

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Elizandra Leal Steffen

**QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PACIENTES
COM FIBROMIALGIA SUBMETIDOS A TERAPIA
COM ACUPUNTURA**

Santa Maria, RS

2021

ELIZANDRA LEAL STEFFEN

**QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PACIENTES
COM FIBROMIALGIA SUBMETIDOS A TERAPIA COM ACUPUNTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva
Co-Orientadora: Profa. Dra. Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, RS

2021

Steffen, Elizandra Leal
QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PACIENTES COM
FIBROMIALGIA SUBMETIDOS A TERAPIA COM ACUPUNTURA /
Elizandra Leal Steffen.- 2021.
72 p.; 30 cm

Orientador: José Edson Paz da Silva
Coorientadora: Micheli Mainardi Pillat
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. Fibromialgia 2. Acupuntura 3. Biomarcadores 4.
Inflamação 5. Citocinas I. Silva, José Edson Paz da II.
Pillat, Micheli Mainardi III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

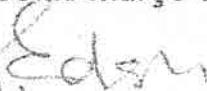
Declaro, ELIZANDRA LEAL STEFFEN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

ELIZANDRA LEAL STEFFEN

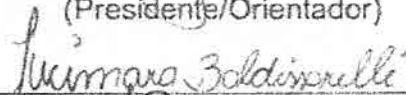
QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PACIENTES
COM FIBROMIALGIA SUBMETIDOS A TERAPIA COM ACUPUNTURA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

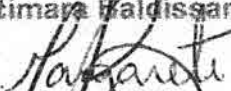
Aprovada em 05 de março de 2021



José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Jucimara Baldissarelli, Dra (UFPel)



Margarete Bagatini, Dra (UFFS)



Liliiane de Freitas Bauermann, Dra (UFSM)



Marli Matiko Ankaru de Campos, Dra (UFSM)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meus pais, Nelson (in memoriam) e Iracema, meu esposo, Altair José e nossos filhos Isabella e Benício. Esta conquista é de todos nós!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a dádiva da vida à Deus.

Aos meus pais, pelas oportunidades que me proporcionaram durante toda minha vida escolar e acadêmica.

A minha irmã, Magnólia, pelas palavras de motivação e amizade.

Ao meu esposo, Altair, pela cumplicidade, paciência e ajuda indispensável com nossos filhos, Isabella e Benício, nos momentos em que estive ausente, trabalhando na presente tese.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Edson Paz da Silva, pela oportunidade, confiança, paciência e amizade ao longo da minha trajetória como mestranda e doutoranda. Serei eternamente grata.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Micheli Mainardi Pillat, por ter prontamente aceito conduzir as dosagens das citocinas mensuradas nesta pesquisa e, posteriormente ter aceito o convite de co-orientação. Exemplo de profissional altamente qualificada e generosa.

Ao fisioterapeuta e Ms. em Reabilitação Funcional, Gustavo Urbanetto Baelz, pelo comprometimento e profissionalismo na realização das sessões de acupuntura nas pacientes com fibromialgia captadas para esta pesquisa.

Ao Corpo Clínico do Setor de Reumatologia do Hospital Universitário de Santa Maria por ter nos encaminhado pacientes com diagnóstico de fibromialgia para compor a amostra deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rafael Noal Moresco e seus alunos do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica por terem efetuado as análises bioquímicas deste trabalho.

A Prof. Dra. Daniela B. Rosa Leal por ter prontamente cedido o uso do citômetro de fluxo do Departamento de Microbiologia e Parasitologia para a análise das citocinas.

A todas as pacientes, tanto aquelas com fibromialgia quanto as captadas para o controle, por terem acreditado na seriedade da nossa pesquisa e terem aceito participar da mesma.

Ao Centro de Ciências da Saúde da UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de ter realizado este trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Farmácia da UFSM que de uma forma ou outra contribuíram na logística deste trabalho.

Aos demais familiares e amigos que emanaram boas energias e palavras de incentivo para que este trabalho fosse realizado e finalizado com sucesso.

A Comissão Examinadora por dispor do seu tempo para avaliar a presente tese.

A todos que estão comemorando comigo de perto e de longe esta conquista!

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PACIENTES COM FIBROMIALGIA SUBMETIDOS A TERAPIA COM ACUPUNTURA

AUTORA: Elizandra Leal Steffen
ORIENTADOR: Dr. José Edson Paz da Silva
CO-ORIENTADORA: Dra. Micheli Mainardi Pillat

A fibromialgia (FM) é uma síndrome caracterizada por dor crônica, difusa e sintomas sistêmicos. Sua etiologia e patogênese ainda não estão completamente elucidadas. A terapia empregada na FM consiste preponderantemente na utilização de medicamentos (analgésicos, anti-inflamatórios, antidepressivos e relaxantes musculares), no entanto, terapias, não-farmacológicas, como a acupuntura vem se destacando no tratamento desta síndrome pelo fato de proporcionar alívio da dor e maior bem-estar físico aos pacientes. A presente pesquisa teve por objetivo quantificar e avaliar os níveis de biomarcadores laboratoriais, destacando-se algumas citocinas pró- e anti-inflamatórias em pacientes com FM submetidos a acupuntura. Um total de 40 pacientes do sexo feminino entre 20 e 60 anos, com diagnóstico de FM segundo os critérios da *American College of Rheumatology*, foram randomizadas em dois grupos: Acupuntura - A (n= 20), o qual recebeu acupuntura real e *Sham* – S (n=20), o qual recebeu acupuntura placebo. As intervenções ocorreram uma vez por semana, durante quatro semanas consecutivas, com duração de 30 minutos cada. As pacientes foram submetidas a duas coletas sanguíneas: uma antes da primeira sessão de A ou S e, outra, após a quarta e última sessão das intervenções. Um terceiro grupo (controle - C), composto por 16 mulheres saudáveis, foi submetido à uma única coleta sanguínea, sem intervenção alguma. Os resultados obtidos através do hemograma completo, colesterol total, triglicerídeos, ácido úrico, creatinina, proteína C reativa, creatinoquinase, interleucina-2, interleucina-4, interleucina-6, interleucina-10, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-17A foram analisados no software IBM SPSS Versão 25, admitindo-se significância de 5%. Valores significativamente aumentados na amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos, ácido úrico, proteína C reativa e triglicerídeos foram detectados nas pacientes com FM (A e S) em relação ao controle, antes das intervenções com acupuntura. Houve uma diferença significativa na contagem de plaquetas do grupo A em relação ao grupo S, antes das intervenções, porém, após 4 semanas de acupuntura, ambos os grupos não apresentaram diferença significativa na contagem de plaquetas. Entre as citocinas dosadas, as pacientes fibromiálgicas apresentaram níveis séricos reduzidos de TNF- α e níveis séricos aumentados de IFN- γ em comparação ao controle, antes das intervenções. Observou-se que pacientes com FM apresentam alguns resultados bioquímicos, hematológicos e imunológicos alterados em relação ao controle. No entanto, a acupuntura não alterou os níveis de citocinas significativamente.

Palavras-chave: Fibromialgia. Acupuntura. Biomarcadores. Inflamação. Citocinas.

ABSTRACT

STUDIES INVOLVING LABORATORY MARKERS IN PATIENTS WITH FIBROMYALGIA UNDERGOING ACUPUNCTURE THERAPY

AUTHOR: Elizandra Leal Steffen
ADVISOR: Dr. José Edson Paz da Silva
CO- ADVISOR: Dra. Micheli Mainard Pillat

Fibromyalgia (FM) is a syndrome characterized by chronic, diffuse pain and systemic symptoms. Its etiology and pathogenesis are still not completely understood. The therapy used in FM mainly consists of the use of medications (analgesics, anti-inflammatories, antidepressants and muscle relaxants), however, non-pharmacological therapies, such as acupuncture, have stood out in the treatment of this syndrome because it provides pain relief and greater physical well-being for patients. The present research aimed to quantify and evaluate the levels of laboratory biomarkers, highlighting some pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with FM undergoing acupuncture. A total of 40 female patients between 20 and 60 years old, diagnosed with FM according to the criteria of the American College of Rheumatology, were randomized into two groups: Acupuncture - A (n = 20), which received real acupuncture and Sham - Y (n = 20), who received placebo acupuncture. The interventions took place once a week, for four consecutive weeks, lasting 30 minutes each. The patients underwent two blood samples: one before the first session of A or S and another after the fourth and last session of interventions. A third group (control - C), composed of 16 healthy women, was submitted to a single blood collection, without any intervention. The results obtained through the complete blood count, total cholesterol, triglycerides, uric acid, creatinine, C-reactive protein, creatinokinase, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, interleukin-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin-17A were analyzed using IBM SPSS Version 25 software, assuming a significance of 5%. Significantly increased values in the distribution range of red blood cells, uric acid, C-reactive protein and triglycerides were detected in patients with FM (A and S) in relation to control, before acupuncture interventions. There was a significant difference in the platelet count of group A compared to group S, before the interventions, however, after 4 weeks of acupuncture, both groups did not show significant difference in the platelet count. Among the dosed cytokines, fibromyalgia patients had reduced serum levels of TNF- α and increased serum levels of IFN- γ compared to control, before interventions. It was observed that patients with FM have some altered biochemical, hematological and immunological results in relation to the control. However, acupuncture did not change cytokine levels significantly.

Keywords: Fibromyalgia. Acupuncture. Biomarkers. Inflammation. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Pontos sensíveis na fibromialgia	20
MANUSCRITO I	
Figure 1: Flow chart of the participants included in the study	40
Figure 2: Points used in acupuncture treatment. Pericardium 6 (PC6); Heart 7 (H7); Stomach 36 (ST36); Liver 2 (LVR2); Large intestine 4 (LI4); Spleen 6 (SPL6), bilaterally	41
Figure 3: Cytokine (IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10) profiles in serum in healthy control and FM (fibromyalgia) groups. The cytokines were analyzed by flow Cytometry (Cytometric Bead Array). The measurements were performed on BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer and analyzed with FlowJo V10 software. Data presented as median (pg/mL) \pm SEM	42
Figure 4: Cytokine (IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10) profiles in serum in FM (fibromyalgia) patients after sham or acupuncture therapy. The Cytokines were analyzed by flow Cytometry (Cytometric Bead Array). The measurements were performed on BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer and analyzed with FlowJo V10 software. Data presented as median (pg/mL) \pm SEM	43

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Table 1:	Characteristics of patients with fibromyalgia versus healthy control	37
Table 2:	Evaluation of biomarkers in patients with fibromyalgia (FM) versus healthy control	38
Table 3:	Evaluation of routine biomarkers before and after interventions in the acupuncture and sham groups in fibromyalgia patients, respectively	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	acupuntura
FM	fibromialgia
SFM	síndrome da fibromialgia
g/L	gramas/decilitro
Hg	hemoglobina
IL-10	interleucina-10
IL-1RA	receptor antagonista interleucina-1
IL-1 β	interleucina-1 beta
IL-2	interleucina-2
IL-4	interleucina-4
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IMC	índice de massa corpórea
IL-1 α	interleucina-1 alfa
IL-35	interleucina-35
mg/dL	miligramas/decilitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
EVA	escala visual análogica
PCR-US	proteína C reativa ultrasensível
PLT	plaquetas
CK	creatina-quinase
Ht	hematócrito
RBC	contagem glóbulos vermelhos
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
RDW	amplitude de distribuição das células vermelhas
S	<i>sham</i> (acupuntura placebo)
SNC	sistema nervoso central
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
rpm	rotações por minuto
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
IFN - γ	gama interferon
U/L	unidades/litro
WBC	contagem de glóbulos brancos

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	14
2	INTRODUÇÃO	15
3	OBJETIVOS	17
3.1	OBJETIVO GERAL	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1	FIBROMIALGIA	18
4.1.1	Epidemiologia da FM	18
4.1.2	Etiologia e patogênese da FM	19
4.1.3	Diagnóstico da FM	19
4.2	TESTES LABORATORIAIS NA FM	20
4.2.1	Perfil hematológico na FM	20
4.2.2	Perfil lipídico na FM	21
4.2.3	Proteína C reativa na FM	21
4.2.4	Perfil de Citocinas na FM	21
4.3	FORMAS DE TRATAMENTO DA FM	22
4.3.1	Acupuntura no tratamento da FM	23
4.4	BRADICININA, COVID-19 E FIBROMIALGIA	24
5	MANUSCRITOS	27
5.1	MANUSCRITO I	26
	Abstract	27
	Introduction	27
	Material and Methods	29
	Results	31
	Discussion	32
	References	34
5.2	MANUSCRITO II	44
	Highlights	45
	Bradykinin in SARS-CoV-2 infection	46
	Bradykinin in Fibromyalgia	47
	BK Effects on the nervous system: Involvement in symptoms of SARS-CoV infection and Fibromyalgia?	48
	Therapeutic alternatives by blocking the Kallikrein-kinin system .	49
	References	50
6	ARTIGO CIENTÍFICO	53
7	DISCUSSÃO	56
8	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICES	62
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	63
	APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO	67

APÊNDICE C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO I	69
APÊNDICE D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II	71

1 APRESENTAÇÃO

As seções Material e Métodos e Resultados encontram-se no Manuscrito I. Os itens Discussão e Conclusão encontram-se no final da tese e apresentam comentários gerais sobre os manuscritos I, II e III, contidos neste trabalho. As Referências, referem-se somente as citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão desta tese, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração dos manuscritos (I e II) e do artigo científico (III) estão mencionadas nos mesmos. O manuscrito I foi submetido para a *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, o manuscrito II foi submetido para a *Immunology Letter*; e o artigo III foi publicado na *Annals of Clinical Immunology and Microbiology*.

2 INTRODUÇÃO

A Fibromialgia (FM) é uma condição reumática que acomete cerca de 2% da população e que afeta principalmente mulheres (ELMAS et al., 2016). A Síndrome da Fibromialgia (SFM) é caracterizada por dor musculoesquelética difusa e crônica. Além da dor, vários outros sintomas compreendem o quadro clínico de FM, entre eles, estresse, fadiga, distúrbios do sono, distúrbios cognitivos, parestesias de extremidades, rigidez matinal e alterações psicológicas, como depressão e ansiedade (ELMAS et al., 2016; FEIBERG et al., 2017).

A complexidade e quantidade de sintomas da FM, demonstrados pelos pacientes, sugerem uma etiologia multifatorial para esta condição. Alterações genéticas, cognitivas comportamentais, neuroendócrinas e imunológicas parecem interagir, resultando na gênese e evolução do quadro clínico da FM (FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012; ERNERG et al., 2018).

Por sua vez, o envolvimento do sistema imunológico na SFM vem sendo alvo de estudos constantemente. Um distúrbio no perfil de citocinas pró- e anti-inflamatórias tem sido apontado como uma possível causa da doença, mediante os sinais clínicos de dor exorbitante apresentados pelos pacientes (FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012; ERNBERG et al., 2018). Embora, em alguns casos, os achados, sejam contraditórios e inconclusivos, a maioria deles apoia a participação da resposta imune no início e na perpetuação dos sintomas mostrados pelos pacientes com FM (FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012).

A heterogeneidade de sintomas apresentada pelos fibromiálgicos somada a inexistência de um achado físico ou teste de laboratório específico para a FM dificulta o diagnóstico desta condição (ELMAS et al., 2016). Desta forma, o diagnóstico de FM continua sendo exclusivamente clínico, com base no histórico (sintomas) e exame clínico (detecção dos pontos dolorosos) do paciente (FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012; ERNBERG et al., 2018). No entanto, vários testes sanguíneos são recomendados na triagem de pacientes com suspeita de FM para excluir diagnósticos alternativos, mas ainda não está claro se estes, efetivamente contribuem para o processo diagnóstico da síndrome (ELMAS et al., 2016; LESUIS et al., 2016).

Por sua vez, o tratamento ideal da FM requer uma abordagem multidisciplinar com a combinação de modalidades farmacológicas e não-farmacológicas, pois a terapia medicamentosa (antidepressivos, relaxantes musculares, analgésicos, anti-

inflamatórios não esteroidais, etc.) de forma isolada não promove a remissão completa dos sintomas (HEYMANN et al., 2010; STIVAL et al., 2014; HAÜSER et al., 2017; ERNBERG et al., 2018). A acupuntura, modalidade de terapia não medicamentosa, produz efeitos neurobiológicos que interferem sobre os neurotransmissores relacionados à dor crônica e depressão e tem proporcionado alívio da dor em indivíduos com FM. (MARTINEZ; MACIAS, 2012; STIVAL et al., 2014).

Diante deste contexto, a presente pesquisa justifica-se pela busca por evidências que conduzam a um maior entendimento acerca do comportamento de biomarcadores, destacadamente as citocinas, em indivíduos com FM, tanto antes quanto após receberem acupuntura.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento de biomarcadores laboratoriais, destacando-se algumas citocinas pró- e anti-inflamatórias em pacientes com FM antes e após 4 semanas de terapia com acupuntura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar e comparar parâmetros hematológicos (hemograma completo), bioquímicos (colesterol total, triglicerídeos, ácido úrico, creatinina e creatina quinase) e inflamatórios (proteína C reativa e citocinas pró- e anti-inflamatórias: interleucina-2, interleucina-4, interleucina-6, interleucina-10, fator de necrose tumoral-alfa, interferon-gama e interleucina 17-A) de pacientes com FM (grupos A e S) com um grupo controle;

- Analisar os resultados dos parâmetros hematológicos (hemograma completo), bioquímicos (colesterol total, triglicerídeos, ácido úrico, creatinina e creatina quinase) e inflamatórios (proteína C reativa e citocinas pró- e anti-inflamatórias: interleucina -2, interleucina-4, interleucina-6, interleucina-10, fator de necrose tumoral-alfa, interferon-gama e interleucina 17-A) intragrupos A e S, respectivamente, antes e após 4 semanas de intervenção;

- Verificar o comportamento dos parâmetros hematológicos (hemograma completo), bioquímicos (colesterol total, triglicerídeos, ácido úrico, creatinina e creatina quinase) e inflamatórios (proteína C reativa e citocinas pró- e anti-inflamatórias: interleucina -2, interleucina-4, interleucina-6, interleucina-10, fator de necrose tumoral-alfa, interferon-gama e interleucina 17-A), após 4 semanas de intervenção, nos grupos A x S.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 FIBROMIALGIA

A FM é uma síndrome de dor reumática crônica, não articular, caracterizada por mialgias generalizadas e aumento da sensibilidade a palpação de diferentes pontos do corpo. Trata-se de um estado de saúde complexo e heterogêneo no qual ocorre um distúrbio no processamento da dor caracterizado por alodinia (resposta dolorosa a um estímulo normalmente inócuo) e hiperalgesia (reação extremamente dolorosa a um estímulo geralmente doloroso) associado a outras características secundárias (HEYMANN et al., 2010; FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012; FEINBERG et al., 2017; HAÜSER et al., 2017).

Esta síndrome é tipicamente acompanhada de rigidez matinal, sensibilidade à ruído alto, luz forte e temperaturas extremas (FEINBERG et al., 2017). Além disso, sintomas como depressão, ansiedade, enxaqueca, cefaleia tensional, problemas digestivos (síndrome do intestino irritável, refluxo gástrico), bexiga irritável ou hiperativa, dor pélvica e disfunção temporomandibular costumam estar associados à FM, podendo variar em intensidade no mesmo indivíduo e ser agravado pelo estresse (AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 2018).

4.1.1 Epidemiologia da FM

A FM é a segunda enfermidade reumática mais frequente em todo o mundo, afetando aproximadamente 2% da população (MARTINEZ; MACIAS, 2012; HAÜSER et al., 2017). Uma revisão acerca desta enfermidade relatou a prevalência média global de 3,1 % nas Américas, 2,5% na Europa e 1,7% na Ásia (HAÜSER et al., 2017). A FM afeta ambos os sexos e pessoas de todas as idades, no entanto 80 a 90% são mulheres de meia-idade. Ainda, membros da família de pacientes com FM tem um maior risco de ter esta síndrome (HAÜSER et al., 2017).

No Brasil, a FM acomete cerca de 3% da população, mais frequentemente mulheres entre 30 e 55 anos, porém, não se restringe a este sexo ou faixa etária (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2018). Em um estudo realizado em Montes Claros, MG, por exemplo, a FM foi a segunda doença reumatológica mais frequente e observou-se prevalência de 2,5% na população, sendo a maioria do

gênero feminino, das quais 40,8% encontravam-se entre 35 e 44 anos (HEYMANN et al., 2010).

4.1.2 Etiologia e patogênese da FM

Apesar da FM ser uma síndrome bastante antiga foi na década de 70 com os avanços da investigação clínica e laboratorial que o conceito atual desta síndrome começou a se estruturar, desde então, vem sendo mais profundamente estudada nas últimas três décadas (HEYMANN et al., 2010; MARTINEZ; MACIAS, 2012). Todavia, ainda não se alcançou um consenso unânime entre clínicos e pesquisadores sobre a etiologia e patogênese da FM até os dias de hoje (FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012; HAÜSER et al., 2017).

São várias as especulações exploradas para compreender os mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam a FM, dentre elas: a função do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal; anomalias na função do processamento sensorial; fatores de perfil psicológico e de comportamento; alterações do sono e musculares e mais recentemente fatores genéticos (genes do transportador de serotonina 5, catecol-O-metiltransferase e o receptor D4 de dopamina) (MARTINEZ; MACIAS, 2012; ERNBERG et al., 2018).

4.1.3 Diagnóstico da FM

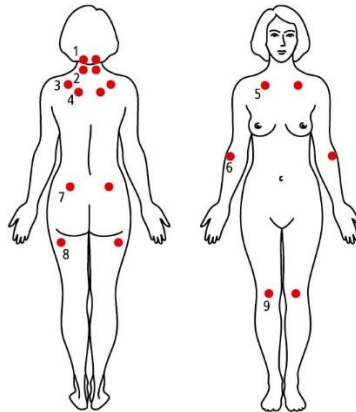
Embora a FM esteja associada com vários sintomas, ainda não há um achado específico ou teste laboratorial diagnóstico para esta síndrome. Assim, o exame físico e testes laboratoriais são muito úteis na descoberta da FM (ELMAS et al., 2016).

O diagnóstico clínico da FM é guiado pelos critérios estipulados pelo Colegiado Americano de Reumatologia, tais como:

- Dor crônica e difusa verificada em pelo menos 11 dos 18 pontos dolorosos pré-definidos nos quatro quadrantes corporais (Figura 1), durante a semana antecedente ao exame, mais o nível de gravidade dos seguintes sintomas físicos: fadiga, problemas cognitivos (memória/raciocínio), problemas com sono, dentre outros.
- Duração dos sintomas por pelo menos 3 meses ou nível semelhante;

- Nenhum outro problema de saúde que poderia explicar a dor e demais sintomas (HEYMANN et al., 2010; AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 2015; FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012).

Figura 1 – Pontos sensíveis na fibromialgia



1. Inserções do músculo suboccipital.
2. Espaços intertransversais C5-C7.
3. Ponto médio da borda superior do músculo trapézio.
4. Inserção do músculo supraespinhal acima da borda medial da espinha escapular.
5. Segunda junção costocostal.
6. 2 cm distal ao epicôndilo lateral do úmero.
7. Quadrantes superiores externos das nádegas.
8. Posterior à proeminência trocantérica.
9. Côndilo femoral medial.

Fonte: Adaptado de Garwal et al. (2021).

4.2 TESTES LABORATORIAIS NA FM

4.2.1 Perfil hematológico na FM

Pressupõe-se que testes laboratoriais de rotina, como o hemograma completo, esteja dentro do intervalo normal de valores em pacientes com FM (ELMAS et al., 2016), no entanto poucas publicações comparam os níveis de biomarcadores laboratoriais rotineiros de pacientes com FM com os níveis de pacientes saudáveis. Em 2016, Elmas et al. avaliando vários parâmetros fisiológicos em mulheres com FM e comparando a um grupo controle verificaram dentre todos os biomarcadores dosados (hemoglobina, contagem de células brancas, contagem de plaquetas e níveis de proteína C reativa) um aumento, apenas, na contagem de plaquetas das pacientes com FM em relação às pacientes saudáveis.

4.2.2 Perfil lipídico na FM

Devido ao fato de muitos pacientes com FM apresentarem maior prevalência de sobrepeso e obesidade que a população em geral (CORDERO et al., 2014), a relação entre obesidade e sensibilidade não articular começou a ser mais estudada. Uma pesquisa desenvolvida pela Associação Nacional de Fibromialgia dos Estados Unidos, que envolveu cerca de 2500 participantes, identificou várias questões acerca dos hábitos e cuidados com a saúde que pacientes com FM devem ter e o impacto da obesidade nesta síndrome (CORDERO et al., 2014). Os pesquisadores encontraram uma correlação significativa entre o índice de massa corpórea (IMC), sintomas clínicos e perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos, etc.) em pacientes fibromiálgicos, alertando para a importância de programas de tratamento que incorporem estratégias para perda de peso, incluindo mudanças no estilo de vida com dieta adequada e atividade física de baixo impacto (CORDERO et al., 2014).

4.2.3 Proteína C reativa na FM

Acredita-se que a proteína C reativa (PCR), que antes era considerada um biomarcador de infecção subjacente ou injúria tecidual, também reflita uma inflamação sistêmica crônica e é considerada um biomarcador pró-inflamatório confiável frequentemente incluído no diagnóstico laboratorial das doenças reumatológicas (FEINBERG et al., 2017).

FEINBERG et al. (2017), investigando a relação entre os níveis da PCR sérica com a FM constatou uma associação positiva em pacientes com FM (5,54 mg/dL) comparado ao Controle (3,75 mg/dL). Resultado este, em parte, explicado por fatores o IMC, comorbidades associadas, humor prejudicado e distúrbios do sono.

4.2.4 Perfil de Citocinas na FM

As citocinas são pequenas proteínas não estruturais secretadas por células específicas do sistema imunológico em resposta a um estímulo e atuam como mensageiras químicas entre as células. Também estão envolvidas em processos como crescimento e diferenciação celulares, reparação dos tecidos e modulação de

respostas imunológicas agudas e crônicas (FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012).

O interesse pelas citocinas, como potenciais mediadores de sintomas na FM, começou em 1988 quando Wallace, Margolin & Waller, relataram o início agudo de sintomas de FM (dor, fadiga, distúrbios do sono e do humor) em pessoas com carcinoma terminal de células renais e melanoma, as quais eram tratadas com IL-2. Desde então, a relação entre citocinas, dor e FM vem sendo amplamente estudada, baseando-se na hipótese de associação entre estas variáveis (RANZOLIN, 2016).

As citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1 e Th17) ou anti-inflamatórias (Th2) (OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos clínicos têm evidenciado uma associação da FM com a desregulação dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, efetuando a disfunção neural da dor relacionada com neurotransmissores. As citocinas tradicionalmente classificadas como pró-inflamatórias: interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e, citocinas anti-inflamatórias: interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10), induzem determinados sintomas consoantes a sua concentração, tais como: fadiga, febre, sono, dor e mialgia, todos observados em pacientes com FM (HERNANDEZ et al., 2010; FERNANDES; MARECO; JALECO, 2012; RANZOLIN et al., 2016).

As citocinas foram agrupadas em interleucinas (IL, numerada sequencialmente de IL-1 a IL-35), fatores de necrose tumoral (FNT), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBURN et al., 2002; SOMMER C & WHITE F., 2010) Na presente tese foram analisadas as citocinas: interleucina-2, interleucina-4, interleucina-6, interleucina-10, interleucina-17A, interferon-gama e fator de necrose tumoral.

4.3 FORMAS DE TRATAMENTO DA FM

Os recursos terapêuticos utilizados na FM e recomendados pela Sociedade Brasileira de Reumatologia, são paliativos. Eles estão voltados apenas para a melhora dos sintomas, sem cura definitiva da síndrome. Para tratar a FM de forma adequada

o ideal é que haja uma abordagem multidisciplinar, individualizada, com a combinação de terapêutica farmacológica (analgésicos, anti-inflamatórios, antidepressivos, relaxantes musculares) e não farmacológica (exercícios musculoesqueléticos, alongamento, fortalecimento muscular, reabilitação e fisioterapia, relaxamento, terapia cognitivo-comportamental, acupuntura, entre outros.) (HEYMANN et al., 2010; MARTINEZ; MACIAS, 2012; HAÜSER et al., 2017).

Classes terapêuticas como a dos relaxantes e sedativos, que melhoram a dor, os transtornos do sono e humor; bloqueadores da recaptção de serotonina, com efeito analgésico periférico e central e benzodiazepínicos, para os transtornos de sono são bastante consumidos por pacientes com FM. Medicamentos à base de duloxetina, pregabalina e tramadol são utilizados na presença de dor severa e medicamentos à base de amitriptilina, ciclobenzaprina e, também, a pregabalina na presença de distúrbios do sono (HAÜSER et al., 2017).

Como terapia não farmacológica recomenda-se a realização de exercícios aeróbicos de baixo impacto como dança, hidroginástica, natação ou caminhada, por exemplo. Outro recurso terapêutico importante é o suporte psicológico para pacientes com FM, devido aos distúrbios psiquiátricos, provavelmente envolvidos (PASSOS; VILAS BÔAS; VIEIRA, 2016).

4.3.1 Acupuntura no tratamento da FM

Um recurso terapêutico não farmacológico que vem sendo cada vez mais procurado e utilizado por portadores de FM é a acupuntura. Esta técnica se fundamenta na ativação de sistemas endógenos de controle da dor, alteração no processamento sensorial do sistema nervoso central (aumento do limiar da dor) e modificações na codificação do hipotálamo (sistema nervoso autônomo) (MARTINEZ; MACIAS, 2012). A acupuntura além de minimizar a dor, presente na FM, supre a necessidade de se reduzir o consumo exacerbado de medicamentos e conseqüentemente os custos como os mesmos.

As investigações científicas sobre a influência da acupuntura no tratamento da FM centram na avaliação desta técnica sobre a dor, bem-estar global, qualidade do sono, fadiga, bem-estar mental e eventos adversos. Apesar das diferenças metodológicas empregadas, nos diversos estudos, a acupuntura tem sido identificada

como um tratamento eficaz para indivíduos com diagnóstico de FM (DEARE et al., 2013).

Stival et al. (2014), avaliaram a eficácia da acupuntura no tratamento da FM, considerando como desfecho primário a resposta imediata da escala visual analógica (EVA) para avaliação da dor. Verificou-se um tamanho de efeito bastante significativo na redução imediata da dor em pacientes portadoras de FM submetidos à acupuntura em relação aos pacientes que receberam um procedimento placebo (acupuntura *sham*).

4.4 BRADICININA, COVID-19 E FIBROMIALGIA

A doença de coronavírus 2019 (COVID-19) causa síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2 (SARS-CoV-2) e tem sido caracterizada como uma pandemia global. A Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) está no centro da COVID-19, uma vez que atua como receptora do SARS-CoV-2 nas células do organismo humano, incluindo as células pulmonares. Esta enzima é fundamental na inativação da Angiotensina II (ANGII) e regula o sistema calicreína-cinina, do qual a bradicinina é um peptídeo ativo (peptídeo vasoativo).

Pesquisadores, analisando os conceitos sobre o papel da ECA2, porta de entrada do SARS-CoV-2, na fisiopatologia da COVID-19, sugerem que haja uma desregulação do sistema calicreína/cinina e sua interação com os sistemas renina/angiotensina (RAS), sistema de coagulação (CS) e complemento. A hipótese é de que a inflamação descontrolada sob o evento da tempestade de citocinas, típica da forma grave de COVID-19, anda junto com hipercoagulação e que a união tem como elo a desregulação do KKS provocada pelo mecanismo viral específico da doença. Desta forma, uma terapêutica visando a diminuição dos estragos causados pela infecção por SARS-CoV-2 teria ênfase na inibição do KKS, por bloqueio de receptores B1 e B2 da bradicinina (B1R e B2R) ou por bloqueio da ação da calicreína (importante na produção de cininas), interferindo nos eventos inflamatórios e trombogênicos ao mesmo tempo.

A doença de coronavírus 2019 (COVID-19) causa síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2 (SARS-CoV-2) e tem sido caracterizada como uma pandemia global (POPE, 2020). A Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) está no centro da COVID-19, uma vez que atua como receptora do SARS-CoV-2 nas células do

organismo humano, incluindo as células pulmonares. Esta enzima é fundamental na inativação da Angiotensina II (ANGII) e regula o sistema calicreína-cinina, do qual a bradicinina é um peptídeo ativo (peptídeo vasoativo) (SCHOLZ et al., 2020).

Pesquisadores, analisando os conceitos sobre o papel da ECA2, porta de entrada do SARS-CoV-2, na fisiopatologia da COVID-19, sugerem que haja uma desregulação do sistema calicreína/cinina e sua interação com os sistemas renina/angiotensina (RAS), sistema de coagulação (CS) e complemento. A hipótese é de que a inflamação descontrolada sob o evento da tempestade de citocinas, típica da forma grave de COVID-19, anda junto com hipercoagulação e que a união tem como elo a desregulação do sistema calicreína/cinina provocada pelo mecanismo viral específico da doença. Desta forma, uma terapêutica visando a diminuição dos estragos causados pela infecção por SARS-CoV-2 teria ênfase na inibição do sistema calicreína/cinina por bloqueio de receptores B1 e B2 da bradicinina (B1R e B2R) ou por bloqueio da ação da calicreína (importante na produção de cininas), interferindo nos eventos inflamatórios e trombogênicos ao mesmo tempo (RAMALHO, 2000).

Outro efeito importante e amplamente estudado de bradicinina é na sensibilização à dor (Staud e Smitherman, 2002; Ossipov, Dussor e Porreca, 2021). Nesse contexto, destaca-se a Fibromialgia, síndrome caracterizada como dor crônica primária generalizada (Clauw, 2014). Evidências de um modelo de dor semelhante a fibromialgia em camundongos demonstra que a bradicinina pode estar envolvida na fisiopatologia desta síndrome (BRUSCO et al., 2017; BRUSCO et al., 2019). Na verdade, esses animais apresentam altos níveis de bradicinina no nervo ciático e no córtex cerebral e o bloqueio farmacológico ou genético de B2R e B1R reduz os sintomas de dor semelhantes à fibromialgia (por exemplo, alodinia mecânica, sensibilidade ao frio e nocicepção) (BRUSCO et al., 2019).

Nesse sentido, o bloqueio do sistema calicreína-cinina pode ter um efeito de melhora na doença causada pelo SARS-CoV-2 e, talvez, nos sintomas de dor da fibromialgia. Vários ensaios clínicos estão recrutando pacientes para avaliar os efeitos dos medicamentos que modulam o sistema calicreína-cinina em pacientes com COVID-19 (Identificador ClinicalTrials.gov: NCT04414631; NCT04628000; NCT04549922; NCT04568096).

5 MANUSCRITOS

5.1 MANUSCRITO I (submetido ao *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*)

Serum biomarkers of fibromyalgia patients undergoing acupuncture therapy

ELIZANDRA LEAL STEFFEN¹; RAFAEL NOAL MORESCO¹; CLAUDIO TIMM MARQUES²; MICHELI MAINARDI PILLAT^{3*}; JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA ^{1*}

¹ Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

² Coordination of Degree of Licentiate in Mathematics of Universidade Franciscana – UFN, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences and Pharmacology, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

* To whom correspondence should be addressed: José Edson Paz da Silva, jepazdasilva@gmail.com, Postgraduate Program in Pharmaceutical sciences, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria-RS, Avenue Roraima n° 1000, Santa Maria, RS 97105900, Brazil. and Micheli M. Pillat, PhD, micheli.pillat@ufsm.br, Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria-RS, Avenue Roraima n° 1000, Santa Maria, RS 97105900, Brazil.

Runing title: Serum biomarkers of fibromyalgia upon acupuncture

Abstract

This study aimed to determine and compare the influence of real acupuncture (RA) with *sham* acupuncture (SA) in the treatment of fibromyalgia (FM) through the results found in biochemical, hematological and immunological markers (IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10). Double-blind study comprising 40 FM female patients aged 20 to 60 years old randomized in 2 groups to receive RA or SA. 4 acupuncture sessions (RA or SA) were carried out, 30 minutes long each, for 4 consecutive weeks. Venous blood samples were collected from all FM patients before the 1st intervention and immediately after the last. For the control group, 15 healthy patients were selected, who were then submitted to a single collection of venous blood. Venous blood samples were collected before the 1st intervention and immediately after the last. The quantification of serum cytokines was performed by flow cytometry technique using cytometric bead array. Significantly increased values were found in the distribution width of red cells, uric acid, ultrasensitive C-reactive protein and triglycerides of patients suffering from FM compared to control, before the interventions. There was a significant difference in the total platelet count among FM patients undergoing RA, though, with decreased values after 4 weeks of intervention. The cytokines analyzed showed reduced TNF- α serum levels and higher IFN- γ levels in FM patients compared to the control. FM alters some biochemical e hematological results. Although differences of the biomarkers analyzed in this study were not very intense, our data suggest that the acupuncture therapy modulates these mediators.

Key words: Fibromyalgia; Biomarkers; Cytokines; Acupuncture; Serum

Introduction

Fibromyalgia (FM) is a syndrome defined by chronic, continuous or recurrent pain, which lasts at least 3 to 6 consecutive months. FM is debilitating and involves onerous expenses for the patient¹. Fibromyalgia syndrome is the second most common rheumatic disease worldwide, affecting approximately 2% of the population². It impacts both sexes in a female/male ratio of 3:1 in epidemiological studies³ and the majority of those affected are middle-aged women¹.

In addition to the painful condition, somatic symptoms such as fatigue, insomnia, cognitive and mood disorders are also displayed by individuals with FM^{1,4,5,6}. Comorbidities such as depression, anxiety, chronic fatigue syndrome, myofascial syndrome, irritable bowel syndrome and nonspecific urethral syndrome may also be present, contributing to the pain and decreased quality of life of patients with fibromyalgia⁴.

Consequently, patients with FM make use of a wide variety of pharmacological and non-pharmacological therapies to treat their symptoms and comorbidities,

generating for themselves and health systems costs proportional to the degree of disease severity^{3,4,5,6}. The most widely used drugs in the treatment of FM are analgesics, antidepressants and muscle relaxants, making the treatment costly, besides the possible side effects they can trigger². Thus, acupuncture, a non-pharmacological therapeutic modality, has been largely used by patients with FM as an alternative/complement to the conventional method for the treatment of chronic pain^{2,5}. This technique is based on the activation of endogenous pain control systems, alteration in the sensory processing of the central nervous system (increased pain threshold) and changes in the “coding” of the hypothalamus (autonomic nervous system)². Studies involving patients undergoing FM acupuncture have been demonstrating improvements in the pain, overall wellbeing, quality of sleep, fatigue, mental wellbeing, and adverse events, besides simultaneously reducing costs and the use of medications by these individuals⁷.

On the other hand, the etiology of FM is not fully elucidated and definitive laboratory diagnostic tests for this disease are still a challenge. It is speculated that factors such as dysfunction of the autonomic and central nervous system, cytokines, neurotransmitters, hormones, immune system and external stressors are involved in the pathogenesis of this syndrome^{1,7,8}. Thus, identifying possible significant differences in biomarkers of patients with FM becomes indispensable and, possibly, can help in understanding the etiology of the disease, envisioning a laboratory diagnosis.

Some cytokines, both pro-inflammatory (profile Th1: IL-2, TNF- α , IL-6 and IFN- γ ; profile Th17 – IL-17A) and anti-inflammatory (profile Th2: IL-4 and IL-10) are promising targets for study in FM patients. They are usually involved in pain processing due to neurogenic inflammation induced by an inflammatory response to allergens, infectious agents, irritants, chemical exposures or emotional stress and induce symptoms such as fatigue, fever, sleep, pain and myalgia, present in FM. Additionally, acupuncture has been associated with significant changes in the levels of intracellular cytokines, such as IL-4, IL-1 and IFN- γ ¹⁰, as well as with attenuating psychological distress¹¹.

Thus, it is essential to achieve a greater understanding of the laboratory alterations that lead and/or contribute to this pathological state, in order to achieve higher accuracy in the diagnosis and, consequently, a more adequate, early and effective therapeutic approach for FM^{8,12}.

However, this research is justified by the scarcity of studies relating laboratory findings in fibromyalgia patients undergoing acupuncture. This is the first clinical trial ever carried out involving laboratory markers and FM patients treated with real and sham acupuncture.

Material and Methods

Experimental, randomized, controlled study, with blind evaluation of the outcomes performed at the Functional Investigation Laboratory of the Physiotherapy Course at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) with collaboration of the Rheumatology Service of Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Department of Clinical and Toxicological Analysis (DACT), Clinical Biochemistry Research Laboratory (LABiCLIN) and Experimental and Applied Immunology Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology (Demip), all belonging to the Health Sciences Center at UFSM. This research was approved by the Ethics Committee on Research in Human Beings of UFSM – CAEE (case number 66638917.1.0000.5346).

Subjects

Forty female patients, aged between 20 and 60 years old, diagnosed with FM were selected. For the control group, 15 healthy patients were chosen (Figure 1). Patients with contraindications to acupuncture, patients with severe psychiatric illness, patients with neurological or sensitive deficits, patients with infection, pregnant women and lactating mothers were excluded. Subjects with FM were randomized in 2 groups; this way, 20 FM patients underwent RA and another group of 20 patients was submitted to SA (placebo). All participants, inserted in this study, previously consented to their participation and signed the free and informed consent form (FICF).

Procedures

Acupuncture was performed by a physiotherapist qualified for this procedure and the patients were submitted to 4 sessions of RA or SA, lasting 30 minutes each, once a week, for a period of 4 consecutive weeks. The acupuncture methods applied in patients were standardized according to their intervention group identically. The sites chosen for acupuncture were the same used in the study by STIVAL et al., in 2014:

intestine 4, stomach 36, liver 2, spleen 6, pericardium 6 and heart 7, bilaterally, as shown in Figure 2. Disposable 0.25mm x 40mm stainless steel needles were used, inserted perpendicularly at the points described above; however, in the SA the inserts were superficial and at a distance of 15mm to the left of the true points.

All participants were checked for baseline characteristics such as age, weight, height, FM diagnostic time, comorbidities, drug therapy, among others. All participants with FM were subjected to the collection of venous blood before the first and after the fourth and final intervention, observing a period of fasting of 8 to 12 hours. The control group was submitted to a single venous blood collection. Blood collection followed the standard venipuncture technique. The samples were divided into 2 tubes (Vacutainer®, BD Diagnostics, USA), one containing an EDTA anticoagulant, for the complete blood count and another without anticoagulant, for the serum (extracted after centrifugation of the sample at 3000 rpm for 15 minutes).

Biochemical e hematological analyses

The automated system BS-380 Mindray®, Shenzhen, China, was used for the dosages of total cholesterol, triglycerides, uric acid, creatinine, creatine kinase, and C-reactive protein; to obtain levels of total cholesterol, triglycerides, and uric acid, we used enzyme tests with Bioclin® kits; for creatinine levels, we used kinetic tests with Bioclin® kits; for US-CRP levels, we used immunoturbidimetric tests with Bioclin® kits, and for CK NAC UV levels we used kinetic tests with Wiener LAB® kits. To perform complete blood counts, the hematology analyzer Sysmex KX-21N™, China, was adopted.

Cytokine detection and analysis

Flow cytometry experiments for measurement of IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10 were performed as previously described¹³ and according to manufacturer instructions [BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit]. Briefly, serum was incubated with beads for 2 hours. After two washes, beads were incubated with the secondary antibody for 1 hour. The measurements were performed on BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer and analyzed with Flowjo V10 software (Flowjo, Ashland, OR).

Statistical analysis

The normality of the results was verified using the Shapiro-Wilk test. The independent or paired t-test was applied for normal data in the comparison between groups, or the Mann-Whitney or Wilcoxon test when normality was compromised. The results are presented as median and standard error of the mean. The differences were considered significant when the results showed value $p < 0,05$. The software IBM SPSS Version 25 was used as a computational tool for the statistical analysis of the data.

Results

The clinical characteristics of the individuals studied in both groups are found Table 1. The average age of patients who were randomized to receive RA was 49.21 years old and the patients randomized to receive SA was 51. Almost half of the total number of patients with FM were obese. The majority of fibromyalgia patients have comorbidities associated with FM (90.6%) and more than 90% of the patients make continuous use of drug therapy, predominantly analgesics and antidepressants.

Significantly higher serum levels of UA ($5.35 \text{ mg/dL} \pm 0.22$ vs. $3.1 \text{ mg/dL} \pm 0.25$; $p < 0.001$); US-CPR ($4.6 \text{ mg/L} \pm 1.17$ vs. $1.7 \text{ mg/L} \pm 0.51$; $p = 0.006$); TG ($131.5 \text{ mg/dL} \pm 19.78$ vs. $74 \text{ mg/dL} \pm 19.46$; $p = 0.003$) and RDW (13.45 ± 0.11 vs. 12.9 ± 7.94 , $p = 0.048$) were found in patients with FM in relation to the control group, before the interventions. The complete data can be seen in Table 2.

Among patients undergoing RA there was a significant difference in total platelet count (PLT), which decreased after 4 weeks of intervention (263.5 ± 14.94 vs. 257 ± 11.27 , $p = 0.044$), as shown in Table 3. The other biomarkers evaluated in the laboratory routine (white blood cell count, red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, total cholesterol, creatinine, and creatine kinase) did not display significant statistical differences between the intervention groups (RA or SA).

Finally, given that cytokines are associated with many symptoms of FM and studies report that acupuncture may modify their levels^{10,11,14}, we investigated serum levels of IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10 in control patients and with FM (Figure 3) submitted to RA or SA (Figure 4). We observed lower serum TNF- α (Figure 3E) and higher serum IFN- γ in FM patients (Figure 3C) in relation to the control group. The other interleukins dosed showed an increase in patients with FM, but with

no significant difference. On the other hand, neither RA nor SA altered serum levels of cytokines in FM patients significantly (Figure 4).

Discussion

The mean age of patients with FM in the present study confirms the higher prevalence of this syndrome in middle age⁴. The vast majority of fibromyalgia patients were overweight (overweight/obesity). Consequently, patients with FM had significantly increased triglyceride levels before the interventions in relation to the control group, which corroborates previous data in the literature that show significant correlation between FM, overweight and lipid profile¹⁵.

Nevertheless, the significantly increased dosage of US-CRP levels in FM patients before interventions in relation to control is in line with the results obtained by FEINBERG et al., 2017, in which CRP was significantly higher among patients with fibromyalgia ($M=5.54 \pm 9.8$) compared to the control group ($M=3.75 \pm 7.2$). These authors mention the potential influence of BMI and comorbidities in this relationship with C-reactive protein. Yet, significantly higher levels of uric acid in FM patients before the interventions observed in this study converge with the results of the transversal study conducted by DÓRIO et al., 2016, in which higher uric acid levels were associated with increased BMI and lower intensity of physical activity.

Nonetheless, most hematological and biochemical biomarkers measured did not significantly differ between FM patients and the control group. In 2016, a study conducted by ELMAS et al. evaluated several physiological parameters in women with fibromyalgia compared to a control group, such as hemoglobin, white cell count, platelet count and C-reactive protein levels, and most of the variables analyzed did not differ significantly either between groups. Results of routine laboratory tests in patients with FM are frequently within the normal range of values¹⁷.

The hypothesis that cytokines may be involved in the generation of pain and hyperalgesia in inflammatory and neuropathic conditions was proposed based on evidence that cytokines establish communication between the immune system and the nervous system¹⁸. Probably the disproportion of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines leads to chronic peripheral sensitization of the nervous system as a major contributor to pain¹⁹. Among the cytokines evaluated in the serum, TNF- α , a pro-inflammatory cytokine, proved lower in FM patients in relation to the control; such

data was also observed in studies conducted by Garcia-Lozano et al., 2008; Hernandez et al. (2010) and Kadetoff et al. (2011). Still, IFN- γ , also pro-inflammatory, proved higher in the serum of FM patients, as also pointed out by Ortega et al. (2009). IFN- γ is an important cytokine that directs the pro-inflammatory Th1 profile of T lymphocytes, suggesting that these patients may be more prone to responses with this profile. The other cytokines (pro-inflammatory: IL-2, IL-6 and IL-17A and anti-inflammatory: IL-4 and IL-10), despite not having presented significant differences, were increased in patients with FM compared to the control group. As for the patients randomized to receive RA, they showed the same increased levels of IL-2, IL-6 and IL-17A and decreased levels of IL-4, IL-10, IFN- γ and TNF- α in relation to patients that underwent SA, but not significantly.

Comorbidities associated with FM and consequently the drug therapy used are factors that compromise the results concerning this subject, since these are inherent biases in most patients with this syndrome, difficult to control. Knowing that factors such as stress, diurnal variation, physical activity, changes in diet, depression, medication, among others, affect cytokine levels, the great variation found among subjects is justified^{19,24}. Consequently, studies assessing the profile of biomarkers in FM patients and healthy subjects are scarce, and even scarcer with FM patients undergoing acupuncture therapy.

Through the results observed in this sample, neither routinely used biomarkers nor more specific ones, such as cytokines, were expressive enough to suggest a promising diagnostic biomarker for FM, but some cytokines had their concentrations increased and others decreased after the interventions, suggesting that these biomarkers were modulated with acupuncture therapy. Maybe future studies with different protocols, a higher number of individuals and longer follow-up are needed to investigate the relation between cytokines, fibromyalgia and the potential effect of acupuncture in these regulatory proteins in order to establish effective therapeutic strategies.

Acknowledgments

This study was supported by Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil. MMP acknowledges the grant support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS N. case no.: 20255100002535).

Conflicts of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

1. Feinberg T, Sambamoorthi U, Lilly C, Innes KK. Potential mediators between fibromyalgia and C-Reactive protein: results from a Large U.S. Community Survey. *BMC Musculoskeletal Disord* 2017; 18(1): 294. doi: 10.1186/s12891-017-1641-y.
2. Martinez NR, Macias MA. Acupuntura en el manejo complementario de la fibromialgia. *Revista Colombiana de Reumatologia* 2012; 19 (1): 27-39.
3. Häuser W, Ablin J, Perrot S, Fitzcharles M-A. Management of fibromyalgia: key messages from recente evidence-based guidelines. *Pol Arch of Intern Med* 2017; 127 (1): 47-56. doi: 10.20452/pamw.3877.
4. Heymann RE, Paiva ES, Helfensein J. M, Pollak DF, Martinez JE, José Roberto Provenza JR et al. Consenso brasileiro do tratamento da fibromialgia. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50 (1): 56-66.
5. Stival RSM, Cavalheiro PR, Stasiak CES, Galdino DT, Hoekstra BE, Schafranski MD. Acupuntura na fibromialgia: um estudo randomizado-controlado abordando a resposta imediata da dor. *Rev. Bras. Reumatol* 2014; 54 (6): 431-436.
6. Ernberg M, Christidis N, Ghafouri B, Bileviciute-Ljungar, Löfgren M, Bjersing A et al. Plasma Cytokine Levels in Fibromyalgia and Their Response to 15 Weeks of Progressive Resistance Exercise or Relaxation Therapy. *Mediators Inflamm* 2018; 3985154. doi: 10.1155/2018/3985154.
7. Deare JC, Zheng Z, Xue CCL, Liu JP, Shang J, Scott SW et al. Acupuncture for treating fibromyalgia. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 5:CD007070. doi: 10.1002/14651858.CD007070.
8. Aktük S, Büyükavcı R. Evaluation of blood neutrophil-lymphocyte ratio and platelet distribution width as inflammatory markers in patients with fibromyalgia. *Clin Rheumatol* 2017; 36 (8): 1885-1889. doi: 10.1007/s10067-017-3647-0.

9. Elmas O, Yildiz S, Bilgin S, Demirci S, Comlekci S, Koyuncuoglu HR et al. Physiological parameters as a tool in the diagnosis of fibromyalgia syndrome in females: A preliminary study. *Life Sciences* 2015; 145: 51-56, doi: 10.1016/j.lfs.2015.12.029.
10. Yamaguchi N, Takahashi T, Sakuma M, Sugita T, Uchikawa K, Sakaiharu S et al. Acupuncture regulates leukocyte subpopulations in human peripheral blood, *Evid. Based Complement. Altern. Med* 2007; 4 (4): 447–453. doi: 10.1093/ecam/nel107.
11. Pavão TS, Vianna O, Pillat MM, Machado AB; Bauer ME. Acupuncture is effective to attenuate stress and stimulate lymphocyte proliferation in the elderly. *Neuroscience Letters* 2010; 484 (1): 47-50. doi: 10.1016/j.neulet.2010.08.016.
12. Passos RS, Vilas Bôas SS, Vieira, RP. Efeitos da acupuntura na fibromialgia: uma revisão bibliométrica. *Acta biomedica braziliensia* 2016; 7 (2): 15-21.
13. Pillat MM, Correa BL, Rocha CFK, Müller GC, Lopes RP, Lampert SS et al. Changes in T cell phenotype and activated MAPKs are correlated to impaired cellular responses to antigens and glucocorticoids during HTLV-I infection. *J Neuroimmunol* 2009; 216 (1-2): 76-84. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.08.016.
14. Benlidayi IC. Role of inflammation in the pathogenesis and treatment of fibromyalgia. *Rheumatol Int* 2019; 39 (5): 781-91. doi: 10.1007/s00296-019-04251-6.
15. Cordero MD, Alcocer-Gómez A, Cano-García FJ, Sánchez-Domínguez B, Fernández-Riejo P, Fernández AMM et al. Clinical symptoms in fibromyalgia are associated to overweight and lipid profile. *Rheumatol Int* 2014; 34 (3): 419-22, doi: 10.1007/s00296-012-2647-2.
16. Dória EL, Fuller R, Lotufo PA, Bensenor IM. Valores de referência do ácido úrico em uma grande coorte brasileira. *Rev Bras Reumatol* 2016; 56 (Supl1):S1-S169, p.29, trab 94.
17. Provenza JR, Pollak DF, Martinez JE, Paiva ES, Helfenstein M, Heymann R et al. Fibromialgia. *Rev. Bras. Reumatol* 2004; 44 (6): 443-449.
18. Bazzichi L, Rossi A, Massimetti G, Giannaccini G, Giuliano T, Feo F et al. Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25 (2): 225-230.

19. Rodriguez-Pintó I, Agmon-Levin N, Howard A, Shoenfeld. Fibromyalgia and cytokines. *Immunology Letters* 2014; 161 (2):200-203. doi: 10.1016/j.imlet.2014.01.009.
20. Garcia-Lozano JR, Capilla-Sevilla C, García-López O, Moreno-Gallego I. Correlation between cytokines and anxious-depressive symptoms in patients with fibromyalgia. *Reumatol Clin* 2008; 4 (4): 136-139, doi: 10.1016/S1699-258X (08)71822-9.
21. Hernandez ME, Becerril E, Perez M, Leff P, Anton B, Estrada S et al. Proinflammatory cytokine levels in fibromyalgia patients are independent of body mass index. *BMC Res Notes* 2010; 3 (1): 156-160. doi: 10.1186/1756-0500-3-156.
22. Kadetoff D, Lampa J, Westman M, Andersson M, Kosek E. Evidence of central inflammation in fibromyalgia-increased cerebrospinal fluid interleukin-8 levels. *Journal of Neuroimmunology* 2012; 242 (1-2): 33-38. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.10.013.
23. Ortega E, Bote ME, Giraldo E, García JJ. Aquatic exercise improves the monocyte pro- and anti-inflammatory cytokines production balance in fibromyalgia patients. *Scand J Med Sci Sports* 2012; 22 (1): 104-112. doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01132. x.
24. Ranzolin A, Duarte ALBP, Bredemeier M, da Costa Neto CA , Ascoli BM, Wollenhaupt-Aguiar B. Evaluation of cytokines, oxidative stress markers and brain-derived neurotrophic factor in patients with fibromyalgia - A controlled cross-sectional study. *Cytokine* 2016; 84:25-8. doi: 10.1016/j.cyto.2016.05.011.

Table 1: Characteristics of patients with fibromyalgia versus healthy control.

	FM (n=32)	Healthy Control (n=15)	P value
Age (years)	51,12 ± 6,66	47,47 ± 6,82	0,074 ¹
Weight (kg)	76 ± 13,66	70,21 ± 10,99	0,157 ²
Height (cm)	1,60 ± 0,06	1,64 ± 0,06	0,045 ^{2*}
BMI (kg/m²)	29,35 ± 5,67	25,95 ± 3,61	0,453 ²
Normal weight	8 (25%)	5 (33,3%)	
Overweight	9 (28,1%)	7 (46,7%)	0,242 ³
Obesity	15 (46,9%)	3 (20%)	
FM diagnosis			
Less than 1 year	8 (25%)	-	-
Between 1 and 2 years	2 (6,3%)	-	-
Over 2 years	22 (68,7%)	-	-
Comorbidities			
Yes	29 (90,6%)	-	-
No	3 (9,4%)	-	-
Analgesic medication			
Yes	31 (96,9%)	-	-
No	1 (3,1%)	-	-
Antidepressant medication			
Yes	29 (90,6%)	2 (13,3%)	<0,001 ^{3*}
No	3 (9,4%)	13 (86,7%)	
Smoker			
Yes	2 (6,3%)	1 (6,7%)	1 ⁴
No	30 (93,7%)	14 (93,3%)	

Data are presented as mean(±SD). BMI= body mass index. ¹Mann-Whitney test; ²Independent t test t; ³Chi-square; ⁴Fisher's exact test; *p <0,05.

Table 2: Evaluation of biomarkers in patients with fibromyalgia (FM) versus healthy control.

	Fibromyalgia (n=32)	Healthy Control (n=15)	P value
WBC (10 ⁻³ U/L)	6,48 ± 0,39	6,2 ± 0,38	0,741 ¹
NLR (%)	1,64 ± 0,16	1,32 ± 0,26	0,101
RBC (10 ⁻⁶ U/L)	4,44 ± 0,06	4,51 ± 0,07	0,624 ¹
Hb (g/dL)	13,25 ± 0,18	13 ± 0,15	0,383 ²
HCT (%)	40,1 ± 0,49	39,9 ± 0,54	0,597 ²
RDW (%)	13,45 ± 0,11	12,9 ± 7,94	0,048 ^{1*}
PLT (10 ⁻³ U/L)	263,5 ± 10,37	246 ± 13,27	0,132 ²
MPV (fL)	10,1 ± 0,17	10,1 ± 0,20	0,988 ²
UA (mg/dL)	5,35 ± 0,22	3,1 ± 0,25	<0,001 ^{1*}
Cr (mg/dL)	0,87 ± 0,02	0,91 ± 0,03	0,637 ²
CK (U/L)	92,5 ± 13,07	80 ± 10,94	0,338 ¹
TC (mg/dL)	205 ± 9,89	207 ± 7,25	0,218 ²
TG (mg/dL)	131,5 ± 19,78	74 ± 19,46	0,003 ^{1*}
Us-CRP (mg/L)	4,6 ± 1,17	1,7 ± 0,51	0,006 ^{1*}

Data are presented as median (±SEM). A: acupuncture; P: placebo; WBC: white blood count; NLR: neutrophil-lymphocyte ratio; RBC: red blood count; Hb: hemoglobin; HCT: hematocrit; RDW: red cell distribution width; PLT: platelets; MPV: mean platelet volume; UA: uric acid; Cr: creatinine; CK: Creatine kinase; TC: cholesterol; TG: triglycerides; us- CRP: ultrasensitive C reactive protein. 1 Mann-Whitney test; 2 independent test t; *p < 0,05.

Table 3: Evaluation of routine biomarkers before and after interventions in the acupuncture and sham groups in fibromyalgia patients, respectively.

Variables	Acupuncture (n= 17)			Sham (n= 15)		
	Before	After	p	Before	After	p
TC (mg/dL)	199,5±12,08	214,5±10,96	0,201 ¹	208±18,58	220±17,69	0,551 ²
TG (mg/dL)	124±33,22	149±28,90	0,408 ¹	133±21,46	135±14,20	0,755 ¹
UA (mg/dL)	4,85±0,29	5,15±0,32	0,622 ¹	5,5±0,37	5±0,49	0,580 ²
Cr (mg/dL)	0,86±0,03	0,87±0,04	0,652 ¹	0,92±0,04	0,97±0,05	0,166 ²
CK (U/L)	79,7±20,35	67,4±13,29	0,084 ¹	103,6±16,5	107,1±18,88	0,609 ²
us-CRP (mg/L)	4,75±2,04	3,2±1,19	0,642 ¹	3,7±0,85	2,1±1,3	0,955 ¹
WBC (10 ⁻³ UL)	6,78±0,59	6,35±0,41	0,554 ¹	6,29±0,48	7,1±0,51	0,547 ²
RBC (10 ⁻⁶ U/L)	4,45±0,07	4,46±0,07	0,224 ²	4,43±0,09	4,54±0,12	0,426 ¹
Hb (g/dL)	12,65±0,25	13±0,22	0,586 ²	13,5±0,23	13,5±0,29	0,436 ²
HCT (%)	39,15±0,59	39,05±0,55	0,306 ²	40,8±0,69	39,7±0,95	0,148 ²
RDW (%)	13,5±0,12	13,55±0,14	0,370 ²	13±0,22	13,2±0,18	0,588 ¹
PLT (10 ⁻³ U/L)	263,5±14,94	257±11,27	0,044 ^{2*}	270±14,31	248±17,79	0,100 ¹
NLR (%)	1,85±0,27	1,64±0,19	0,636 ¹	1,43±0,16	1,72±77,86	0,328 ¹
MVP (fL)	10,05±0,23	9,9±0,21	0,640 ²	10,1±0,27	9,6±0,32	1 ²

Data are presented as median (\pm SEM). A: acupuncture; P: placebo; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; UA: uric acid; Cr: creatinine; CK: creatine kinase; us-CRP : ultrasensitive C reactive protein; WBC: white blood count; RBC: red blood count; Hb: hemoglobin; HCT: hematocrit; RDW: red cell distribution width; PLT: platelets; NLR: neutrophil-lymphocyte ratio; MPV: mean platelet volume. ¹Wilcoxon test; ²Paired t-test; *p < 0,05.

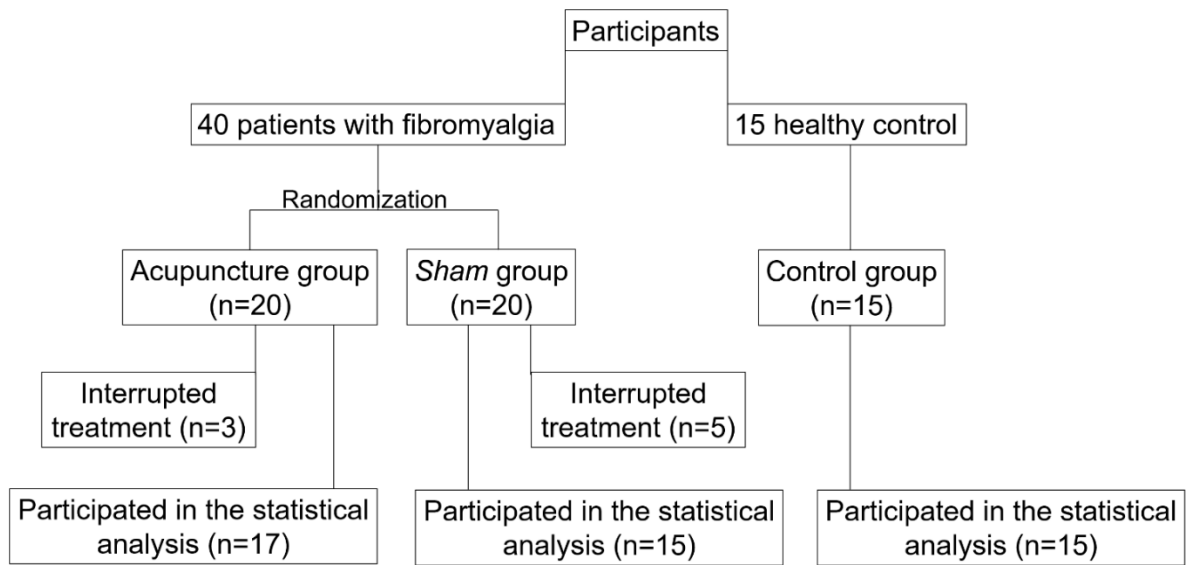


Figure 1: Flow chart of the participants included in the study.

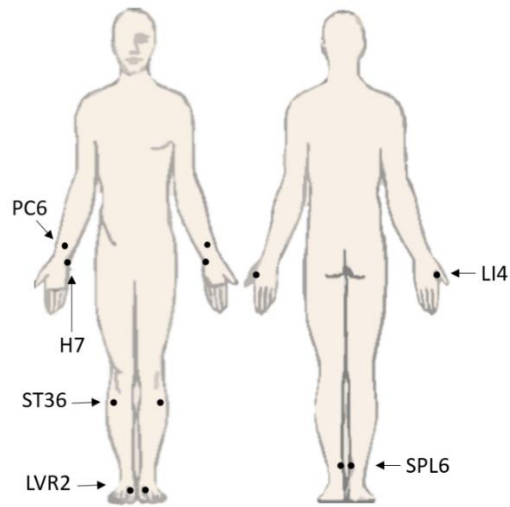


Figure 2: Points used in acupuncture treatment. Pericardium 6 (PC6); Heart 7 (H7); Stomach 36 (ST36); Liver 2 (LVR2); Large intestine 4 (LI4); Spleen 6 (SPL6), bilaterally.

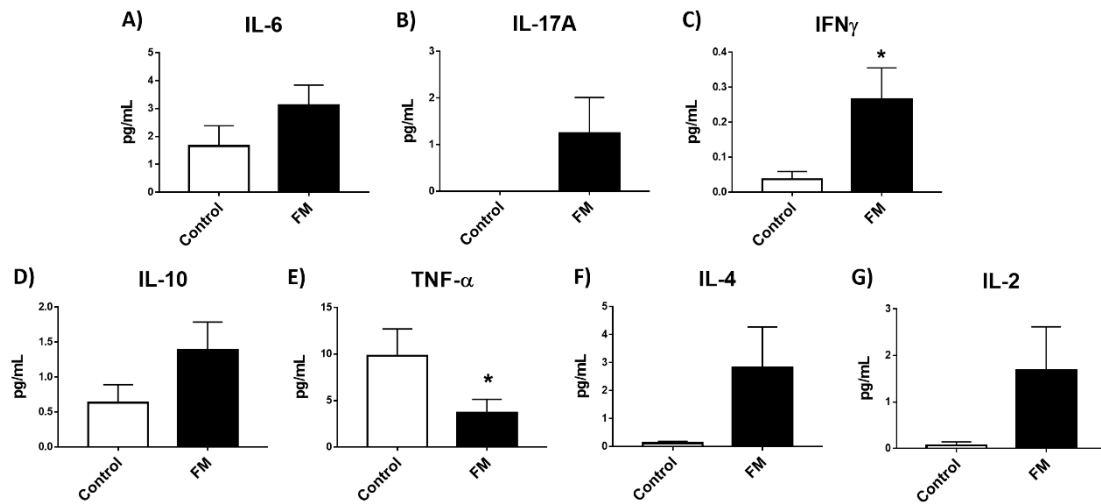


Figure 3: Control (n=15). FM (n=32). Cytokine (IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10) profiles in serum in healthy control and FM (fibromyalgia) groups. The cytokines were analyzed by flow Cytometry (Cytometric Bead Array). The measurements were performed on BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer and analyzed with FlowJo V10 software. Data presented as median (pg/mL) \pm SEM.

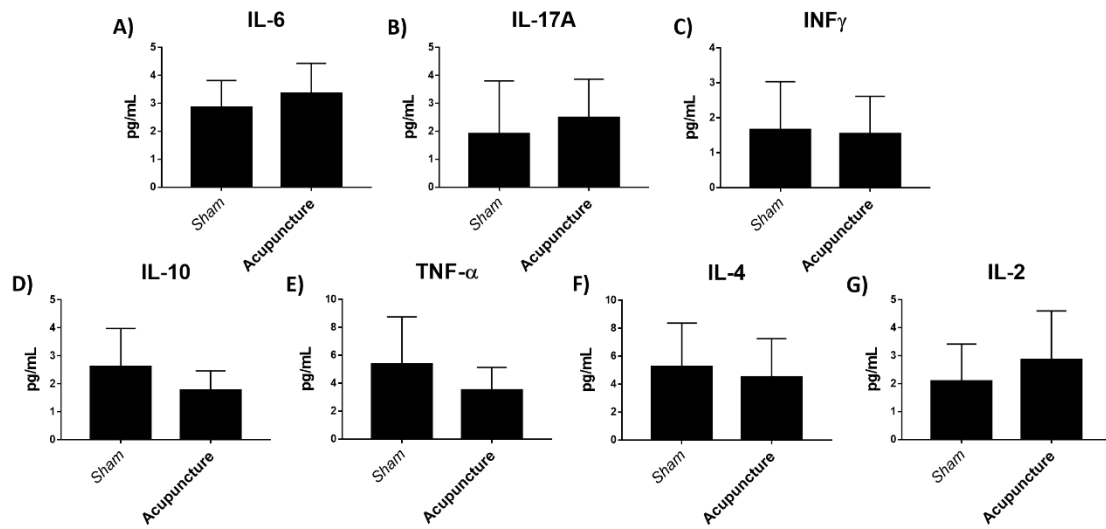


Figure 4: Control (n=15). FM (n=32). Cytokine (IL-2, TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10) profiles in serum in FM (fibromyalgia) patients after sham or acupuncture therapy. The Cytokines were analyzed by flow Cytometry (Cytometric Bead Array). The measurements were performed on BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer and analyzed with FlowJo V10 software. Data presented as median (pg/mL) \pm SEM.

Bradykinin as a target for SARS-CoV-2 treatment: Possible mediator for inflammation, pain, and neurological symptoms in patients with COVID-19 or fibromyalgia.

Micheli Mainardi Pillat^{a b # *}, Elizandra Leal Steffen^{a #}, José Edson Paz da Silva^a

^a Postgraduate program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

^b Postgraduate program in Pharmacology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

[#] Authors contributed equally to the manuscript.

^{*} To whom correspondence should be addressed: Micheli M. Pillat, PhD, micheli.pillat@ufsm.br, Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria-RS, Avenue Roraima n° 1000, Santa Maria, RS 97105900, Brazil.

ORCID IDs: Micheli M. Pillat <https://orcid.org/0000-0002-6753-6083>

Highlights

- Patients with SARS-CoV-2 can present bradykinin (BK) storm.
- BK might trigger edema, inflammation, and pain observed in patients with SARS-CoV-2.
- Fibromyalgia (FM) models show that BK may be involved in pathophysiology.
- Studies have demonstrated the role of BK in mood symptoms, anxiety, and memory decline.
- Neurological symptoms of FM and specially COVID-19 might be triggered by BK.

Currently the world is going through an outbreak of SARS-CoV-2 that can trigger COVID-19. SARS-CoV-2 can bind to two receptors on host cells: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and CD147 (also known as Basigin or EMMPRIN)^{1,2,3}. This interaction between the virus spike protein and ACE2 or CD147 on the host cell is the first step for SARS-CoV-2 invasion, intracellular infection cycle and, posteriorly, dissemination of the virus among other cells. COVID-19 usually affects multiple organ systems and some of its main symptoms are fatigue, dry cough, shortness of breath, headaches, muscle aches, chest tightness, and sore throat⁴. From the first week to the sixth month, the most frequent symptoms are fatigue, post-exertional malaise, and cognitive dysfunction. In the seventh month, most symptomatic patients report that physical activities or mental stress are the main triggers for relapses⁴. However, the cellular and molecular mechanisms that result in these symptoms are still unknown.

ACE2 is the main receptor for SARS-CoV-2 invasion¹. The invasion occurs through interaction between the viral spike protein and ACE2 and depends on TMPRSS2 for priming⁵. After binding to the receptor, the complex spike/ACE2, and consequently the virus, is internalized through endocytosis, dependent on phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKFYVE), two-pore channel subtype 2 (TPCN2), and cathepsin L (CTSL)⁶. Interestingly, SARS-CoV-2 infection increases ACE2 expression in cells from the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with COVID-19, contributing to deregulation of the kallikrein-kinin system⁷.

Bradykinin in SARS-CoV-2 infection

Bradykinin (BK) and des-Arg9-BK are important active peptides that trigger the effects of the kallikrein-kinin system. Activation of this system can begin in FXII of the intrinsic coagulation pathway. This factor activates the serine protease kallikrein 1, which is responsible for cleaving the inactive pre-protein kininogen (circulating HMWK or tissue LWMK) giving rise to BK. This kinin can be degraded by the angiotensin-converting enzyme (ACE), resulting in an inactive peptide, or by the carboxypeptidase N enzyme, originating des-Arg9-BK. Among the positive feedback loops that regulate this system is the fact that kallikrein is capable of activating FXII⁸. On the other hand, one of the main negative regulators of this route, which normally keeps it under control, is the C1-Inhibitor.

BK and des-Arg9-BK trigger their effects by binding to kinin B2 and B2 receptors (B1R and B2R), respectively. Classic effects of the bradykinin signaling through B2R are vasodilation, increased vascular permeability, increased blood-brain barrier permeability, natriuresis, and stimulation of the pain pathway and inflammatory responses. Similarly, Arg9-BK/B1R signaling induces neutrophil recruitment and increases vascular permeability^{9,10,11}. B2R is expressed on epithelial cells of the lung, kidneys, intestine, blood vessels and brain, while B1R expression is extremely increased after injury and inflammatory response.

Interestingly, the kallikrein-kinin system may be intensively activated in patients infected with SARS-CoV-2. Analyses on gene expression data from cells of the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with SARS-CoV-2 demonstrated some critical changes in this system⁷: (1) mRNA of C1-Inhibitor is downregulated (-33 fold) in COVID-19 patients compared to control, canceling the suppression of FXII and triggering continuous production of BK; (2) ACE expression, which degrades BK, is downregulated (-8 fold) in SARS-CoV-2 BALF; and (3) ACE2 expression is high (199 fold) in infected subjects, causing increase in Angiotensin 1-9⁷. This peptide exacerbates BK-effects, such as pain and vascular permeability, and possibly induces resensitisation of B2R^{12,13}. The expansion of this imbalance increases BK on a system-wide level, which can lead patients to experience a “bradykinin storm”.

BK levels can rise at a system-wide level, but BK/B2R signaling will induce vasodilatation and increased vascular permeability mainly in tissues infected by SARS-CoV-2 and regulated by ACE, such as the lung. In fact, BK effects make the lung prone

to vascular leakage, triggering angioedema, which is an important feature of COVID-19. Moreover, BK-driven pulmonary edema might favor the acute respiratory distress syndrome (ARDS) observed in some patients¹⁴. Obviously, this pathway potentiates inflammation in a positive feedback, since it results in leakage of proteins from the immune system (as complement and cytokines) and from the kallikrein-kinin system, as well as favors the leukocyte infiltration. In addition, activation of kinin receptors directly stimulates the production of inflammatory mediators, such as prostaglandin E2 and interleukin-1 β (IL-1 β). Taken together, bradykinin storm might trigger edema, inflammation, and pain observed in patients with SARS-CoV-2, beginning in the lungs.

Bradykinin in Fibromyalgia

Another important and widely studied effect of BK is on pain sensitization^{15,16}. In this context, we highlight the Fibromyalgia, a syndrome characterised as generalised chronic primary pain that affects 2-8% of the world population¹⁷. Evidences from a fibromyalgia-like pain model in mice demonstrate that BK may be involved in the pathophysiology of this syndrome¹⁸⁻¹⁹. In fact, these animals present high levels of BK in the sciatic nerve and cerebral cortex and the pharmacological or genetic blockade of B2R and B1R reduces fibromyalgia-like pain symptoms (e.g., mechanical allodynia, cold sensitivity, and overt nociception)¹⁹. These findings are important, since they suggest BK/B2R signaling inhibitory drugs as therapeutic alternatives in the treatment of fibromyalgia pain symptoms (which is the main clinical feature of the disease). Furthermore, such results suggest that patients with fibromyalgia may present pain symptoms even higher during SARS-CoV-2 infection due to BK storm.

In addition to chronic diffuse pain, patients with fibromyalgia present fatigue, sleep disturbance, mood symptoms, and other somatic complications. This scenario affects the quality of life of the patients as well as their performance at work. Mohabbat and co-workers (20 - 2020) suggest that fibromyalgia patients are an extremely vulnerable population in the setting of COVID-19. These patients share the same concerns that all population is facing in this pandemic moment, but it is well known that mental/emotional (or even financial) stressors potentiate the underlying process of central sensitization of pain and other sensory stimuli that, in turn, increase symptoms. Several systems/pathways can modulate fibromyalgia symptoms when hyperactivated, such as hypothalamic-pituitary-adrenal axis, sympathetic nervous

system, and endogenous opioid system^{17,20}. Although they are not the focus of this study, these systems/pathways are very important in the development of chronic symptoms and conditions. Moreover, recent studies have demonstrated the role of the kallikrein-kinin system in mood symptoms, anxiety and memory decline.

BK Effects on the nervous system: Involvement in symptoms of SARS-CoV infection and Fibromyalgia?

In the central nervous system, BK alters several cellular and molecular processes, such as blood-brain barrier permeability, blood pressure, pain perception, release of neurotransmitter glutamate, neural stem cell proliferation, and neurogenesis²¹. The Kallikrein-kinin system is involved in the pathophysiology of several brain diseases, including epilepsy, Alzheimer's disease, traumatic brain injury, and multiple sclerosis²². The role of the Kallikrein-kinin system in these pathophysiology diseases is well-known²³, but an increasing number of studies have suggested its role also in psychiatric illnesses. A study with 306 genes that regulate neurotransmitters indicated an association between a polymorphism within the promoter region of *B2R* and panic disorder²⁴, whereas another meta-analysis study demonstrated that a single nucleotide polymorphisms of *B2R* are the most strongly associated to this disorder²⁵. BK injection into periaqueductal grey (midbrain structure) triggers panic-like behavior in rodents through B2R and μ -opioid receptors^{26,27}. Rouhiainen and co-workers (2019) observed variants in genes for kininogen-1, B2R, and B1R associated with anxiety disorders in humans. Furthermore, exogenous BK into the cerebrospinal fluid of rats increases anxiety-like behavior and decreases social interaction. On the other hand, the pharmacological blockade of B2R decreases the levels of a physiological anxiety measure, the stress-induced hyperthermia²⁸. Taken together, these data suggest that BK regulates some stress responses through B2R. As mentioned above, high levels of BK are observed in cerebral cortex of mice with fibromyalgia-like pain symptoms. However, no study has been conducted with patients. Moreover, BK effects modulating stress responses suggest other potential effects of the "bradykinin storm" in SARS-CoV-2 patients. This storm could explain several neurological symptoms of COVID-19, such as encephalopathy, dizziness, headache, cognitive impairment, and ischemia²⁹. SARS-CoV-2 may infect the brain³⁰, but BK

measurements in the cerebrospinal fluid of infected individuals have not yet been performed.

Therapeutic alternatives by blocking the Kallikrein-kinin system

Not only patients with fibromyalgia but also with COVID-19 could benefit from pharmacological therapies that increase ACE, decrease BK, or block BR2. There are several FDA-approved drugs that could be explored in clinical trials. Icatibant, e.g., is a B2R antagonist and Ecallantide inhibits Kallikrein-1, reducing BK production³¹. Androgens (danazol and stanosolol) increase C1-inhibitor expression³²; vitamin D regulates renin production, influencing in BK signaling³³; and zinc inhibits proteases as kallikrein-1, suppressing BK production³⁴. Still, several recombinant C1-inhibitors (Berinert/ Conestat alfa/Cinryze/Haegarda/Ruconest) inhibit FXII and Kallikrein, decreasing BK production, as well as an antisense oligonucleotide therapy inhibits pre-kallikrein synthesis and is being tested in patients with COVID-19 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04549922). In this sense, the blockade of the Kallikrein-kinin system might have an ameliorating effect on the disease caused by SARS-CoV-2 and perhaps on fibromyalgia pain symptoms. In fact, several clinical trials are recruiting patients to assess the effects of drugs that modulate the kallikrein-kinin system in patients with COVID-19 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04414631; NCT04628000; NCT04549922; NCT04568096). It is worth mentioning that kinin is also a pro-inflammatory mediator and, therefore, blocking this system might indirectly benefit inflammatory states.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; Grant/Award Number: 20255100002535)

References

- 1 - Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. (2020). Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020 Mar; 367(6485): 1444-1448. doi: 10.1126/science.abb2762
- 2 - Ulrich H, Pillat MM. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Jun;16(3): 434-440. doi: 10.1007/s12015-020-09976-7.
- 3 - Wang K, Chen W, Zhang Z, et al. (2020). CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 5:283; <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00426-x>
- 4 - Davis HE, Assaf GS, McCorkell L, Wei H, Low RJ, Re'em Y et al. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.24.20248802>; this version posted December 27, 2020.
- 5 - Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Terrier T, Erichsen S et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020 Apr; 181(2): 271–280.
- 6 – Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* 2029; 11: 1620.
- 7 - Garvin MR, Alvarez C, Miller JI, Prates ET, Walker AM, Amos BK et al. A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm. *eLife* 2020; 9: e59177. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.59177>
- 8 - Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Molecular Immunology* 2010; 47: 2161–2169. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.05.010>.
- 9 - Stuardo M, Gonzalez CB, Nualart F, Boric M, Corthorn J, Bhoola KD et al. 2004. Stimulated human neutrophils form biologically active kinin peptides from high and low molecular weight kininogens. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75: 631–640. doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.1103546>.
- 10 - Araújo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva AC, Pesquero JB, Bader M. 2001. Altered neutrophil homeostasis in Kinin B1 receptor-deficient mice. *Biological Chemistry* 2001; 382: 91–95. doi: <https://doi.org/10.1515/BC.2001.014>.
- 11 - Hofman Z, Maat S, Hack CE, Maas C. Bradykinin: inflammatory product of the coagulation system. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2016; 51: 152–161. doi: <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8540-0>.

- 12 - Chen Z, Tan F, Erdos EG, Deddish PA. 2005. Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension* 2005; 46: 1368–1373. doi: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000188905.20884.63>.
- 13 - Erdos EG, Jackman HL, Brovkovich V, Tan F, Deddish PA. 2002. Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2002; 34: 1569-1576. doi: <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2080>.
- 14 - Van der Veerdonk FL, Netea MG, Deuren M, Meer JM, Mast Q, Bruggemann RJ et al. Kallikrein-kinin blockade in patients with COVID-19 to prevent acute respiratory distress syndrome. *eLife* 2020; 9: e57555. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.57555>.
- 15 - Staud R, Smitherman ML. Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: pathogenetic role. *Curr Pain Headache Rep* 2002; 6: 259–266.
- 16 - Ossipov MH, Dussor GO, Porreca, F. Central modulation of pain. *J Clin Invest* 2020; 120: 3779-3787, 2010. doi: 10.1172/JCI43766.
- 17 - Clauw DJ. Fibromyalgia: a clinical review. *JAMA* 2014; 311: 1547-1555. doi: 10.1001/jama.2014.3266.
- 18 - Brusco I, Silva CR, Trevisan G, Gewehr CCV, Rigo FK, Tamiozzo LR et al. Potentiation of paclitaxel-induced pain syndrome in mice by angiotensin I converting enzyme inhibition and involvement of kinins. *Mol Neurobiol* 2017; 54: 7824–7837. doi: 10.1007/s12035-016-0275-7
- 19 - Brusco I, Justino AB, Silva CR, Fischer S, Cunha TM, Scussel R et al. Kinins and their B1 and B2 receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. *Biochemical Pharmacology* 2019 Oct; 168: 119-132. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.023>.
- 20 - Mohabbat AB, Mohabbat NML, Wight EC. Fibromyalgia and chronic fatigue syndrome in the age of COVID-19. *Mayo Clin Proc Inn Qual Outcomes* 2020 Dec; 4(6): 764-766. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2020.08.002>
- 21 - Pillat MM, Cheffer A, Andrade CM, Morsch VM, Schetinger MRC, Ulrich H. Bradykinin-induced inhibition of proliferation rate during neurosphere differentiation: Consequence or cause of neuronal enrichment? (2015). *Cytometry A* 2015 oct; 87(10): 929-935 . doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22705>.
- 22 - Costa-Neto CM, Dillenburg-Pilla P, Heinrich TA, Parreira-e-Silva LT, Pereira MGAG Reis, RI et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *Int. Immunopharmacol.*, 2008 FEB: 8(2): 135–142.
- 23 - Nokkari A, Abou-El-Hassan H, Mechref Y, Mondello S, Kindy MS, Jaffa AA et al. Implication of the Kallikrein-Kinin system in neurological disorders: Quest for

- potential biomarkers and mechanisms. **Prog. Neurobiol.** 2018 jun-aug; 165–167; 26–50.
- 24 - Gratacos M, Costas J, Cid R, Bayés M, Gonzéles JR, Baca-Garcia E et al. Identification of new putative susceptibility genes for several psychiatric disorders by association analysis of regulatory and non-synonymous SNPs of 306 genes involved in neurotransmission and neurodevelopment. *Am. J. Med. Genet.* 2009 sept; 150B(6): 808–816.
- 25 – Otowa T, Kawamura Y, Nishida N, Sugaya N, Koike A, Yoshida Y et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for panic disorder in the Japanese population. *Transl. Psychiatry* 2012 nov; 2(11): e186. doi: 10.1038/tp.2012.89.
- 26 - Burdin TA, Graeff FG, Pela IR. Opioid mediation of the antiaversive and hyperalgesic actions of bradykinin injected into the dorsal periaqueductal gray of the rat. *Physiol. Behav.* 1992; 52: 405-410.
- 27 - Sestile CC, Maraschin JC, Gama VS, Zangrossi Jr H, Graeff FG, Audi EA. Panicolytic-like action of bradykinin in the dorsal periaqueductal gray through mu-opioid and B2-kinin receptors. *Neuropharmacology* 2017; 123: 80-87.
- 28 - Rouhiainen A, Kuleskaya N, Mennesson M, Misiewicz Z, Sipilä T, Sokolowska E et al. The bradykinin system in stress and anxiety in humans and mice. *Scientific Reports* 2019; 9: 19437. doi? <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55947-5>.
- 29 - Kihira S, Delman BN, Belani P, Stein L, Aggarwal A, Rigney B et al. Imaging features of acute encephalopathy in patients with COVID-19: A Case Series. *Ajnr Am. J. Neuroradiol.* 2020; 41: 1804-1808.
- 30 - Zhang BZ, Chu H, Han S. SARS-CoV-2 infects human neural progenitor cells and brain organoids. *Cell Research* 2020; 30: 928–931. doi: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0390-x>.
- 31 - Farkas H, Varga L. Ecallantide is a novel treatment for attacks of hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2011; 4:61–68. DOI: <https://doi.org/10.2147/CCID.S10322>
- 32 - Wilkerson RG. Angioedema in the emergency department: an evidence-based review. *Emergency Medicine Practice* 2012; 14: 1-21.
- 33 - Vaidya A, Williams JS. The relationship between vitamin D and the renin-angiotensin system in the pathophysiology of hypertension, kidney disease, and diabetes. *Metabolism* 2012; 61: 450-458. doi: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.09.007>
- 34 - Kalinska M, Meyer-Hoffert U, Kantyka T, Potempa J. Kallikreins - the melting pot of activity and function. *Biochimie* 2016; 122: 270-282. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.023>.



Cytokines Involved in COVID-19 and Chronic Inflammatory Diseases: A Perspective from Fibromyalgia

Elizandra Leal Steffen¹, Micheli Mainardi Pillat^{2*} and Jose Edson Paz da Silva¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Brazil

²Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Brazil

Abstract

The world is going through an outbreak of SARS-CoV-2 that can trigger the COVID-19. This article presents a literature review on COVID-19-related cytokines that can involve a higher risk of severe infection in patients with chronic inflammatory diseases. The key cytokines during the course of COVID-19, from the middle and severe clinical stage to early recovery stage, have been mapped, enabling to identify profiles involved in inflammatory storms (which can lead patients to death) and in the recovery of the disease. Levels of specific cytokines provide a patient prognosis as well as anti-cytokine drugs are an important therapeutic strategy for COVID-19 treatment. Patients with fibromyalgia and other chronic inflammatory diseases present inflammatory immune signature similar to COVID-19 patients, suggesting a higher risk of hyper-inflammation triggered by SARS-CoV-2. Moreover, patients with these diseases can use immunomodulatory and immunosuppressive drugs, resulting in different immunological states to battle SARS-CoV-2 infection.

Keywords: SARS-CoV-2; Hyper-inflammation; Treatment; Humanized antibodies; Inflammatory storm; Comorbidities

Introduction

On March 11th 2020, the World Health Organization (WHO) announced the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) outbreaks to be a pandemic that started in the Wuhan Province in China rapidly spread throughout the world [1]. The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by SARS-CoV-2, a Betacoronavirus with close relations with MERS-CoV (Middle East Respiratory System Syndrome coronavirus) and SARS-CoV-1, leads to an intense activation of the innate immune cells, especially in patients who develop the severe disease [2,3].

The signs and symptoms of the SARS-CoV-2 infection vary from no symptom, to a rapid progression of the COVID-19, and may lead the patient to death, depending on the immune response of the host [1,2]. The main risk factors are age and comorbidities, especially chronic obstructive pulmonary diseases, diabetes mellitus and cardiopathies. The risk of infection with severe outcome is also related to the exposure to high viral levels, causing a major occurrence of severe COVID-19 in health professionals [1].

COVID-19 and Chronic Inflammatory Diseases: A Perspective from Fibromyalgia

Patients with Immune-Mediated Inflammatory Diseases (IMIDs), such as rheumatoid arthritis, spondylarthritis, Crohn's Disease, psoriasis, as well as patients with diseases that change serum levels of cytokines, such as fibromyalgia, may present a higher risk to develop a severe form of COVID-19 [1,3]. The fibromyalgia syndrome is a chronic rheumatic condition characterized by a generalized pain. Despite not being a self-immune disease, there is solid evidence about the role of the inflammation on pathogenesis, maintenance, and treatment of this syndrome. In fact, cytokines, chemokines, lipid messengers, reactive species and several factors derived from the plasma sustain the patients' pathologic inflammatory condition with fibromyalgia and the possible higher risk to develop severe COVID-19 [4].

Several Studies about the immune response against SARS-CoV-2 have contributed on the identification of biomarkers for the prognostic of infected patients and for therapeutic targets in COVID-19 treatment. The levels of several pro-inflammatory cytokines, such TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, G-CSF and GM-CSF, besides chemokines, such MCP1, IP10 and MIP1a,

OPEN ACCESS

*Correspondence:

Micheli Mainardi Pillat, Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Avenue Roraima n° 1000, Santa Maria - RS 97105900, Brazil,

E-mail: micheli.pillat@ufsm.br

Received Date: 21 May 2020

Accepted Date: 19 Jun 2020

Published Date: 23 Jun 2020

Citation:

Steffen EL, Paz da Silva JE, Pillat MM. Cytokines Involved in COVID-19 and Chronic Inflammatory Diseases: A Perspective from Fibromyalgia. *Ann Clin Immunol Microbiol.* 2020; 2(1): 1013.

Copyright © 2020 Micheli Mainardi Pillat. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

are high in patients with COVID-19 [3]. Moreover, the severity of the COVID-19 shows positive correlation with the levels of pro-inflammatory cytokines IL-17A, IL-6, IL-15, TNF α and IFN- γ [2]. In fact, it is observed an exaggerated immune reaction in severely ill individuals with SARS-CoV-2. These aberrant innate immunity responses affects the functioning of the patient's organs and, on the contrary of what is expected, play a role on bad prognostics and death of the infected individual with SARS-CoV-2.

It is known that in several IMIDs, independently of the target tissue or the pathogenesis response Th1, Th2 or Th17, it is observed an exaggerated, inappropriate, and sustained innate and adaptive immune response [3]. In fibromyalgia, immune changes also occur and lead to an inflammatory condition. In this pathology the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is interrupted in favor of pro-inflammatory.

Cytokines, such as TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 [4,5]. The IL-6, alongside the TNF α , deserve a highlight since they are main cytokines released in affected tissues and are significantly elevated in the serum of patients with fibromyalgia. In addition, the IL-6 levels also correlate with the severity and pain sensation in fibromyalgia as well as with the severity of the COVID-19, being considered one of the main biomarkers for the bad prognosis of the SARS-CoV-2 infection [4].

Considering the complex scenario of the SARS-CoV-2 infection and the pre-existing inflammatory condition in patients affected by other pathologies, it has been suggested that all patients infected by SARS-CoV-2 undergo a hyper-inflammation triage. This triage could identify those patients benefited by immunosuppression or immunomodulation [6]. The Tocilizumab is an example of immunomodulatory drug. This humanized antibody anti-IL6 receptor, originally created to treat arthritis, has presented benefits on the treatment of the severe COVID-19 and is under testing in more than 45 clinical trials (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19&term=Tocilizumab&cntry=&state=&city=&dist=>). As the IL-6 is high in patients with fibromyalgia and this cytokine is an aggravating agent of the COVID-19, such a fact, per se, could explain a possible tendency in these patients to develop a severe SARS-CoV-2 infection. In fact, it is suggested that patients affected by this rheumatic condition are monitored as for their IL-6 levels and, in case of worsening of the clinic stage by viral infection, the use of IL-6 inhibitors (Tocilizumab, Clazakizumab or Sarilumab) are considered (after approval of these drugs).

Besides IL-6 inhibitors, other inhibitors of cytokines (TNF α and IL-17A) also can minimize the hyper-inflammatory condition, which is part of the severe COVID-19 pathogenesis and can be favored by pre-existing inflammatory pathologic diseases [2,3,7]. These drugs present the great benefit of being highly selective for individual mediators of the inflammation cascade; therefore, they do not take a large immunosuppression that could delay the specific adaptation response that is fighting the SARS-CoV-2 infection. However, specific humanized antibodies are usually expensive and hard to find.

In this context, one of the drug classes mostly used for IMIDs are corticoids. These are non-selective anti-inflammatory drugs act extensively suppressing the immune system, and for that reason are also classified as immunosuppressors. Additionally, in order to suppress the exacerbated innate immune response of the host, more than 20 clinical trials have investigated a Glucocorticoid (GC) therapy in the COVID-19 (clinicaltrials.gov). The risk of this therapeutic strategy with GC (specially elevated doses) is causing suppression

of specific responses anti-SARS-CoV-2 and, therefore, delay the elimination time of the virus, since the GC suppress the T CD4 cell response, that are crucial to start immune responses, and also the TCD8 cell response, which are specialists in eliminating the infected cells [8]. As for the soluble mediators, it is known that the GC can be beneficial in the treatment of the COVID-19, since they suppress almost cytokines related with the inflammatory storm that may lead the patient to death. However, due to the large immunosuppressive action, these drugs also suppress important cytokines for the person's recovery, such as the IL-2 [9]. The immune profiles of patients who recover from the COVID-19 have shown the participation of the IL-2 (early recovery stage) and [10], for that reason being administrated in SARS-CoV-2 patients in a phase 2 clinical trial held in France (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04357444). Another aggravation is the fact that in individuals with fibromyalgia an exaggerated physical response in the organism to the a persisting stimulus takes place (chronic stress, anxiety, depression) and that weakens the immune system facilitating a viral infection and possibly prejudicing SARS-CoV-2 clearance [1]. One of the mechanisms for such exaggerated responses to persisting stimulus involves the elevated levels of pro-inflammatory cytokines. The L-6, for instance, already mentioned for being highly concentrated in serum of patients with fibromyalgia, leads to fatigue, hyperalgesia, and depression and activates sympathetic nervous system [5].

The hydroxychloroquine, a drug that has been widely studied due to its potential effect on SARS-CoV-2 infection, has been used for more than 50 years in the treatment of rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis and lupus erythematosus. Several patients diagnosed with systemic lupus erythematosus also present fibromyalgia [11]. Possible beneficial mechanisms of hydroxychloroquine in these rheumatic diseases include the suppression of the TNF α , IL-6 and IL-1 β expressions, as shown in human monocytes/macrophages [12,13]. Thus, patients using hydroxychloroquine chronically for the treatment of rheumatic diseases possibly do not have high levels of these pro-inflammatory cytokines. Furthermore, whether the anti-SARS-CoV-2 efficacy is proven, they would be upon appropriate treatment since first exposition with the virus.

The uncertainties mostly concerning to patients with IMIDs and fibromyalgia are: If they continue working in health care or other frontline actions (the one who do so), due to the risk of seriously falling ill. They must carry on with their immunosuppressive drugs and if there will be shortage/lack of them (Hydroxychloroquine for instance). Therefore, rheumatologists have recommended patients should not discontinue their rheumatic medications unless they get sick and have high fever or serious infection: They must not stop their corticosteroids, if it is part of their daily use; they must not look for medical care for suspicion of SARS-CoV-2 infection unless they match the profile for testing (which is specific from place to place, but it may include fever, shortness of breath and cough) [1,4].

During and after the end the COVID-19 pandemic, the world economy will be damaged and patients will undergo stress, lack of income or unemployment and possibly little or no access to healthcare to their chronic diseases and uncertainties in their medical supplies. Unfortunately, a lot of people will die due to the pandemic and other may face worse outcomes in their chronic diseases because they cannot access their doctors on account of the quarantine and redirect of hospital resources to treat severely sick people infected by SARS-CoV-2.

References

1. Pope JE. What does the COVID-19 pandemic mean for rheumatology patients? *Curr Treatm Opt Rheumatol*. 2020;30:1-4.
2. Pacha O, Sallman MA, Evans SE. COVID-19: A case for inhibiting IL-17? *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):345-6.
3. Schett G, Sticherling M, Neurath MF. COVID-19: Risk for cytokine targeting in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(5):271-2.
4. Benlidayi IC. Role of inflammation in the pathogenesis and treatment of fibromyalgia. *Rheumatol Int*. 2019;39(5):781-91.
5. Rodriguez-Pintó I, Agmon-Levin N, Howard A, Shoenfeld Y. Fibromyalgia and cytokines. *Immunol Lett*. 2014;161(2):200-3.
6. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033-4.
7. Feldmann M, Maini RN, Woody JN, Holgate ST, Winter G, Rowland M, et al. Trials of anti-tumors necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. *Lancet*. 2020;395(10234):1407-9.
8. Ledford H. How does COVID-19 kill? Uncertainty is hampering doctors' ability to choose treatments. *Nature*. 2020;580(7803):311-12.
9. Northrop JP, Crabtree GR, Mattila PS. Negative regulation of interleukin 2 transcription by the glucocorticoid receptor. *J Exp Med*. 1992;175(5):1235-45.
10. Wen W, Su W, Tang H, Le W, Zhang X, Zheng Y, et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov*. 2020;6:31.
11. Taylor J, Skan J, Erb N, Carruthers B, Bowman S, Gordon C, et al. Lupus patients with fatigue - is there a link with fibromyalgia syndrome? *Rheumatology*. 2000;39(6):620-3.
12. Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue MD. Chloroquine inhibit production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 from lipopoly-saccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology*. 2006;45(6):703-10.
13. Silva JC, Mariz HA, Rocha Jr LF, de Oliveira PSS, Dantas AT, Duarte ALBP et al. Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Clinics*. 2013;68(6):766-71.

7 DISCUSSÃO

Acredita-se que o surgimento da SFM ocorra pelo processamento sensorial central do sinal de dor anormal, envolvendo a interação entre neurotransmissores, estressores externos, construções comportamentais, hormônios e sistema nervoso simpático (BAZZICHI et al., 2007). A etiopatogênese da FM, assim como o exato papel que as citocinas desempenhem nesta síndrome ainda não estão bem claros. Por consequência não há testes hematoquímicos ou instrumentais específicos como base diagnóstica (BAZZICHI et al., 2007). No entanto, os testes laboratoriais e o exame físico são úteis, não só, para se descartar outras patologias, como também, para fechar o diagnóstico de FM (ELMAS et al., 2016).

Já, o tratamento (paliativo) ideal para esta síndrome requer uma abordagem multidisciplinar, individualizada, com a combinação de terapia farmacológica e não-farmacológica (HEYMAN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2017; ERNBERG et al., 2018). Dentre as modalidades não-farmacológicas, a acupuntura, técnica que altera o processamento sensorial da dor (aumenta o limiar da dor), reduz significativamente o consumo de fármacos por parte dos indivíduos que recorrem a esta terapia (MARTINEZ & MACIAS, 2012).

No Manuscrito I foi demonstrado que os pacientes portadores de FM tendem a apresentar sobrepeso/obesidade, como constatado por Cordero et al. (2014) que encontraram maior prevalência de sobrepeso e obesidade em indivíduos com FM que na população em geral. Por consequência, no presente estudo, as pacientes com FM apresentaram níveis de AU, TG e PCR-Us significativamente aumentados em relação ao grupo controle, dados estes, muito provavelmente, influenciados por fatores como IMC e comorbidades associadas à FM (FEINBERG et al. 2017). Quanto as dosagens das citocinas, verificou-se que as pacientes com FM apresentaram TNF sérico diminuído corroborando com os achados de GARCIA-LOZANO et al., 2008; HERNANDEZ et al., 2010 e Kadetoff et al., 2011 e, apresentaram IFN- γ sérico aumentado em relação ao grupo controle (ORTEGA et al., 2012). Embora as diferenças, encontradas nos biomarcadores analisados neste estudo, antes e após quatro semanas de terapia complementar com acupuntura, não tenham sido muito intensas, é possível verificar algumas alterações, tais como nas plaquetas totais. A grande variação encontrada nos resultados, destacadamente nas citocinas, em

sujeitos com FM é, em parte, justificada por interferentes como estresse, variação diurna, atividade física, alterações de dieta, depressão e medicação utilizada.

No segundo Manuscrito, o peptídeo bradicinina foi relacionado com os sintomas neurológicos, dor e inflamação observados na doença desencadeada por SARS-CoV-2, o qual também pode estar presente na FM. Estudos com modelos animais de dor associada à FM sugerem que este peptídeo está envolvido na patofisiologia desta síndrome (BRUSCO et al., 2017; BRUSCO et al., 2019). Já, o Artigo científico, discute a relação da COVID-19 com algumas citocinas específicas, as quais, na doença por coronavírus são capazes de fornecer um prognóstico do paciente, bem como, algumas drogas anticitocinas são uma estratégia terapêutica importante para o tratamento da COVID-19 (JANG et al., 2006). Pacientes com fibromialgia e outras doenças inflamatórias crônicas apresentam assinatura imune inflamatória semelhante a pacientes com COVID-19, sugerindo maior risco de hiperinflamação desencadeada pela SARS-CoV-2 (SCHETT; STICHERLING; NEURATH, 2020). Além disso, pacientes com essas doenças podem usar drogas imunomoduladoras e imunossupressoras, resultando em diferentes estados imunológicos para combater a infecção por SARS-CoV-2.

8 CONCLUSÃO

A presente investigação, diferentemente das demais pesquisas acerca do comportamento de biomarcadores na FM realizadas ao longo das últimas décadas, verificou de forma inédita o comportamento destes em pacientes fibromiálgicos após terapia com acupuntura durante um mês. Os resultados laboratoriais encontrados não demonstraram um padrão claro de biomarcadores comuns nos fibromiálgicos, tanto antes quanto após terapia com acupuntura. Destacadamente, verificamos que as citocinas, apesar de desempenharem um importante papel na FM não são biomarcadores fiáveis desta síndrome. Desta forma, o diagnóstico da FM permanece dependente dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes (primordialmente do exame físico) e a combinação de uma terapia farmacológica e não-farmacológica, individualizada é o mais indicado para conviver a FM.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. **Fibromyalgia**. Disponível em: <https://www.rheumatology.org/I-Am-A/Patient-Caregiver/Diseases-Conditions/Fibromyalgia> and https://www.rheumatology.org/Practice/Clinical/Patients/Diseases_And_Conditions/Fibromyalgia/. Acesso em: 01 dez. 2018.
- BAZZICHI, L.; ROSSI, A.; MASSIMETTI, G. et al. Cytokine patterns in fibromyalgia and their correlation with clinical manifestations. **Clin Exp Rheumatol**, v. 25, n. 2, p. 225-230, 2007.
- BRUSCO, I.; SILVA, C. R.; TREVISAN, G. et al. Potentiation of paclitaxel-induced pain syndrome in mice by angiotensin i converting enzyme inhibition and involvement of kinins. **Mol Neurobiol**, n. 54, p. 7824–7837, 2017. doi: 10.1007/s12035-016-0275-7.
- BRUSCO, I.; JUSTINO, A. B.; SILVA, C. R. et al. Kinins and their B1 and B2 receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. **Biochemical Pharmacology**, n. 168, p. 119-132, oct. 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.023>.
- CLAUW, D. J. Fibromyalgia: a clinical review. **JAMA**, n. 311, p 1547-1555, 2014. doi: 10.1001/jama.2014.3266.
- CORDERO, M. D.; ALCOCER-GOMES, E.; CANO-GARCIA, F. J. et al. Clinical symptoms in fibromyalgia are associated to overweight and lipid profile. **Rheumatol Int**, v. 34, n. 3, p. 419-22, mar. 2014.
- DEARE, J. C.; ZHENG, Z., XUE, C. C. L. et al. Acupuncture for treating fibromyalgia. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 5, p. 1-110, 2013.
- ELMAS, O.; YILDIZ, S.; BILGIN, S. et al. Physiological parameters as a tool in the diagnosis of fibromyalgia syndrome in females: a preliminary study. **Life Sciences**, v. 145, n. 15, p. 51-56, jan. 2016.
- ERNBERG, M.; CHRISTIDIS, N.; GHAFOURI, B. et al. Plasma cytokine levels in fibromyalgia and their response to 15 weeks of progressive resistance exercise or relaxation therapy. **Mediators Inflamm**, v. 2108, p.14, abr. 2018.
- FEINBERG, T.; SAMBAMOORTHY, U.; LILLY, C. et al. potencial mediators between fibromyalgia and c-reactive protein: results from a Large U.S. Community Survey. **BMC Musculoskeletal Disord**, v. 18, n. 1, p. 294, jul. 2017.
- FERNANDES, I.; MARECO, R.; JALECO, A. **Perfil de citocinas na fibromialgia**. 2012. Artigo de Revisão. Portugal: Universidade Atlântica. Barcarena, 2012.

GARCIA-LOZANO, J.; CAPILLA-SEVILLA, C.; GARCÍA-LÓPEZ, O. et al. Correlation between cytokines and anxious-depressive symptoms in patients with fibromyalgia. **Reumatol Clin**, v. 4, n. 4, p. 136-139, 2008. doi: 10.1016/S1699-258X (08)71822-9.

GARWAL, A.; ADACHI, J. D.; SAMBORSKI, W.; GONCERZ, G. **Fibromyalgia**. Kraków: Medycyna Praktyczna. 2021. Disponível em: <https://empendium.com/mcmtxtbook/chapter/B31.II.16.21>. Acesso em 17 fev.2021.

HÄUSER, W.; ABLIN, J.; PERROT, S. et al. Management of fibromyalgia: key messages from recent evidence-based guidelines. **Pol Arch of Intern Med**, v. 127, n. 1, p. 47-56, 2017.

HERNANDEZ, M.; BECERRIL, E.; PEREZ, M. E. et al. Pro inflammatory cytokine levels in fibromyalgia patients are independent of body mass index. **BMC Res Notes**, v. 3, p. 156-160, 2010.

HEYMANN, R. E; PAIVA, E. S.; HELFENSEIN JR., M et al. Consenso brasileiro do tratamento da fibromialgia. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 1, p. 56-66, 2010.

JANG, C. H.; CHOI, J. H. BYUN, M. S. et al. Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. **Rheumatology**, Oxford, v. 45, n. 6 p. 703-10, jun. 2006. doi: 10.1093/rheumatology/kei282.

LESUIS, N.; VAN VLIET, J.; BOERS, N. et al. The value of routine creatine kinase and thyroid stimulating hormone testing in patients whit suspected fibromyalgia: across-sectional study. **Rheumatology Advance Acces**, v. 55, n. 7, p. 1273-6, mar. 2016.

KADETOFF, D.; LAMPA, J.; WESTMAN, M. et al. Evidence of central inflammation in fibromyalgia-increased cerebrospinal fluid interleukin-8 levels. **Journal of Neuroimmunology**, v. 242, n. 1-2), p. 33-38, 2012. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.10.013.

MARTINEZ, N. R.; MACIAS, M. A. Acupuntura em el manejo complementário de la fibromialgia. **Revista Colombiana de Reumatologia**. v. 19, n. 1, p. 27-39, mar. 2012.

RANZOLIN, A.; DUARTE, A. L. B. P.; BRADEMEIER, M. et al. Evaluation of cytokines, oxidative stress markers and brain-derived neurotrophic factor in patients with fibromyalgia – A controlled cross-sectional study. **Cytokine**, v. 84, p. 25-28, 2016.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. et al. Citocinas e dor. **Rev. Bras. Anestesiol**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 255-265, mar/abr. 2011.

ORTEGA, E.; BOTE, M. E.; GIRALDO, E. et al. Aquatic exercise improves the monocyte pro- and anti-inflammatory cytokines production balance in fibromyalgia patients. **Scand J Med Sci Sports**, v. 22, n. 1, p. 104-112, 2012. doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01132. x.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, n. 120, p. 3779-3787, 2020. doi: 10.1172/JCI43766.

PASSOS, R. S.; VILAS BÔAS, S.S.; VIEIRA, R.P. Efeitos da acupuntura na fibromialgia: uma revisão bibliométrica. **Acta biomédica brasiliensia**, v. 7, n. 2, p. 15-21, dez. 2016.

POPE, J. E. What does the COVID-19 Pandemic mean for rheumatology patients? **Curr Treatm Opt Rheumatol.**, n. 30, p. 1-4, 2020. doi: 10.1007/s40674-020-00145y.

RAEBURN, C. D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K. A. et al. Cytokines for surgeons. **Am J Surg**, n. 183, p. 268-273, 2002.

RAMALHO, F. S. A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. **Acta Cir. Bras.**, v. 15, supl. 2, 2000. doi: 10.1590/S0102-86,50200000060000-4.

RIBEIRO, V. G. C.; MENDONÇA, V.A.; SOUZA, A. L.C. et al. Inflammatory biomarkers responses after acute whole body vibration in fibromyalgia. **Braz J Med Biol Res**, v. 51, n. 4, p. e6775, mar. 2018. doi: 10.1590/1414-431X20176775.

SCHOLZ, J. R.; LOPES, M. A. C. Q.; SARAIVA, J. F. K et al. COVID-19. Renin-Angiotensin System. Angiotensin-Converting Enzyme 2, and Nicotine: what is the interrelation? **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 115, n. 4, p. 708-711, 2020. doi: 10.36660/abc.20200653.

SCHETT, G.; STICHERLING, M.; NEURATH, M. F. COVID-19: risk for cytokine targeting in chronic inflammatory diseases? Georg Schett et al. **Nat Rev Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 271-272, may 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. **Comissão de dor, fibromialgia e outras síndromes dolorosas de partes moles**. Editoração de Rian Narcizo Mariano. SãoPaulo: Letracapital, 2011.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, chemokines and pain. In: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F. et al. **Pharmacology of pain**. Seattle: IASP Press, 2010. p. 279-302.

STAUD, R.; SMITHERMAN, M. L. Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: pathogenetic role. **Curr Pain Headache Rep**, n. 6, p. 259–266, 2002.

STIVAL, R. S. M.; CAVALHEIRO, P. R.; STAISK, C. E. S. et al. Acupuntura na fibromialgia: um estudo randomizado-controlado abordando a resposta imediata da dor. **Rev. Bras. Reumatol**, São Paulo, v. 54, n. 6, p. 431-436, dez. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e o Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Funcional da Universidade Federal de Santa Maria convidam você para participar da pesquisa nomeada **Fibromialgia: Estudos envolvendo mecanismos fisiopatológicos associados à dor, inflamação e dano muscular e o potencial efeito da acupuntura sobre estes processos**, que tem por objetivo determinar através da acupuntura e exames laboratoriais o alívio da dor em pacientes com fibromialgia.

Todas as informações necessárias serão confidenciais, utilizadas estritamente nesta pesquisa e sua identidade será preservada.

Para atingir os objetivos propostos nesta pesquisa, este termo de consentimento será dividido em 2 grupos de participantes:

Grupo 1 – Pacientes com Fibromialgia e Grupo 2 – Pacientes Saudáveis.

Grupo 1 – Pacientes com Fibromialgia

Sua participação nesta pesquisa consiste em responder um questionário contendo alguns dados de identificação e dados referentes a fibromialgia e outras doenças que você apresente; responder questões contidas na escala visual analógica (EVA), que avalia a dor; responder um questionário de impacto da fibromialgia (QIF), que avalia a qualidade de vida; ter sua intensidade de dor verificada pelo algômetro; ser submetida a 4 sessões de acupuntura (tratamento ou placebo, conforme o grupo em que você for inserida por sorteio) com duração de 30 minutos cada, 1 vez por semana, durante 4 semanas consecutivas, sem que você deixe, em momento algum, de continuar seu tratamento medicamentoso e atividades cotidianas e 2 coletas de sangue venoso para realização de exames laboratoriais. A primeira coleta será efetuada antes do início das sessões de acupuntura, para a qual você será instruída a estar em jejum. A outra coleta será realizada depois da última sessão de acupuntura (4^o sessão).

Você estará ciente de que será necessário ir até o Departamento de Fisioterapia da UFSM, localizado no prédio 26C do campus universitário 1 vez por

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria
Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 2^o andar - Sala Comitê de Ética
Cidade Universitária - Bairro Camobi
97105-900 - Santa Maria – RS
(55) 3220 9362 - cep.ufsm@gmail.com

semana, durante 4 semanas consecutivas, que as sessões de acupuntura serão agendadas com antecedência pelos responsáveis desta pesquisa e que o deslocamento para a universidade será de sua responsabilidade.

Caso, você se sinta cansada ou desconfortável respondendo os questionários ou durante a acupuntura, estes procedimentos serão interrompidos e você terá total liberdade para continuar ou não participando da pesquisa.

Sua participação e aceite para participar desta pesquisa é voluntária e, portanto, você não receberá nenhum tipo de recompensa financeira e poderá retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma.

A acupuntura será efetuada pelo fisioterapeuta engajado nesta pesquisa com especialização neste procedimento. Serão utilizadas agulhas descartáveis próprias para acupuntura em 12 pontos do seu corpo e o desconforto da acupuntura se resume à picada local. No entanto, pequenos hematomas (manchas roxas) podem se formar após as sessões de acupuntura, mas costumam desaparecer em poucas horas ou dias e não requerem nenhum cuidado especial.

Já, a coleta de sangue venoso será feita pela farmacêutica-bioquímica, também, engajada nesta pesquisa e todo o material utilizado será descartável. Após a coleta, você deve pressionar, sem massagear, o local da retirada de sangue durante 3 a 5 min com o braço estendido. Você, também, deve evitar dobrar o braço por alguns minutos e evitar carregar peso no braço punccionado para evitar o surgimento de equimose (extravasamento de sangue) e hematoma no local da coleta.

Caso ocorra hematoma, tanto nos pontos de acupuntura quanto no local da coleta de sangue venoso, você deve colocar compressas de gelo por 15 min, a cada hora nas primeiras 6 horas, nos pontos com hematoma. Depois, você pode colocar compressas mornas para ajudar a eliminar o hematoma mais rapidamente, ou então, usar um gel anti-inflamatório 3 ou 4 vezes por dia, que também acelera o desaparecimento do hematoma.

Você terá acesso a todos os resultados obtidos através dos questionários e dos exames laboratoriais propostos nesta pesquisa, os quais serão disponibilizados para você no término das 4 semanas de tratamento, sem nenhum custo.

Além disso, ao término do projeto, se for verificada uma melhora significativa entre as pacientes submetidas à acupuntura em relação às pacientes do grupo placebo, as participantes sorteadas para pertencer ao grupo placebo serão contatadas e lhes serão oferecidas 4 sessões de acupuntura medicamentosa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será redigido em duas vias, ficando uma em posse do pesquisador responsável por esta pesquisa e outra com você, participante da pesquisa.

Grupo 2 – Pacientes Saudáveis

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder um questionário para coleta de alguns dados de identificação e apenas 1 coleta de sangue venoso, em jejum, para a realização de exames laboratoriais.

Caso você se sinta cansada ou desconfortável durante a aplicação do questionário as perguntas serão interrompidas e você terá liberdade para continuar ou não participando da pesquisa.

A coleta de sangue venoso será efetuada pela farmacêutica-bioquímica engajada nesta pesquisa e todo material utilizado é descartável. Os desconfortos e riscos da coleta de sangue serão apenas aqueles decorrentes de uma coleta usual em laboratório clínico (pequena mancha roxa no local e/ou leve dor local) que poderão ou não ocorrer.

Após a coleta, você deve pressionar, sem massagear, o local da retirada de sangue com algodão durante 3 a 5 min com o braço estendido. Você, também, deve evitar dobrar o braço por alguns minutos e evitar carregar peso no braço punccionado para minimizar o surgimento de equimose (extravasamento de sangue) e hematoma no local da coleta.

Caso ocorra hematoma no local da coleta, você pode colocar compressas de gelo por 15 min, a cada hora nas primeiras 6 horas no local do hematoma. Depois, você pode colocar compressas mornas para ajudar a eliminar o hematoma mais rapidamente ou usar um gel anti-inflamatório 3 ou 4 vezes por dia para acelerar o desaparecimento do hematoma.

Sua participação e aceite nesta pesquisa são voluntários e, portanto, você não receberá nenhum tipo de recompensa financeira, podendo retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma.

Você terá acesso a todos os resultados obtidos nos exames laboratoriais, depois de processados, sem nenhum custo.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será redigido em duas vias, ficando uma em posse do pesquisador responsável por esta pesquisa e outra com você, participante da pesquisa.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto eu,.....

() paciente com fibromialgia - grupo 1;

() participante saudável - grupo 2,

concordo em participar desta pesquisa, assinando este consentimento.

Assinatura da Participante:

Assinatura do Pesquisador Responsável pela pesquisa:

Santa Maria,de.....de 2017/2018.

Em caso de dúvidas entrar em contato com o prof. orientador Dr. José Edson Paz da Silva pelo fone 3220-8503 ou com um de seus alunos de pós-graduação: Gustavo Urbanetto Baelz, pelo celular 99621-5319 e Elizandra Leal Steffen, pelo fone 3317-0615 ou celular 99922-2073, ou ainda, com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM pelos fones 3220-9362 ou 3220-962.

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO

Questionário aplicado as participantes do projeto **Fibromialgia: estudos envolvendo mecanismos fisiopatológicos associados à dor, inflamação e dano muscular e o potencial efeito da acupuntura sobre estes processos:**

Grupo Tratamento (pacientes com fibromialgia submetidas a acupuntura); Grupo Placebo (pacientes com fibromialgia submetidas a sham acupuntura) e Grupo Controle (pacientes saudáveis).

Dados acerca da Fibromialgia:

Participante saudável, sem fibromialgia: () Sim () Não

Tempo de diagnóstico de fibromialgia: () menos de 6 meses () entre 6 meses à 1 ano () entre 1 a 2 anos () mais de 2 anos

Comorbidades associadas: Qual(is) e há quanto tempo?

Medicamentos utilizados no tratamento:

() Analgésico. Qual(is):

() Anti-inflamatório. Qual(is):

() Antidepressivo. Qual(is):

() Outras categorias. Qual(is):

É fumante: () Sim () Não. Quantidade de cigarros consumidos por dia:

Pratica atividade física regularmente: () Não () Sim. Quantas vezes por semana, durante quanto tempo:

Medidas antropométricas:

Peso ao ingressar no grupo de estudo:

Altura:

Índice de massa corpórea (IMC):

Grupo de estudo:

() Tratamento (participante com fibromialgia submetida à acupuntura)

() Placebo (participante com fibromialgia submetida a sham acupuntura)

() Controle (participante saudável)

Intervenções:

1ª intervenção: ()Compareceu ()Não compareceu

2ª intervenção: ()Compareceu ()Não compareceu

3ª intervenção: ()Compareceu ()Não compareceu

4ª intervenção: ()Compareceu ()Não compareceu

Resultados dos exames laboratoriais:

Hemograma:

Glicose de jejum:

Colesterol total:

Triglicerídeos:

Ácido úrico:

Creatinina:

Proteína C reativa (PCR):

Creatina quinase (CK):

Interleucina-2 (IL-2):

Interleucina-4 (IL-4):

Interleucina-6 (IL-6):

Interleucina-10 (IL-10):

Fator de Necrose Tumoral (TNF):

Gama-Interferon (IFN):

Interleucina-17A (IL-17A):

Contato telefônico:

Telefone residencial:

Celular:

Assinatura do responsável pela coleta dos dados:

APÊNDICE C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO I

14/01/2021

ScholarOne Manuscripts

 Brazilian Journal of Medical and Biological Research

 Home

 Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Manuscript ID

11234

Title

Serum biomarkers of fibromyalgia patients undergoing acupuncture therapy

Authors

Steffen, Elizandra

Moresco, Rafael

Marques, Clandio

Pillat, Micheli

Silva, José Edson

Date Submitted

14-Jan-2021

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2021. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

APÊNDICE D – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II

17/02/2021

E-mail de Webmail da Universidade Federal de Santa Maria - Confirming submission to Immunology Letters



UFSCAR

MICHELI MAINARDI PILLAT <micheli.pillat@ufsm.br>

Confirming submission to Immunology Letters

1 mensagem

Immunology Letters <em@editorialmanager.com>
Responder a: Immunology Letters <immunologyletters@elsevier.com>
Para: Micheli Mainardi Pillat <micheli.pillat@ufsm.br>

17 de fevereiro de 2021 13:34

This is an automated message.

Bradykinin as a target for SARS-CoV-2 treatment: Possible mediator for inflammation, pain, and neurological symptoms in patients with COVID-19 or fibromyalgia

Dear Prof. Pillat,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Immunology Letters.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/imlet/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Immunology Letters

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/imlet/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.