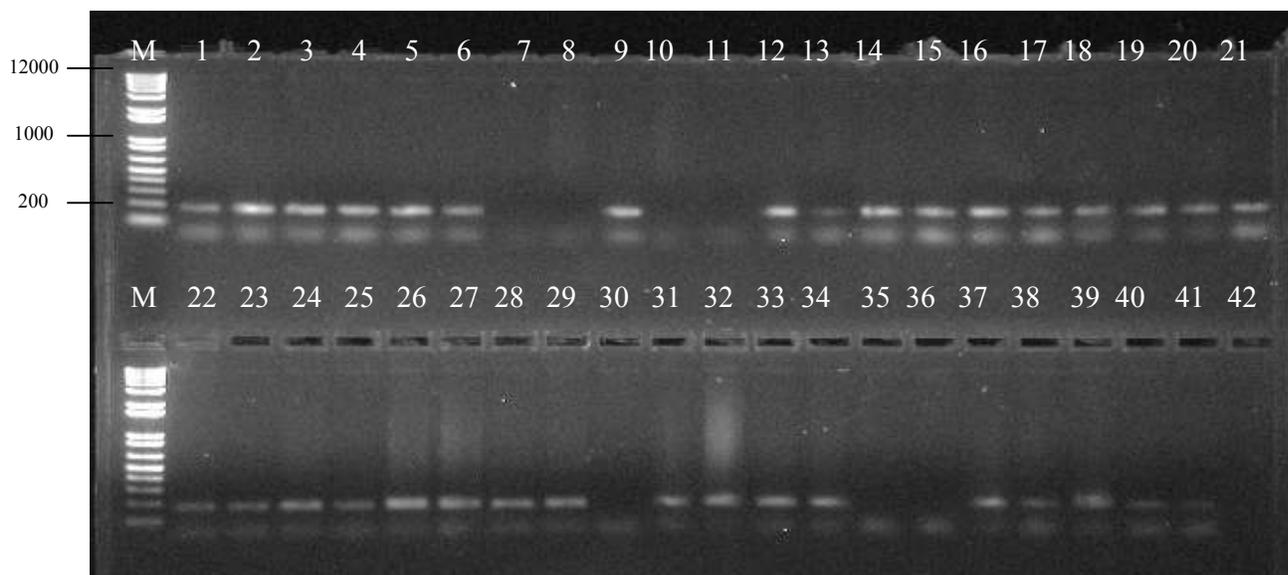
Médias com letras diferentes, na mesma linha, diferem p=0,05 pelo teste Tukey.

**Tabela 2:** Relação entre a frequência(em %) dos polimorfismos do gene 5HT2A e dados epidemiológicos da fibromialgia obtidos através da aplicação do questionário.

Genótipos	Poliúria	Depressão Familiar
C/C	25,80	22,22
T/T	25,80	25,93
C/T	48,40	51,85

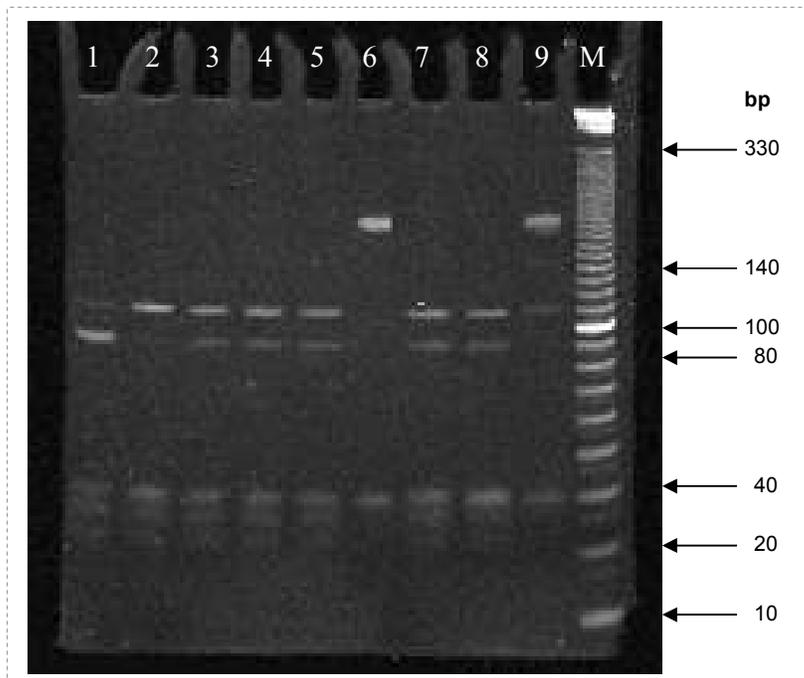
### 5.3 Detecção dos polimorfismos do gene COMT

O polimorfismo COMT é caracterizado pela transição G-A na posição 1947 no COMT. Na Figura 8 é possível observar um fragmento contendo 185pb.



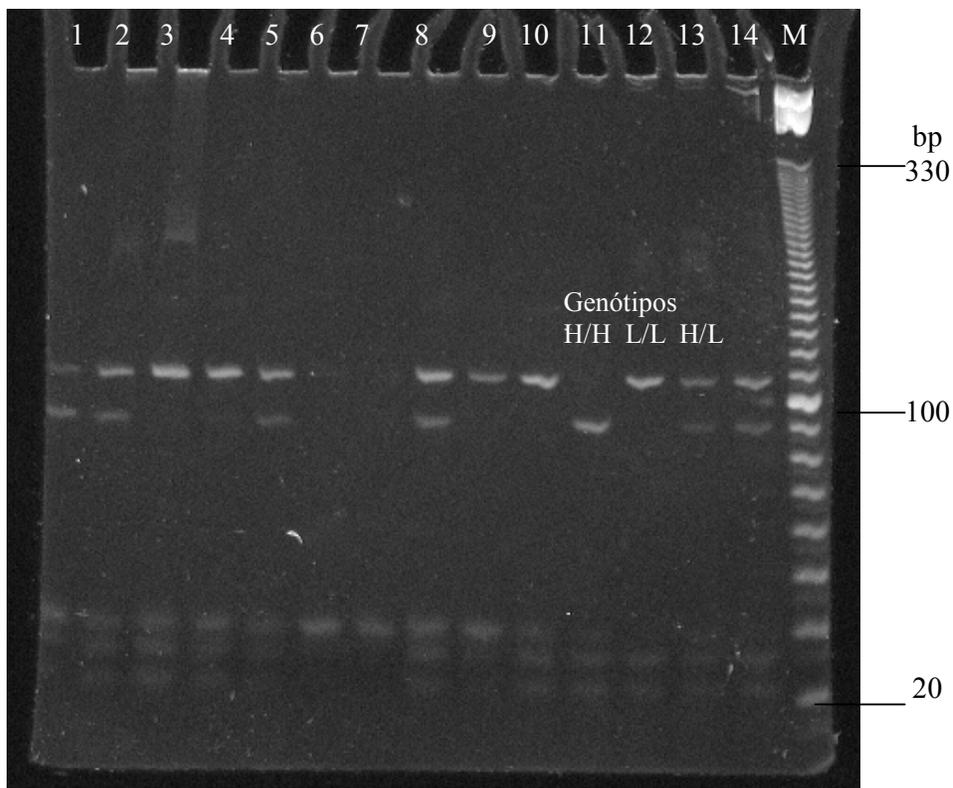
**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a amplificação da banda esperada de 185pb do DNA genômico extraído a partir das amostras de sangue coletadas.  
M- Marcador de peso molecular 1Kb Plus Invitrogen(1µg)  
Poços 1-41- DNA genômico de pacientes com fibromialgia  
Poço 42- Controles negativos

Na Figura 9, é possível observar a digestão do produto de PCR amplificado pelo primer COMT utilizando a enzima Hsp92 II.



**Figura 9:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8,0% demonstrando a digestão esperada do produto de PCR com o primer COMT.  
M- Marcador de peso molecular 10 bp Invitrogen(1 µg);  
Poço 1-9- produto de PCR de indivíduos controle.

O polimorfismo COMT é representado por três genótipos: genótipo L/L está presente um fragmento de 114pb, 36pb e 35pb; H/H 96pb, 35pb, 36pb e 18pb e o genótipo H/L O polimorfismo COMT é representado por três genótipos: genótipo L/L está presente um fragmento de 114pb, 36pb e 35pb; H/H 96pb, 35pb, 36pb e 18pb e o genótipo H/L 114pb, 96pb, 36pb, 35pb e 18pb. O fragmento de 18 pb é difícil de visualizar devido ao seu pequeno tamanho que é similar ao excesso de primer. Na Figura 10 é possível visualizar os três genótipos. No poço 11 temos um exemplo de genótipo H/H, no poço 12 o genótipo L/L, e na poço 13 o genótipo H/L.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 8,0% demonstrando a digestão esperada do produto de PCR com o primer COMT.

M- Marcador de peso molecular 10 bp Invitrogen(1µg);

A análise dos polimorfismos evidenciou que nos 51 pacientes com fibromialgia as frequências foram 15 L/L, 10 H/H, 26 H/L; e nos 51 indivíduos controle 17 L/L; 0 H/H; 34 HL, como podemos observar na Tabela 3 . Através da análise estatística pelo Teste Tukey no programa Sisvar com  $p= 0,05$ , os resultados demonstraram que os genótipos L/L e L/H não foram estatisticamente significativos para distinguir pacientes e controles. Entretanto o genótipo H/H demonstrou ser estatisticamente significativo, o que pode ser utilizado num teste diagnóstico, já que nenhum indivíduo da amostra controle não apresentou este genótipo. Os resultados do presente trabalho contradizem Gürsoy et al. (2003) que observou o genótipo H/H mais presente no grupo controle, e os genótipos L/L e L/H mais presente nos pacientes com fibromialgia. A diferença dos resultados pode ser devida a forma de análise dos resultados pois a digestão das amostras foi visualizada em gel de poliacrilamida 8%, enquanto

as de Gürsoy et al.(2003) em gel de agarose 4%, o que pode ter dificultado a visualização das bandas e conseqüentemente a frequência dos genótipos.

**Tabela 3:** Frequência dos polimorfismos do gene COMT dos pacientes com fibromialgia e indivíduos controle

Genótipo	N Pacientes (%)	N Controle (%)
L/L	29,41 <sup>a</sup>	33,33 <sup>a</sup>
L/H	50,98 <sup>a</sup>	66,67 <sup>a</sup>
H/H	19,61 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

Médias com letras diferentes, na mesma linha, diferem  $p=0,05$  pelo teste Tukey.

Wolfgang Sadée et al (2005) associaram os polimorfismos dos genes HTR2A, COMT, entre outros, com a resposta a determinados fármacos. Além disso, vários fatores contribuem para a variação de resposta à droga incluindo idade, sexo, peso corporal, nutrição, função dos órgãos, infecções, interação medicamentosa e fatores genéticos. A associação dos polimorfismos de genes codificadores de enzimas, transportadores e receptores de metabolização de drogas contribuem para a variabilidade à resposta para com fármaco, objetivo deste estudo da farmacogenética.

#### 5.4 Sequenciamento dos produtos de PCR amplificados

Os produtos de PCR foram seqüenciados para confirmar a amplificação da banda esperada e posterior digestão. A Figura 11 mostra a homologia da seqüência do produto de PCR com a do receptor de serotonina 5HT2A depositado no banco de dados.

```

Homo sapiens 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, mRNA
(cDNA clone MGC:103939 IMAGE:30915332), complete cds
Length=1480

Score = 601 bits (301), Expect = 4e-169
Identities = 340/346 (98%), Gaps = 2/346 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 5 ATCTGCTACAAGTTCTGGCTTAGACATGGATATTCTTTGTGAAGAAAATACTTCTTTGAG 64
      |||
Sbjct 3 ATCTGCTACAAGTTCTGGCTTAGACATGGATATTCTTTGTGAAGAAAATACTTCTTTGAG 62

Query 65 CTCAACTACGGAACCTCCCTAATGCAATTAAATGATGACACCAGGCTCTACAGTAATGACT 124
      |||
Sbjct 63 CTCAACTACG-AACTCCCTAATGCAATTAAATGATGACACCAGGCTCTACAGTAATGACT 121

Query 125 TTAACTCTGGAGAAGCTAACACTTCTGATGCATTTAACTGGRCAGTSGGRCTCTGAAAAAT 184
      |||
Sbjct 122 TTAACTCTGGAGAAGCTAACACTTCTGATGCATTTAACTGGACAGTCG-ACTCTGAAAAAT 180

Query 185 CGAMCCAACCTTTCCTGTGAAGGGTGCCTCTCACCGTCGTCTCTCCTTACTTCATCTC 244
      |||
Sbjct 181 CGAACCAACCTTTCCTGTGAAGGGTGCCTCTCACCGTCGTCTCTCCTTACTTCATCTC 240

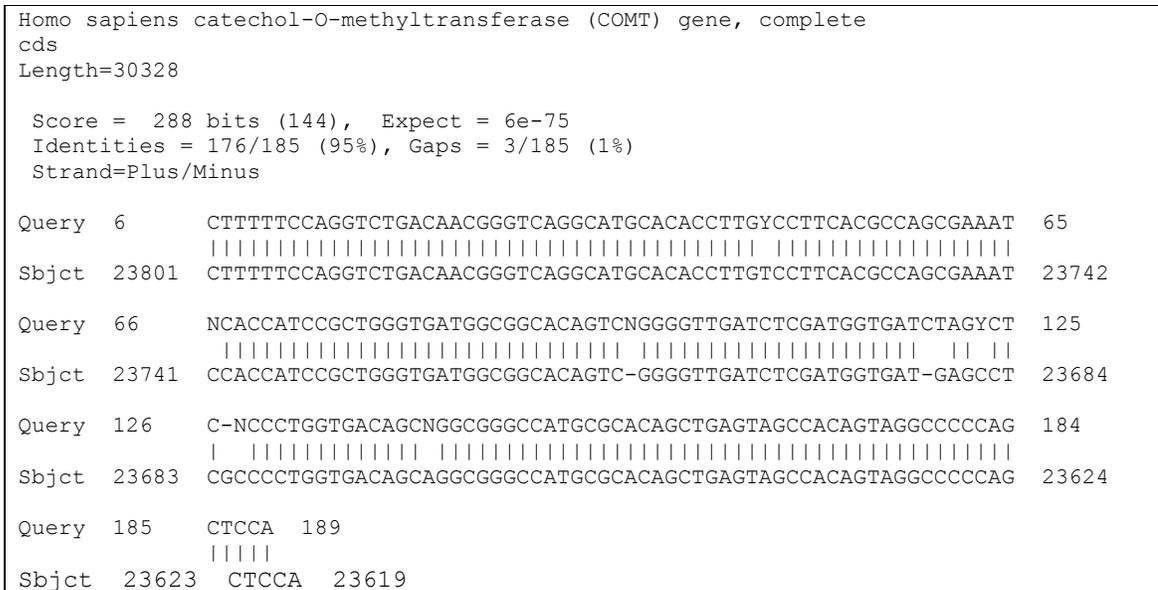
Query 245 CAGGaaaaaaaaCTGGTCTGCTTTACTGACAGCCGTAGTGATTATTCTAACTATTGCTGGA 304
      |||
Sbjct 241 CAGGAAAAAAACTGGTCTGCTTTACTGACAGCCGTAGTGATTATTCTAACTATTGCTGGA 300

Query 305 AACATACTCGTCATCATGGCAGTGTCCTTAGAGAAAAAGCTGCAGA 350
      |||
Sbjct 301 AACATACTCGTCATCATGGCAGTGTCCTTAGAGAAAAAGCTGCAGA 346

```

**Figura 11:** Alinhamento da sequência do produto de PCR com a sequência do gene receptor da serotonina depositada no banco de dados.

A Figura 12 mostra a homologia da seqüência do produto de PCR com a enzima Catechol-O-methyltransferase (COMT) depositado no banco de dados.



**Figura 12:** Alinhamento do produto de PCR com a seqüência do gene COMT depositada no banco de dados.

## 6. CONCLUSÃO

A análise do polimorfismo T102C do gene receptor 5HT2A demonstrou que os três genótipos (T/T, C/C, T/C) não apresentaram diferenças entre o grupo com fibromialgia e grupo controle. Porém, alguns sintomas típicos da fibromialgia podem estar associados ao genótipo T/C, como a poliúria e histórico familiar de depressão.

Os resultados do polimorfismo COMT demonstraram que os genótipos L/L e L/H não foram estatisticamente significativos para distinguir pacientes e controles. Entretanto o genótipo H/H demonstrou ser estatisticamente significativo, pois está presente apenas no grupo com fibromialgia.

## 7. REFERÊNCIAS

ANTÔNIO, S.F. Fibromialgia. **Rev Bras Med**, v.58, p. 215-223, 2001.

BERBER, J.S.S.; KUPEK, E.; BERBER, S.C. Prevalência de depressão e sua relação com a qualidade de vida em pacientes com síndrome da fibromialgia. **Rev Bras Reumatol**, v.45, n.2, p. 47-54, 2005.

BOIM, M.A.; SCHOR, N.; SANTOS, O.F.P. **Bases Moleculares da Biologia, da Genética e da Farmacologia**. Ed. Atheneu, São Paulo, v.1, 2003.

BONDY, B. et al. The T102C polymorphism of the 5HT2A receptor gene in fibromyalgia. **Neurobiology of disease**, v.6, p.433-439, 1999.

BRADY, D.M.; SCHNEIDER, M.J. Fibromyalgia syndrome: A new paradigm for differential diagnosis and treatment. **J Manipulative Physiol Ther**, v.24, p.529-541, 2001.

CAVALCANTE, A.B. et al. A prevalência de fibromialgia: uma revisão de Literatura. **Rev Bras Reumatol**, v.46, n.1, p. 40-48, 2006.

CHAITOW L. **Técnicas Neuromusculares Posicionais de Alívio da dor**. Ed. Manole, São Paulo, 2001.

CHAITOW L. **Síndrome da Fibromialgia – Um guia para o tratamento**. Ed. Manole, São Paulo, 2002.

DAVIS, M.C.; ZAUTRA, A.J.; REICH, J.W. Vulnerability to stress among women in chronic pain from fibromyalgia and osteoarthritis. **Ann Behav Méd**, v.23, p.215–226, 2001.

DOBBRO, E.R.L. **A música como terapia complementar no cuidado de mulheres com fibromialgia** [dissertação]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 1998.

FRANK, B. et al. Mutational analysis of serotonin receptor genes: HTR3A and HTR3B in fibromyalgia patients. **Clinical Rheumatology**, v.23, p.338-344, 2004.

GÜRSOY, S. et al. Association of T102C polymorphism of the 5-HT2A receptor gene with psychiatric status in fibromyalgia syndrome. **Rheumatol Int**, v.21, p.58-61, 2001.

GÜRSOY, S. et al. Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome. **Rheumatol Int**, v.23, p.104-107, 2003.

HAWLEY, D.J.; WOLFE, F. Pain, disability, and pain/disability relationships in seven rheumatic disorders: a study of 1.522 patients. **J Rheumatol**, v.18, p.1552-1557, 1991.

HELFENSTEIN, M.; FELDMAN, D. Síndrome da Fibromialgia: características clínicas e associações com outras síndromes disfuncionais. **Rev Bras Reumatol**, v.42, p.8-14, 2002.

YUNUS, M.B. et al. Fibromyalgia in men: Comparison of clinical features with women. **J Rheumatol**, v.27, n.2, p.485-490, 2000.

KAZIYAMA, H.H.S.; YENG, L.T.; TEIXEIRA, M.J. Síndrome Fibromiálgica. **Dor é coisa séria**. v.11, n.2, p.3-17, 2005.

LESCH, K.P. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. **Science**, v.274, n.5292, p.1527-1531, 1996.

MARTINEZ, J.E. et al. Avaliação seqüencial do impacto de fibromialgia e artrite reumatóide na qualidade de vida. **Rev Bras Reumatol**, v.34, p.309-316, 1994.

REILLY, P.A. Fibromyalgia in the workplace: a management problem. **Ann Rheum Dis**, v.52, p.249-251, 1993.

RUSSELL, I.J. Advances in fibromyalgia: possible role for central neurochemicals. **Am J Med Sci**, v.315, p.377-384, 1998.

SADÉE, W.; DAI, Z. Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine. **Human Molecular Genetics**, v.14, p.207-214, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITISCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** 2<sup>nd</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc Natl.Acad. Sci**, v.74, p.5463-5467, 1977.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 7ª ed. Ed LTC, Rio de Janeiro, 1999.

WHITE, K.P. et al. Comparing self-reported function and work disability in 100 community cases of fibromyalgia syndrome versus controls in London, Ontario. **Arthritis Rheum**, v.42, p.76-83, 1999.

WOLFE, F. et al. Serotonin levels, pain threshold, and fibromyalgia symptoms in the general population. **J Rheumatol**, v.243, p.555–559, 1997.

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, p.160-72, 1990.

## ANEXO 1:

### Questionário:

- 1- Idade?
- 2- Profissão?
- 3- Estado civil?
- 4- Tem filhos? Quantos?
- 5- A quanto tempo você está sentindo dor?
- 6- A quanto tempo foi diagnosticado a Fibromialgia?
- 7- Já vez ou está fazendo algum tratamento para Fibromialgia? Quais?
- 8- Você usa medicamentos antiinflamatórios? Quais?
- 9- Qual a dosagem?
- 10- Quais os efeitos colaterais?
- 11- Você está tomando relaxantes musculares? Se estiver, quais são eles?
- 12- Qual a dosagem?
- 13- Quais os efeitos colaterais?
- 14- Que outros tratamentos você fez ou está fazendo para relaxar a tensão muscular?  
( )Massagem ( )Acupuntura ( )Aplicação de calor ou frio ( )Alongamento  
( )Injeção nos pontos dolorosos ( )Outros \_\_\_\_\_
- 15- Você está tomando antidepressivos?
- 16- Qual a dosagem?
- 17- Quais os efeitos colaterais?
- 18- Você está tomando medicamentos para controlar a ansiedade?
- 19- Qual a dosagem?
- 20- Quais os efeitos colaterais?
- 21- Como a dor afetou sua maneira de trabalhar, se divertir e executar outras atividades?
- 22- Além da dor, que outros sintomas você experiência (Fadiga, insônia, depressão etc)?
- 23- Para você o que significa sentir dor?
- 24- Alguém da sua família tem Fibromialgia? Qual o grau parentesco?
- 25- Qual a frequência de vontade de urinar?
- 26- Algum parente tem histórico de depressão?
- 27- Se for o caso, quais os efeitos colaterais e/ou efeitos benéficos observados com o tratamento fitoterápico? Qual a dosagem e tempo de tratamento?

ANEXO 2:



Ribeirão Preto, 29 de Novembro de 2005.

Prezada Senhora,

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa da UNAERP - Universidade de Ribeirão Preto analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado **“Detecção de polimorfismos genéticos em pacientes com fibromialgia e avaliação do efeito sedativo de Valeriana Officinalis em ratos submetidos a dor exagerada após estimulação sensorial”**, tendo como pesquisadora **“Profª Ana Lúcia Fachin Saltoratto”**, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em reunião ocorrida na data de *29 de Novembro de 2005*, registrado sobre o **Comét: 054/05**.

Temos ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

Solicitamos que a senhora encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança/toxicidade da medicação para que possamos fazer o devido acompanhamento deste estudo.

Atenciosamente,



**Profª M. Sc. Luciana Rezende Alves Oliveira**  
**Coordenadora do Comitê em Pesquisa da UNAERP**  
**Universidade de Ribeirão Preto**

ANEXO 3:



Ribeirão Preto, 21 de Março de 2006.

Prezada Senhora,

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa da UNAERP - Universidade de Ribeirão Preto analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado **“Detecção de polimorfismos genéticos em pacientes com fibromialgia e avaliação do efeito sedativo de Valeriana Officinalis em ratos submetidos a dor exagerada após estimulação sensorial”**, tendo como pesquisadora **“Profª Ana Lúcia Fachin Saltoratto”**, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em reunião ocorrida na data de *29 de Novembro de 2005*, registrado sobre o **Comét: 008/06**.

Temos ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

Solicitamos que a senhora encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança/toxicidade da medicação para que possamos fazer o devido acompanhamento deste estudo.

Atenciosamente,



**Prof. Dr. Luciana Rezende Alves Oliveira**  
**Coordenadora do Comitê em Pesquisa da UNAERP**  
**Universidade de Ribeirão Preto**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)