

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**NÍVEIS SÉRICOS DE BDNF E S100B EM PACIENTES COM DOR CRÔNICA E
SÍNDROME DE SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL COM LESÃO ESTRUTURAL
PRESENTE E AUSENTE**

FABRICIO MOURA LEITE

Porto Alegre, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**NÍVEIS SÉRICOS DE BDNF E S100B EM PACIENTES COM DOR CRÔNICA E
SÍNDROME DE SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL COM LESÃO ESTRUTURAL
PRESENTE E AUSENTE**

FABRICIO MOURA LEITE

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Paula Cadore Stefani

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Leite , Fabricio Moura

Níveis Séricos de BDNF e S100B em Paciente com Dor Crônica e Síndrome de Sensibilização Central com Lesão Estrutural Presente e Ausente / Fabricio Moura
Leite . -- 2018.

67 f.

Orientadora: Luciana Paula Cadore Stefani.

Coorientador: Wolnei Caumo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Dor Crônica. 2. Sensibilização Central. 3. BDNF.
4. S100B. I. Stefani, Luciana Paula Cadore, orient.
II. Caumo, Wolnei, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

(PPGCM - UFRGS)

Prof. Dr. Joao Sabino Lahorgue Da Cunha Filho

(PPGCM-UFRGS)

Profa. Dra. Andressa de Souza

(PPG Saúde e Desenvolvimento Humano – Uni La Salle)

Prof. Dr. Maxciel Zortea

(Laboratorio de Dor e Neuromodulação HCPA-UFRGS)

EQUIPE DE TRABALHO

ALUNO

Fabricio Moura Leite

Médico graduado pela Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Especialista em Anestesiologia pelo CET do Serviço de Anestesiologia e Medicina Perioperatória do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – SAMPE/HCPA.

ORIENTADORA

Luciana Cadore Stefani, M.D., PhD.

Professora Adjunta do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRGS. Doutora em Ciências Médicas da FAMED/UFRGS. Professora do Serviço de Anestesiologia e Medicina Perioperatória (SAMPE)/HCPA. Chefe do Serviço de Anestesia e Medicina Perioperatória do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - SAMPE/HCPA.

CO - ORIENTADOR

Wolnei Caumo, M.D., PhD.

Professor Associado do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Especialista em Tratamento de Dor e Medicina Paliativa pela UFRGS-AMB. Membro do Serviço de Dor e Medicina Paliativa da Hospital de Clínicas de Porto Alegre Coordenador do Grupo do Laboratório de Pesquisa em Dor & Neuromodulação. CNPq-HCPA.

O importante é não parar nunca de questionar.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Auri Moura Leite e Iracy Teresinha Barrida Leite por todo o amor, carinho e dedicação sempre.
- À minha esposa Anne Elise Chaves por todos os 10 anos de convívio, amor e companheirismo.
- Ao Joaquim, nosso filho, apesar de tão pequeno nos enche tanto de alegria. Que todo esse esforço sirva de exemplo em algum momento de sua formação.
- À minha orientadora Profa. Dra. Luciana Cadore Stefani, por me apoiar e incentivar no caminho da pesquisa, obrigado pela oportunidade e por todos os ensinamentos.
- Ao Prof. Dr. Wolnei Caumo, obrigado pela confiança e oportunidade de fazer parte dessa pesquisa.
- Ao meu amigo Fabio Fredrich, pelo apoio no início da pesquisa.
- Às nossas pacientes e voluntárias, pela paciência, dedicação, e confiança em nossa pesquisa. Seus esforços serão lembrados e ajudarão construir novos caminhos no entendimento da doença e seu tratamento.
- Ao Serviço de Anestesia e Medicina Perioperatória - SAMPE, pela formação profissional, e por todo o apoio para trabalhar nesta dissertação.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Síndrome de Sensibilização Central (SSC) engloba alterações fisiopatológicas decorrentes da plasticidade neural mal adaptativa associadas a doenças que cursam com dor crônica. Doenças com diferentes espectros como aquelas com persistente nocicepção somática ou visceral, como osteoartrite (OA) e endometriose, ou síndromes com ausência de patologia estrutural como cefaleia crônica tensional (CCT) e fibromialgia (FM) podem apresentar SSC. Marcadores de atividade do SNC estão sendo estudados com intuito de elucidar os mecanismos diferenciais associados a essas patologias, dentre eles a atividade da proteína S100B e a neurotrofina BDNF. Esses marcadores podem estar associados a vias específicas da atividade nociceptiva.

OBJETIVOS: Verificar a associação entre proteína S100B e a neurotrofina BDNF em pacientes portadores de dor crônica com SSC e lesão nociceptiva somática/visceral persistente com portadores de dor crônica com SSC sem lesão estrutural e com controles saudáveis.

METODOLOGIA: Estudo transversal com 315 pacientes femininas, que comparou os níveis séricos de S100B e BDNF em 124 pacientes com SSC persistente [osteoartrite (88), endometriose (36)], 150 pacientes com SSC e lesão estrutural ausente [Fibromialgia (117), Cefaleia Crônica Tensional (33)] e 41 controles saudáveis. Os níveis de dor foram avaliados por meio da escala análogo visual de dor (EAV) de 0 (sem dor) a 10 (dor insuportável). Os grupos foram comparados por análise de variâncias (ANOVA).

RESULTADOS: No grupo FM (M=38,92 ; DP=19,8) e CCT (M= 37,54; DP=17,3), observou-se níveis maiores de BDNF quando comparado ao grupo OA (M=25,17; DP=10.4), endometriose (M=24,03; DP = 8,41) e controles (M=23,17; DP=8,85), $P < 0,05$. Quanto ao S100B, os grupos FM (M=19,4; DP=9.71) e CCT (M=14,82; DP=4,63) apresentaram menores níveis da proteína do que os grupos OA (M=23.99; DP=11,06) e controles saudáveis (M= 11,23; DP=8,27), porém o grupo endometriose (M=20,27; DP=10,07) apresentou níveis semelhantes da proteína quando comparado ao grupo FM, $P < 0,05$. Os pacientes do grupo de endometriose apresentaram menos dor na EAV (M=5,2; DP=1,36) quando comparado aos demais grupos FM (M=6.95; DP=1.76) , AO (M=5.54; DP= 2,4) e CCT (M=6,24; DP=1.49), $P < 0,05$, já o consumo de analgésicos foi

significativamente maior no grupo de pacientes fibromialgicas onde 83% consumiram > 3 doses/semana.

CONCLUSÃO: Os dados demonstraram um aumento nos níveis de BDNF no grupo de patologias sem aferência nociceptiva persistente. Já no grupo de pacientes com persistência de lesão estrutural não foi encontrado o predomínio de um marcador, sendo observado um discreto aumento do S100B em relação ao BDNF. Os achados demonstram que o BDNF está associado a dor crônica sem lesão estrutural, já a S100 não pode ser considerada um marcador diferenciado para cenários específicos de dor crônica.

Palavras Chave: Dor Crônica, Sensibilização Central, BDNF, S100B

ABSTRACT

INTRODUCTION: Central Sensitivity Syndrome (SSC) encompasses pathophysiological changes due to maladaptive neural plasticity associated with chronic pain. Diseases with different spectra such as those with persistent somatic or visceral nociception such as osteoarthritis (OA) and endometriosis, or syndromes with no structural pathology such as chronic tension headache (CCT) and fibromyalgia (FM) may present with SSC. Markers of CNS activity are being studied in order to elucidate the differential mechanisms associated with these pathologies, among them the activity of protein S100B and neurotrophin BDNF. These markers may be associated with specific pathways of nociceptive activity.

OBJECTIVES: To verify the association between S100B protein and BDNF neurotrophin in patients with chronic pain with SSC and persistent somatic / visceral nociceptive lesion with chronic pain patients with SSC without structural damage and with healthy controls.

METHODS: A cross-sectional study with 315 female patients comparing serum levels of S100B and BDNF in 124 patients with persistent SSC [osteoarthritis (88), endometriosis (36)], 150 patients with SSC, and absent structural damage [Fibromyalgia (117), Chronic Tension Headache (33)] and 41 healthy controls. Pain levels were assessed using visual analog pain scale (VAS) from 0 (no pain) to 10 (unbearable pain). The groups were compared by analysis of variances (ANOVA).

RESULTS: In the FM group (M = 38.92, SD = 19.8) and CCT (M = 37.54, SD = 17.3), higher levels of BDNF were observed when compared to the OA group (M = 25 , 17, SD = 10.4), endometriosis (M = 24.03, SD = 8.41) and controls (M = 23.17, SD = 8.85), P <0.05. As for S100B, FM (M = 19.4, SD = 9.71) and CCT (M = 14.82, SD = 4.63) had lower protein levels than OA groups (M = 23.99, SD = 11,06) and healthy controls (M = 11,23, SD = 8.27), but the endometriosis group (M = 20,27; SD = 10,07) presented similar protein levels when compared to the FM, P group <0.05. Patients in the endometriosis group had less pain in VAS (M = 5.2, SD = 1.36) when compared to the other FM groups (M = 6.95, SD = 1.76), AO (M = 5.54, SD = 4) and CCT (M = 6.24, SD = 1.49), P <0.05, analgesic consumption was significantly higher in the group of fibromyalgic patients, where 83% consumed > 3 doses / week.

CONCLUSION: The study demonstrated an increase in BDNF levels in the group of pathologies without structural pathology. In the group of patients with persistence of structural lesion, a predominance of a marker was not found, with a slight increase of S100B in relation to BDNF. The findings demonstrate that BDNF is associated with chronic pain without structural injury, otherwise S100 can not be considered a differentiated marker for specific chronic pain scenarios.

Keywords: Chronic Pain, Central Sensitization, BDNF, S100B

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam esta pesquisa.	20
Figura 2 - Etapas do processamento da dor.....	23
Figura 3: Diagrama de Venn	26
Figura 4: Representação do mecanismo pró-nocicepção e antinocicepção	27
Figura 5: Mecanismos da dor na osteoartrite	29
Figura 6: Modelo fisiopatológico de dor na endometriose.....	31
Figura 7. Modelo de potencialização da via glutamatérgicas.....	32
Figura 8 - Modelo de modulação gabaérgicas mediado pelo BDNF no corno dorsal da medula.	33
Figura 9: Marco Teórico.....	35

LISTA DE FIGURAS

Artigo em inglês

- Fig 1:** CONSORT 2010 flow diagrams. The present cross-sectional study pooled baseline data from six clinical trials run at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), that recruited women with fibromyalgia, osteoarthritis, endometriosis and chronic tension type headache. 59
- Fig 2** Serum neuroplasticity mediators concentration according to the presence or absence of structural lesion 60
- Fig 3** Serum neuroplasticity mediators concentration. Differences were tested using MANCOVA adjusted to covariants: moderate/severe depression, age, pain scale and use of pain medication. The groups sharing a letter are not significantly different..... 61

LISTA DE TABELAS

Artigo em inglês

- Table 1.** Sample Characteristics..... 62
- Table 2** – Serum Neuroplasticity Mediator’s Concentration 63

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*

BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BDI: Beck Depression Inventory (

CNS: sistema nervoso central

CCT: cefaleia crônica tensional

CTTH: Chronic Tensional Type Headache

CSS: Central Sensitivity Syndrome

CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DP: Desvio Padrão

EAV: Escala análogo-visual

FM: Fibromialgia

GDNF: Fator neurotrófico derivado da glia

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

IL-1 β : 1interleucina- 1 β

LTP: *long-term potentiation*

MAP: quinase Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MT: Receptor melatonérgico

NAT: Serotonina-N-acetyl transferase

NGF: Fator de crescimento do nervo

NMDA: N-metil-D-aspartato

NF- κ B : Nuclear Factor Kappa-Light-chain-enhancer

OA: Osteoartrite

PKC: *Protein Kinase C*

PAG: substância cinza periaquedutal

PPT: Limiar de dor à pressão

RAGE: Receptor Advanced Glycation End Product)

S100B: Proteína S100beta

SICI: Inibição intracortical curta

SC: Sensibilizacao Central

SE: Erro padrão

SFP: Síndrome Fibromialgia Primária

SDP: Síndrome Dismenorreia Primária

SII: Síndrome Intestino Irritável.

SSC: Síndrome de Sensibilização Central

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: sistema nervoso periférico

SP: substância P

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

VAS: escala análogo visual de dor

WU: Wind Up

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	19
2.2 Fisiopatologia da dor	20
2.2.1 Síndrome de Sensibilização Central	23
2.3 SSC e patologias com Lesão Estrutural Ausente e Presente	24
2.3.1 Cefaleia Crônica Tensional.....	25
2.3.2 Fibromialgia.....	26
2.3.3 Osteoartrite	27
2.3.4 Endometriose	28
2.4 Marcadores de Sensibilização Central	29
2.4.1 Brain Derived Neurotrophic Factor - BDNF	30
2.4.2 S100B	33
3. MARCO TEÓRICO	35
4. JUSTIFICATIVA	36
5. OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo Geral.....	37
5.2 Objetivos Específicos.....	37
6. BIBLIOGRAFIA	38
7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	43
7.1 Biomarkers Serum S100B and BDNF levels vary according the presence or absence of structural pathology in chronic pain patients	43
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
8.1 Conclusão	64
8.2 Perspectivas	64
9. ANEXOS	66
9.1 STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of <i>observational studies</i>	66

1. INTRODUÇÃO

A dor é um dos sintomas mais impactantes da medicina devido a sua alta prevalência e possibilidade de associar-se a desfechos graves. Nas últimas décadas, tanto na área experimental pré-clínica, quanto clínica, viu-se crescer exponencialmente linhas de pesquisa para a melhor compreensão da sua complexa fisiopatologia.

A dor é um processo dinâmico, com inúmeros pontos de ativação e modulação. Indivíduos saudáveis, apresentam um mecanismo de plasticidade neural mal adaptativa complexo, que, quando estimulado agudamente por meio de dano tecidual, promove redução dos limiares aos estímulos periféricos e aumenta a responsividade a área lesionada. Entretanto esse mecanismo adaptativo fisiológico pode estar alterado em portadores de patologias que cursam com dor crônica (1).

A dor crônica é considerada uma doença, apresenta duração superior a 3 meses e não apresenta função biológica conhecida. Ela afeta os pacientes em todas as esferas de suas vidas, implicando em alterações de estilo de vida e de comportamento. Tem etiologia incerta, persiste apesar do tratamento e provoca sofrimento, incapacidade e frequentemente afastamento do trabalho (2). Por essas razões, o estudo e o aprofundamento no conhecimento de sua fisiopatologia se torna fundamental.

Independentemente de sua etiologia, a dor crônica está fortemente ligada ao processo de plasticidade neuronal adaptativa associada a Síndrome de Sensibilização Central (SSC). Entende-se que a SSC é uma manifestação da plasticidade do sistema nervoso somatossensorial em resposta a uma atividade inflamatória ou lesão neuronal. Inclui sintomas como transtornos psicológicos; alterações do sono, fadiga, dor, alodinia (sensação dolorosa para um estímulo não nocivo, por exemplo, toque e massagem), e hiperalgesia (sensibilidade excessiva ao estímulo normalmente doloroso, por exemplo, pressão) (3,4).

A SSC abrange tanto doenças com persistente nocicepção somática, como osteoartrite, hálux valgo e endometriose, e síndromes com ausência de patologia estrutural como cefaleia crônica tensional, fibromialgia e síndrome de dor miofascial. Todas essas doenças cursam com alterações de plasticidade do sistema nociceptivo (5, 6).

Identificar os pacientes portadores de dor crônica com SSC é importante para o direcionamento do tratamento e para engajamento dos pacientes e de suas famílias nas estratégias de controle da doença. Alguns exames podem auxiliar no diagnóstico das doenças que cursam com sensibilização central como a ressonância magnética funcional e o potencial evocado cerebral registrado por eletroencefalografia (7). Entretanto, esses exames são restritos a ambientes de pesquisa atualmente.

Devido a necessidade de mapear mais precocemente esse grupo de pacientes surge a possibilidade de se estudar marcadores associados a fisiologia da SSC. Dois neuromoduladores, o BDNF e a proteína S100B estão associados a vias específicas da atividade nociceptiva e parecem apresentar comportamentos distintos quando analisados no contexto da presença ou ausência de lesão estrutural no processo patológico (7).

O BDNF é uma neurotrofina amplamente distribuída no sistema nervoso, cuja função é fortalecer as vias glutamatérgicas e inibir as vias gabaérgicas. Já a proteína S100B tem a função de causar upregulation de receptores de interleucina-1 β e do TNF- α na microglia e nos astrócitos envolvidos na cascata inflamatória (5).

Visando identificar marcadores séricos específicos relacionadas a fisiopatologia da dor, o presente estudo objetivou comparar os níveis de BDNF e S100B em pacientes portadores de dor crônica e sensibilização central em diferentes doenças, que cursam com presença ou ausência de lesão estrutural.

A estrutura de apresentação dessa dissertação segue as normas apresentadas pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O artigo resultante dessa dissertação está apresentado de acordo com as normas do periódico de submissão- *Neuroscience Letter* (Elsevier) – fator de Impacto 2,18.

2. REVISÃO SISTEMATIZADA DA LITERATURA

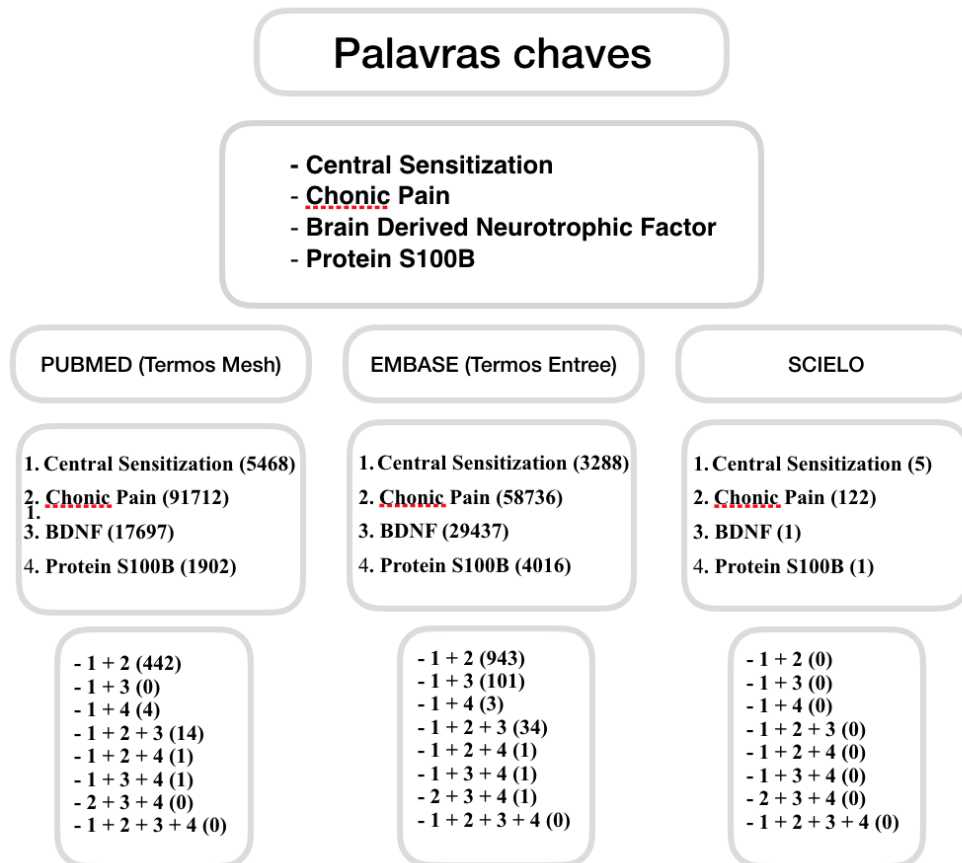
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Nesta revisão da literatura, pretende-se abordar alguns aspectos sobre a relação entre Sensibilização Central, Dor Crônica, BDNF e S100B. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (site PubMed), EMBASE, SCIELO, Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações, Portal Domínio Público.

As referências bibliográficas citadas nos artigos identificados foram revisadas para localizar outras não contempladas na busca. Também foram utilizados bases teóricas de livros-texto. No site PubMed, EMBASE e SCIELO foram realizadas buscas utilizando os termos *Central Sensitization*, *Chronic Pain*, *BDNF* e *S100B*. Em relação ao termo *Central Sensitization* foram encontrados 5468 artigos no PUBMED, 3288 no EMBASE e 5 no SCIELO. Usando o termo *Chronic pain* encontrou-se 91712 artigos no PUBMED, 58736 no EMBASE e 122 no SCIELO; em relação a *BDNF* foram encontrados 17697 no PUBMED, 29437 no EMBASE e 1 no SCIELO e o termo *S100B* encontrou no PUBMED 1902 artigos, no EMBASE 4016 artigos e no SCIELO 1 artigo.

Refinando-se a busca, com o cruzamento das palavras-chave *Central Sensitization e Chonic Pain*, foram encontrados 442 artigos no PUBMED, 943 no EMBASE e nenhum no SCIELO. Do cruzamento dos termos *Central Sensitization e BDNF* tivemos nenhum artigo no PUBMED e no SCIELO e 101 artigos encontrado no EMBASE. Combinando os termos *Central Sensitization e S100B* foram encontrados 4 artigos no PUBMED e 3 artigos no EMBASE e nenhum no SCIELO. Quando combinados os termos *Central Sensitization, BDNF e S100B* foram encontrados 1 artigo no PUBMED, 1 artigo no EMBASE e nenhum artigo no SCIELO e combinados todos os termos não foram encontrados nenhum artigo nas bases de dados pesquisadas. Do banco de teses, foi localizadas uma tese com o cruzamento das palavras Dor Crônica e BDNF e não forma loalizados nenhuma tese com o cruzamento dos temas , *Central Sensitization, Chronic Pain, BDNF e S100B* (Ver figura 1).

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam esta pesquisa.



2.2 Fisiopatologia da dor

A Dor apresenta mecanismos complexos de controle e modulação, sendo que o entendimento de sua fisiopatologia está em constante evolução. Melzack e Wall (8), com a teoria do portão, propiciaram a contribuição mais revolucionária no conhecimento dos mecanismos nociceptivos. A descrição da existência de mecanismos de modulação propiciou um olhar diferente a cerca da capacidade adaptativa neuronal. A teoria do portão propôs que a medula espinhal, antes vista como um elemento de transmissão passiva, poderia ser alvo de intensa modulação dinâmica do processo nociceptivo. Além disso, essa mesma teoria propôs o envolvimento do cérebro como um sistema ativo que seleciona e modula o processo de aferência nociceptiva (8).

O processamento do estímulo nociceptivo é dividido em 4 etapas principais: Transdução, transmissão, modulação e percepção (Fig. 2)

Transdução: evento no qual o estímulo agressor periférico é convertido em potencial de ação pelos nociceptores. O dano tecidual após estímulo cirúrgico leva a ativação de terminações nervosas nociceptivas e de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos, mastócitos, plaquetas) na periferia. A liberação de substância P e glutamato resulta em vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas e acaba por estimular as células inflamatórias a liberarem diversas substâncias que causam dor (9).

Transmissão: condução do potencial de ação da periferia até o córtex cerebral. Ocorre através dos neurônios de primeira, segunda e terceira ordem localizados no gânglio da raiz dorsal, no corno dorsal da medula e tálamo respectivamente. As duas maiores classes de nociceptores incluem fibras aferentes:

- Fibras A delta ($A\delta$), mielinizadas, de médio diâmetro, que medeiam a dor bem localizada, de caráter em pontada e em queimação, conhecida como “dor primária”;
- Fibras não mielinizadas C, de diâmetro pequeno, as quais respondem a estímulos variados, são mais lentas e transmitem a dor surda, dolente, de natureza difusa, associada a aspectos afetivos e motivacionais, sendo conhecida como “dor secundária”; (9).

Modulação: consiste na alteração (ampliação ou inibição) da transmissão neural aferente ao longo da via da dor, por influências locais ou superiores. O corno dorsal da medula é o sítio mais comum de modulação da dor, onde diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos são liberados pelos terminais dos aferentes primários (9).

Percepção: é a representação cerebral da dor em suas dimensões sensorial-discriminativa, afetivo-motivacional, cognitivo-avaliativa. Ocorre integração dos estímulos com áreas do córtex somatossensorial e límbico. Em destaque, o córtex somatossensorial primário, córtex somatossensorial secundário, ínsula, córtex cingulado anterior, córtex pré-frontal, tálamo. A relação da percepção com o estímulo é variável, dependendo não apenas do estímulo propriamente dito, mas também das expectativas e crenças prévias, do estado cognitivo e emocional (9).

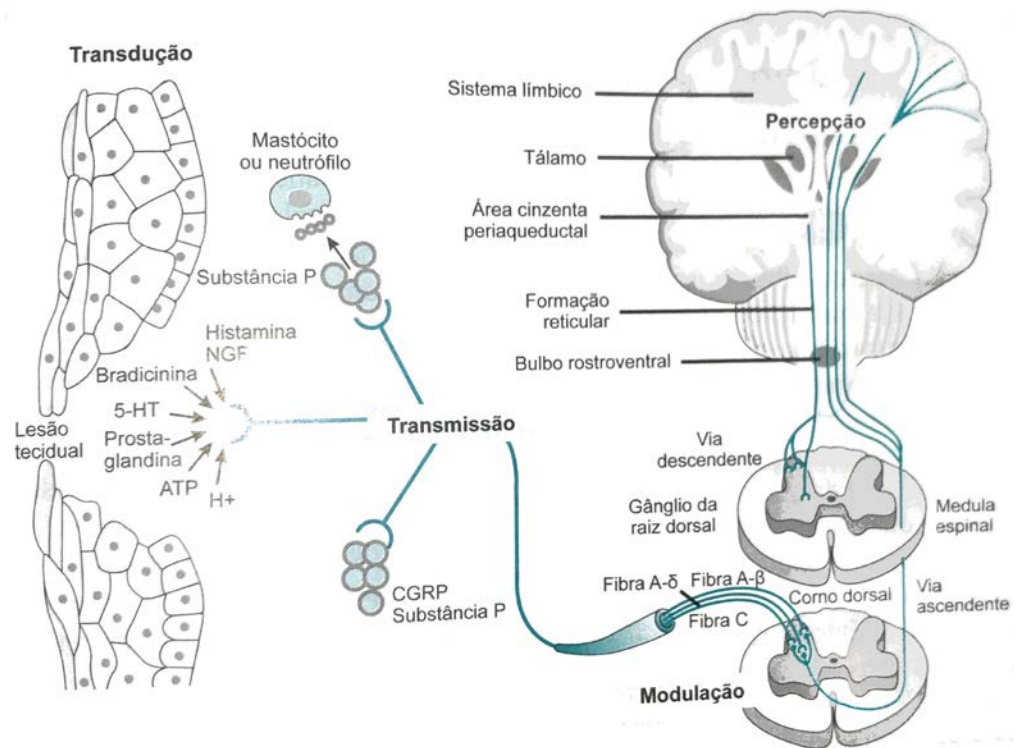


Fig 2. Etapas no Processamento da dor. Fonte: Livro rotinas em anestesiologia e medicina perioperatória (9).

A experiência de dor, entretanto, pode ocorrer sem aferência nociceptiva primária, podendo não haver relação direta entre a dor e o dano tecidual. A dor crônica cursa com essa característica: o dano tecidual não é proporcional a dor e muitas vezes está ausente como na dor de origem central (10).

Alguns estudos identificaram regiões do cérebro ativadas por meio do estímulo nociceptivo agudo. O córtex somatossensorial primário e secundário, córtex pré-frontal, tálamo e cíngulo anterior estão sendo constantemente ativados pelo processo nociceptivo agudo. Essas regiões também têm importante papel na modulação da experiência nociceptiva e estão envolvidas com outras experiências fisiológicas, como motivação, cognição e emoção (11).

Envolvido no processo de modulação neuronal encontra-se o fenômeno da SSC. Esse mecanismo modulatório pode ser encontrado em diversas patologias que cursam com dor crônica.

2.2.1 Síndrome de Sensibilização Central

A Síndrome de Sensibilização Central (SSC) compreende a ativação disfuncional do sistema nervoso central (SNC) que acompanha síndromes dolorosas crônicas de diferentes etiologias. Encontram-se comumente nessa síndrome transtornos psicológicos, alterações de sono, fadiga, dor, alodínia, hiperalgesia, aumento da área de sensibilidade, hipersensibilidade ao ruído e à substâncias químicas (6).

A primeira evidência de um componente central relacionado a uma síndrome dolorosa crônica foi fornecida em 1983 (12), quando Yunus demonstrou associação da fibromialgia com cefaleia crônica tensional, síndrome do intestino irritável e dismenorreia primária (13). Esse primeiro conceito proposto de sobreposição de síndromes foi mostrado em um diagrama de Venn (Figura 3) em 1984(14).

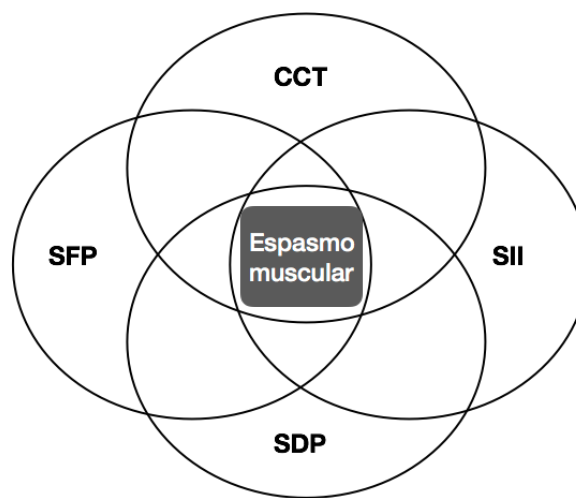


Figura 2: Diagrama de Venn CCT: Cefaléia Tensional, SFP: Síndrome Fibromialgia Primária, SDP: Síndrome Dismenorreia Primária, SII: Síndrome Intestino Irritável. Fonte: Síndrome Fibromialgia Primária, Yunus (14)

Atualmente existem diversas teorias que tentam explicar o desenvolvimento do processo de Sensibilização Central. Diversos mecanismos estão envolvidos como: alterações em vias ascendentes e descendentes do Sistema Nervoso Central (SNC) resultantes de impulsos dolorosos

sustentados, liberação crônica de citocinas pró-inflamatórias e alterações no sistema imune e hormonais - incluindo alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (15).

A Sensibilização Central (SC) representa uma amplificação nas funções dos neurônios e circuitos da via nociceptiva causada pelo aumento da excitabilidade e da eficácia sináptica, assim como pela redução da inibição (16). É uma manifestação da plasticidade do sistema nervoso somatossensorial em resposta a atividade inflamatória e lesão neuronal (17), estando associada ao aumento da atividade espontânea dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, ao incremento da resposta aos estímulos nociceptivos e não nociceptivos e ao alargamento do campo receptivo (18).

Na SSC ocorre um estado de facilitação e potenciação do processo nociceptivo com aumento ou amplificação da resposta. Nesse cenário, a dor não está linearmente relacionada ao estímulo nociceptivo agudo, à presença, à intensidade ou à duração do estímulo nódico. Ao contrário, a SSC produz um estado de hipersensibilidade, amplificando a resposta sensitiva provocada por estímulos dolorosos de pequena monta e até mesmo por estímulos não dolorosos (17).

Uma das características de plasticidade mais importantes que ocorre na SSC é o recrutamento de fibras que normalmente não conduzem estímulos nociceptivos, como as grandes fibras mecanorreceptoras de baixo limiar (fibras A β) para a condução de estímulos álgicos. Também produz hipersensibilidade à dor em tecidos não inflamados pela alteração na resposta sensitiva provocada por impulsos normais e aumento da sensibilidade à dor muito tempo depois da causa inicial ter desaparecido e quando não há evidência de patologia periférica (16).

Além das etiologias acima descritas, a sensibilização central é consequência de um fenômeno conhecido como *Wind Up* (19), ou seja uma potenciação das sinapses no corno dorsal da medula espinhal em resposta a estímulos repetitivos vindos da periferia (20).

2.3 SSC e patologias com Lesão Estrutural Ausente e Presente

Diversas doenças cursam com síndrome de sensibilização central. Em 2008, Yunus (4) propôs o conceito de doenças com patologia estrutural versus doenças com ausência de patologia estrutural para explicar as diferenças na fisiopatologia associada a dor crônica. Algumas doenças como fibromialgia, a cefaleia tensional e a Síndrome Miofascial, apresentam poucas evidências

de alteração estrutural. Em contraste, outras condições como osteoartrite e endometriose cursam com patologia estrutural anatômica (que leva a estímulo nociceptivo somático e/ou visceral persistente) e, na maioria das vezes cursam com hiperalgesia fora das áreas sensibilizadas. Na osteoartrite, por exemplo, os baixos limiares de dor nas articulações afetadas refletem sensibilização local devido a inflamação, enquanto que baixos limiares de dor em locais distantes da articulação afetada suportam a hipótese de sensibilização central (6).

A seguir será apresentado uma breve revisão dos mecanismos fisiopatológicos específicos relacionados a dor crônica presente em diferentes doenças.

2.3.1 Cefaleia Crônica Tensional

Cefaleia tensional é o tipo de cefaléia mais comum (21), e com o maior impacto socioeconômico (22). De acordo com o atual modelo de fisiopatologia da cefaleia crônica tensional, a dor muscular pericraniana reflete a sensibilização de nociceptores periféricos, de neurônios de segunda ordem e /ou disfunção dos sistemas modulatórios supra-espinhais.

A aferência nociceptiva de fibras A-delta e C é aumentada por razões desconhecidas e resulta em mudanças plásticas no corno dorsal /núcleo trigeminal da coluna vertebral. Como consequência, o efeito normalmente inibitório das fibras A-beta de baixo limiar na transmissão da dor no corno dorsal da medula é alterado para um efeito oposto e a resposta nociceptiva de fibras A-delta e C é potencializada. O aumento da estimulação nociceptiva das estruturas supraespinhais pode resultar em maior facilitação e diminuição da inibição da transmissão da dor ao nível do corno dorsal/núcleo trigeminal da medula e conseqüentemente aumento da atividade dos músculos pericranianos (23).

O aumento da aferência nociceptiva para estruturas supraespinhais pode, por sua vez, resultar em sensibilização supraespinhal. As alterações neuroplásticas centrais podem afetar a regulação de mecanismos periféricos e, portanto, levar a aumento da atividade da musculatura pericraniana ou liberação de neurotransmissores nos tecidos miofasciais. Assim, a sensibilização central pode ser mantida mesmo após os fatores de indução iniciais terem sido normalizados, resultando na conversão de cefaleias episódicas em cefaleias tensionais crônicas (23).

Os tecidos miofasciais têm sido amplamente estudados e demonstrou-se que o aumento da sensibilidade à palpação de tecidos miofasciais pericranianos é a anormalidade mais aparente em pacientes com cefaleia tipo tensão crônica (24, 25).

2.3.2 Fibromialgia

Fibromialgia é uma condição de dor crônica e generalizada com pontos sensíveis característicos ao exame físico, e acompanhada por vários sintomas como fadiga, alterações do sono, cefaleia, intestino irritável e transtornos do humor (7).

O modelo fisiopatológico mais aceito é a existência de um desequilíbrio entre os mecanismos de pró-nocicepção e antinocicepção (27) figura 4. Segundo esse modelo, há uma deficiência na ação das vias inibitórias relacionadas à dor (28, 29) e/ou hiperalgesia secundária, a qual depende de mecanismos de sensibilização central (30, 31).

Uma das hipóteses encontradas para explicar a alteração do sistema inibitório descendente seria uma desregulação no metabolismo da serotonina, a qual participa do sistema inibitório descendente da dor, com uma consequente elevação da resposta dolorosa ou mesmo dor espontânea (31).

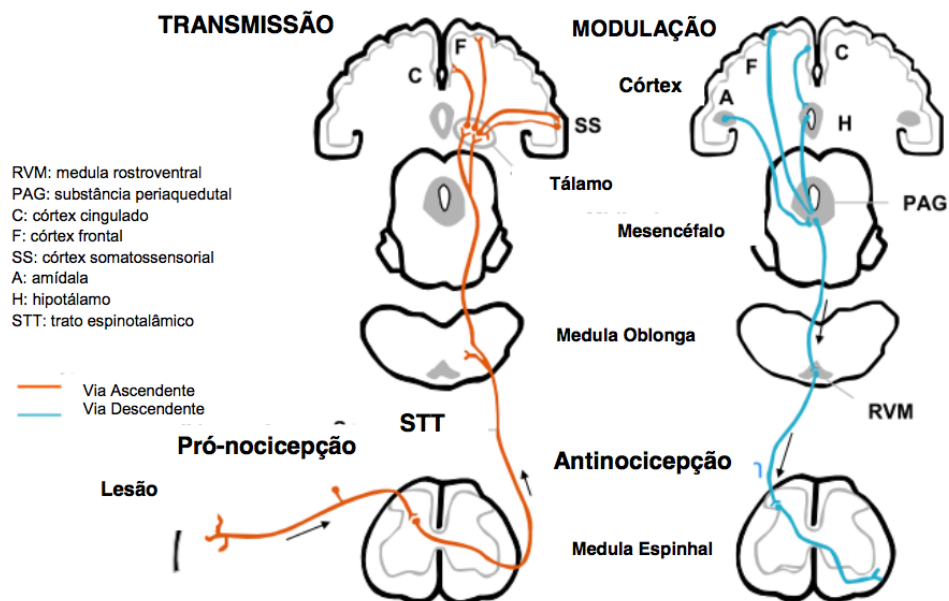


Figura 3: Representação do mecanismo pró-nocicepção e antinocicepção. *Fonte: Adaptado de Hoffman GA, Harrington A. e Fields HL (32)*

2.3.3 Osteoartrite

A dor devido à osteoartrite (OA) é uma das causas mais prevalentes de dor crônica (33). O entendimento da OA é importante devido ao aumento do envelhecimento populacional. Os joelhos, quadris e mãos são as articulações mais comumente afetadas na OA (34).

A combinação de diferentes mecanismos que perpetuam a dor como sensibilização central, redução da ação do sistema inibitório descendente e alterações corticais ocorre nos pacientes com osteoartrite. Vários marcadores inflamatórios participam desse processo fisiopatológico. Alguns estudos mostram que a neutralização da interleucina-1b e TNF- α pode reduzir a dor da AO (34).

No decorrer do processo inflamatório das articulações, as vias nociceptivas da coluna vertebral desenvolvem um estado de hiperexcitabilidade como consequência da estimulação mecânica repetitiva da articulação e redução do limiar de excitação de neurônios de alto limiar da medula espinhal (35). Além disso, os neurônios começam a mostrar respostas aumentadas aos estímulos aplicados em regiões adjacentes e distantes da articulação, sendo que o campo receptivo total sofre um alargamento (36).

Em estados avançados de OA, os pacientes apresentam sinais de sensibilização central, demonstrada por dor generalizada além da articulação acometida (37) e baixos limiares de dor à pressão na articulação e em estruturas cutâneas e subcutâneas de regiões adjacentes. (38, 39, 40).

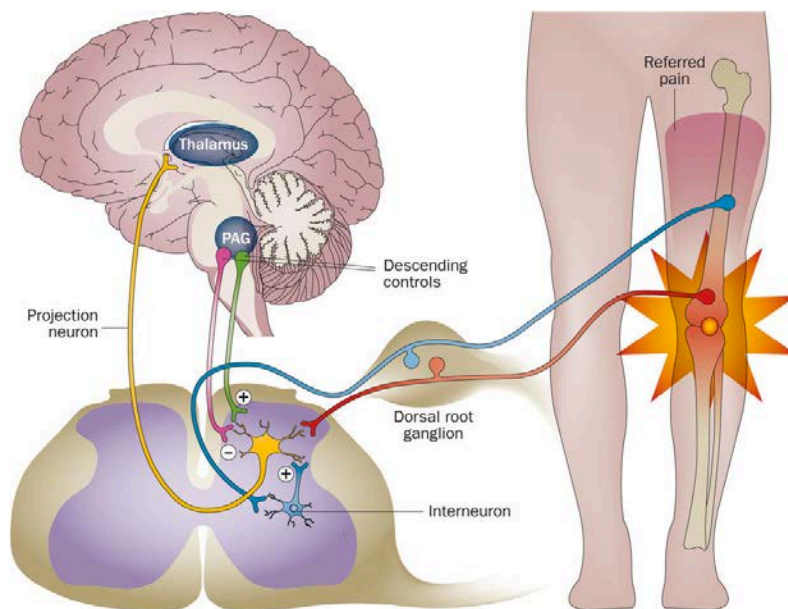


Figura 4: Mecanismos da dor na osteoartrite..

Fonte: Thakur M, Dickenson AH, Baron R (41).

2.3.4 Endometriose

Endometriose é uma doença em que as lesões endometriais são inflamatórias e hormonais dependentes, bem como apresentam efeitos endócrinos, vasculares, musculoesqueléticos e neuronais (42). A dor pélvica crônica é um sintoma frustrante para as pacientes com endometriose e frequentemente é refratária ao manejo hormonal e cirúrgico.

Poucas hipóteses abordam a questão de como as lesões ectópicas do endométrio ativam o sistema nervoso. Um mecanismo provável envolve a inervação de lesões por meio de germinação neuronal de fibras sensoriais e simpáticas que inervam vasos sanguíneos próximos as lesões (43).

Os nociceptores respondem a estímulos nocivos na periferia e são especialmente sensíveis a fatores imunes e inflamatórios que são prevalentes na endometriose (42). O líquido peritoneal de mulheres com endometriose contém níveis elevados de TNF- α , interleucina (IL) -1, IL-6, IL-8, IL-10 , proteína quimiotática de monócitos-1 e prostaglandinas E2 e F, todos os quais sensibilizam ou ativam diretamente os nociceptores ou desencadeiam a liberação de substâncias ativadoras das células adjacentes (44).

A ativação repetida ou prolongada de nociceptores resulta na redução do seu limiar de ativação, um estado conhecido como sensibilização periférica(45). Uma vez ativados, os próprios nociceptores liberam citocinas que induzem vasodilatação, aumentam a permeabilidade vascular local e recrutam e ativam células imunes, causando inflamação neurogênica (46).

A ativação contínua do nociceptor gera um bombardeamento aferente de informações nociceptivas no corno dorsal da medula espinhal (47). Esse processo, por sua vez, induz mudanças estruturais e funcionais em toda a medula espinhal, o que em última instância, leva a sensibilização central e evoca respostas exageradas para os estímulos periféricos (Fig. 5) (17). A sensibilização central manifesta-se clinicamente como alodínia (dor para um estímulo não-nocivo), hiperalgesia (aumento da dor para um estímulo nocivo) e dor referida (dor percebida fora da área de estimulação nociva) (42).

Embora as terapias tradicionais atinjam as lesões ectópicas ao endométrio, não há um tratamento dirigido para a sensibilização central.

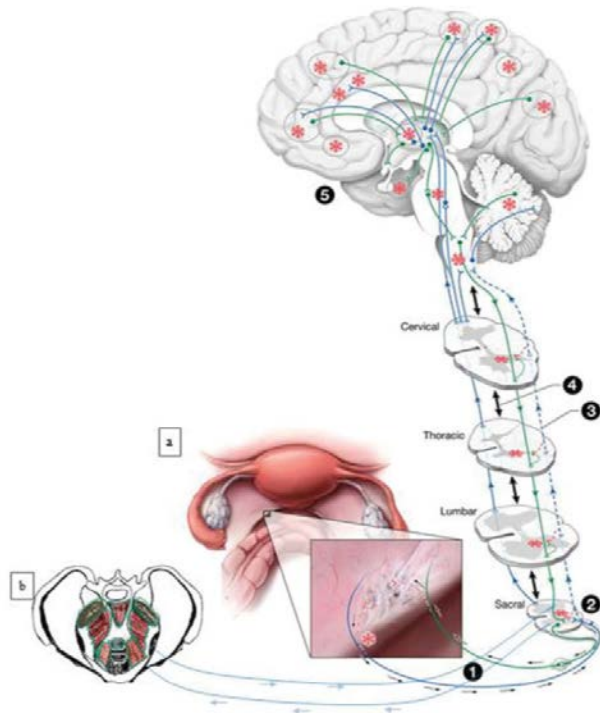


Figura 5: Modelo fisiopatológico de dor na endometriose (1) Visão laparoscópica de lesão infiltrada no ligamento Uterossacro. As fibras sensoriais (azul) e as simpáticas (verde) brotam de ramos axônicos em direção a lesão. (2) Sensibilização Central (asterisco vermelho), é modulada de diferentes formas e pode tornar-se independente dos sinais periféricos. (3) Propagação da sensibilização para segmentos distantes da medula (linhas tracejadas vermelhas). (4) Nocicepção aumentada se propaga para segmentos medulares distantes. (5) Vias aferentes (azuis) e eferentes (verdes) com conexões terminais no cérebro.

Fonte: Modificado de Stratton et al (48).

2.4 Marcadores de Sensibilização Central

Quando induzido por um estímulo nociceptivo intenso, a Sensibilização Central pode ser iniciada e sustentada por múltiplos neurotransmissores e citocinas inflamatórias, incluindo $TNF\alpha$, BDNF, IL-1B e IL-6 e S100B (4).

Testes de dor psicofísica têm sido correlacionados com níveis de *Brain Derived Neurotrophic Factor* BDNF e S100B em pacientes com fibromialgia, favorecendo a possibilidade do uso de marcadores séricos para ampliar o entendimento clínico do balanço entre a excitação e inibição na regulação da dor, que parece ser o terreno comum para neuroplasticidade na dor crônica e Síndrome de Sensibilização Central (49).

2.4.1 Brain Derived Neurotrophic Factor - BDNF

BDNF é um membro da família das neurotrofinas, é essencial para a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento, é amplamente expresso em todo SNC e contribui para a plasticidade sináptica. O efeito do BDNF é mediado por meio de sua ligação ao receptor B da Tirosina Kinase e subsequente ativação de vias descendentes. A ligação BDNF-TrkB tem demonstrado desempenhar um papel crítico na plasticidade sináptica subjacente ao aprendizado e à memória (49). Quando se liga ao seu receptor TrkB de alta afinidade, BDNF aumenta as respostas evocadas nas fibras C mediadas pelos receptores NMDA e causa ativação de numerosas vias do trato espinotalâmico (16).

Vias descendentes do tronco encefálico ligando a substância cinzenta periaquedutal, à medula ventromedial rostral e à medula espinhal constituem o principal mecanismo de modulação da transmissão da dor (50).

Estudos demonstram altos níveis de RNAm de BDNF e proteínas na substância cinzenta periaquedutal, grandes quantidades de TrkB RNAm em neurônios da medula ventromedial rostral e projeções para o corno posterior espinhal. Em nível espinhal, BDNF é distribuído nos neurônios sensoriais primários no gânglio da raiz dorsal e está envolvido na sensibilização central no corno dorsal da medula. Estudos *in vitro* demonstraram que o BDNF induz a fosforilação da subunidade NR2A do receptor NMDA por meio de transdução de um sinal em cascata que envolve IP₃, PKC e tirosina kinase Src. A sinalização de BDNF-TrkB no circuito supraespinhal representa um mecanismo subjacente, previamente desconhecido, no desenvolvimento e manutenção de plasticidade e dor persistente (50, 51).

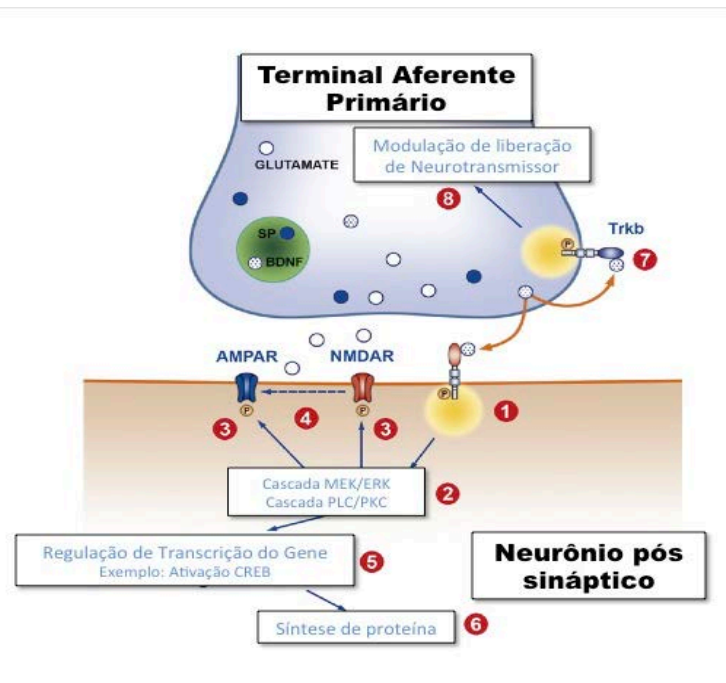


Figura 6. Modelo de potencialização da via glutamatérgica. 1- BDNF na membrana pós-sináptica, ativa receptores TrkB e 2- desencadeia cascatas de sinalização intracelular 3- Segundos mensageiros destas vias fosforilam os receptores NMDA e AMPA modulando sua atividade. 4 - Receptores NMDA podem estar envolvidos na potencialização do receptor AMPA induzida pelo BDNF. 5 e 6 - Segundos mensageiros também regulam a síntese proteica. 7 e 8 - A ativação trkB pelo BDNF no nível pré-sináptico leva à modulação da liberação do neurotransmissor.

Fonte: Figura modificada de Merigui et al (51).

O aumento de BDNF inverte a polaridade das correntes de GABA em neurónios do corno dorsal (52). Deste modo, o sistema GABAérgico perde a capacidade de regulação negativa da expressão do transportador de Cl⁻ + cotransportador K⁺ -Cl⁻exportador (KCC2) no corno dorsal (53, 54). Assim, o acúmulo intracelular de Cl⁻ limita o efeito inibitório GABAérgico nestes nociceptores, promovendo assim a desinibição (11, 55) o que resulta numa resposta persistente e amplificada às aferências nociceptivas (55, 56).

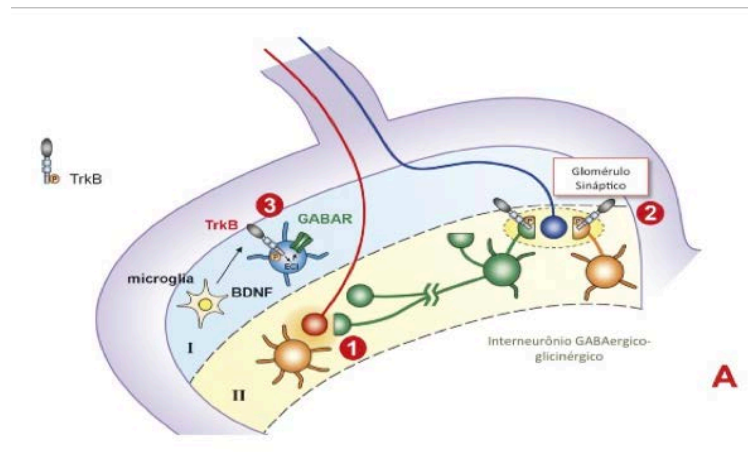


Figura 7 - Modelo de modulação gabaérgica mediado pelo BDNF no corno dorsal da medula.

1 e 2 - Receptores trkB no terminal gabaérgico de interneurônios inibitórios (verde) suportam a sua ação moduladora pré-sináptica em terminais não peptidérgicos (azuis) e peptidérgicos (vermelho). **3** - Ativação da micróglia na dor patológica induz à liberação de BDNF que converte a ação do GABA, nos neurônios da lâmina I, de inibitória para excitatória.

Fonte: Figura modificada de Merigui et al (51)

O grupo de pesquisa ao qual pertence essa pesquisa tem estudado o BDNF e sua relação com dor crônica e aguda. Caumo et al (5) demonstraram que síndromes de dor crônica apresentam parâmetros de excitabilidade cortical diferentes. Quando avaliado pela inibição intracortical curta (SICI), síndromes com ausência de lesão estrutural tiveram o SICI 56% menor do que comparado a pacientes portadores de dor crônica com lesão estrutural persistente, sendo que os níveis de BDNF foram inversamente correlacionados à SICI. Esses dados sugerem maior desinibição no córtex motor e do sistema inibitório de dor descendente em pacientes com ausência de lesão estrutural quando comparados a pacientes com lesão estrutural presente ou com indivíduos saudáveis (5).

Embora a relação entre níveis de BDNF e dor seja um fenômeno complexo e os mecanismos subjacentes continuem mal compreendidos, os níveis de BDNF podem ser úteis para distinguir diferentes patologias que cursam com dor crônica (6).

2.4.2 S100B

No SNC, a proteína S100B é encontrada nos astrócitos e em outros tipos de células gliais, como oligodendrócitos, células de Schwann, células ependimárias, células gliais entéricas e em outras subpopulações de neurônios. Em tecidos não-neurais, esta proteína é amplamente distribuída em tipos celulares como melanócitos, células de Langerhans, condrócitos, células dendríticas em órgãos linfóides, medula adrenal, células de Leydig e células musculares esqueléticas (56).

As células da glia, como parte da fisiopatologia da dor crônica e da sensibilização central destacam-se pela liberação de substâncias pró-inflamatórias (57), tais como a citocinas (TNF- α e IL 1B), neurotrofinas e S100B. (59, 60)

Muitas hipóteses têm sido formuladas a respeito do papel biológico da proteína S100B exerce nas células nas quais está contida, porém sua função intracelular não foi completamente elucidada. A proteína interage com citoesqueleto e parece desempenhar papel significativo na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, além de participar na regulação da homeostasia celular do cálcio e regular a atividade de algumas enzimas. Funcionando como uma proteína ligadora de cálcio, a S100B intervém numa variedade de atividades intracelulares interagindo com diferentes proteínas após a sua modificação conformacional dependente de cálcio (57).

Originalmente, acreditava-se que a detecção de S100B em fluídos biológicos era consequência de seu extravasamento de células lesionadas. Entretanto, a proteína S100B é ativamente secretada por astrócitos, possivelmente realizando alguma função extracelular (61).

Evidências crescentes sugerem que a S100B secretada atua de forma autócrina, parácrina ou mesmo endócrina, com efeitos dependentes da concentração. Possui função trófica em concentrações que se acredita serem fisiológicas, nanomolares, porém são tóxicas em concentrações mais altas (micromolares). Em particular, foram relatadas concentrações baixas (nanomolares) de S100B capazes de promover a extensão de neurites, a sobrevivência dos neurônios e participar na regulação do desenvolvimento e regeneração muscular. A proteína

S100B extracelular desencadeia a sinalização celular por meio da interação com o receptor RAGE (*Receptor Advanced Glycation End Product*), que parece não ser um receptor exclusivo de S100B. Portanto, concentrações elevadas de S100B parecem participar na cascata de eventos que conduzem à lesão celular, enquanto que a sua secreção em baixas concentrações têm efeito trófico(57).

Em concentrações mais elevadas a proteína S100B exacerba o processo de neuroinflamação e disfunção neuronal, agindo em conjunto com citocinas pró-inflamatórias (62, 63), aumentando a expressão de IL-1B e do TNF- α , os quais estão envolvidos na progressão e manutenção do processo de sensibilização central (64, 65).

3. MARCO TEÓRICO

Observa-se que os mecanismos fisiopatogênicos da dor crônica e sua integração com o sistema neuroimunoendócrino ainda são pouco compreendidos. A síndrome da sensibilização central está presente em diferentes doenças que cursam com sintomas comuns como stress psicológico, distúrbios de sono, fadiga, dor e alodinia. Entretanto as doenças que evoluem com sensibilização central secundária a dor crônica apresentam diferentes espectros, os quais podem ser divididos em condições com lesão estrutural presente como endometriose e osteoartrite ou condições sem lesão persistente como cefaleia tensional e fibromialgia.

O presente estudo busca identificar marcadores específicos associados a diferentes fisiopatologias presentes nas condições de dor crônica. A medida que muitas das doenças que cursam com dor crônica são de difícil compreensão pelos pacientes, familiares e cuidadores, a identificação de marcadores diagnósticos e de possível prognóstico pode impactar em melhoria global no atendimento a essas enfermidades.

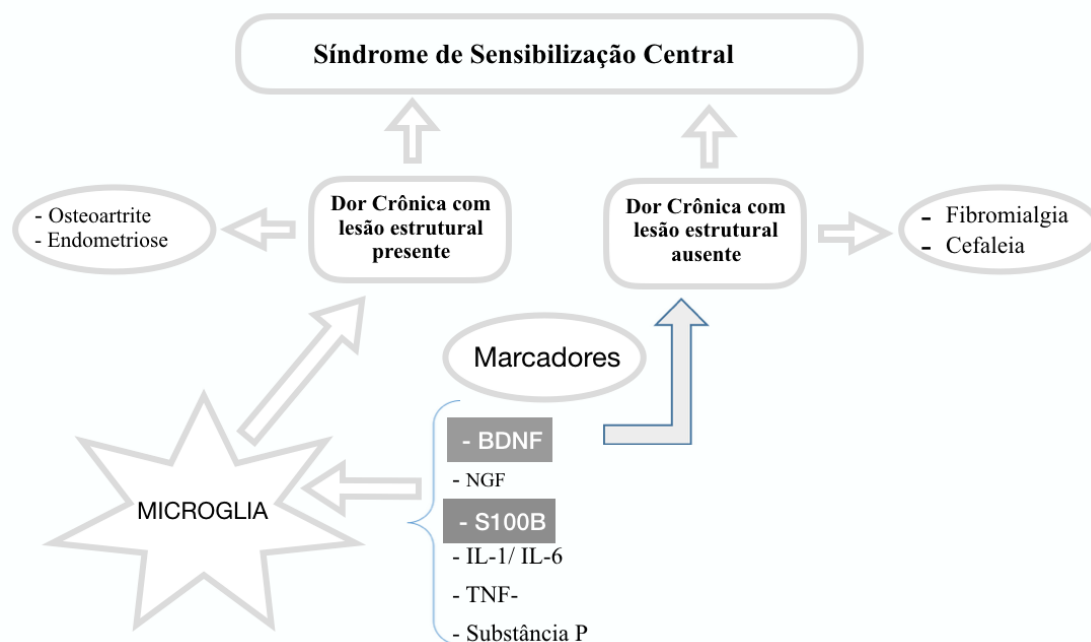


Figura 8: Marco Teórico

4. JUSTIFICATIVA

A dor é um dos sintomas de maior importância na medicina e a busca constante do entendimento de sua fisiopatologia deve ser incentivado. Diferentes patologias podem cursar com dor crônica e apresentam mecanismos de desenvolvimento, perpetuação e amplificação da dor diferentes. Síndrome de Sensibilização Central está presente como parte da fisiopatologia da dor em portadores de dor crônica com lesão estrutural ausente, bem como com lesão estrutural presente. Marcadores de atividades do SNC estão alterados em concentrações séricas diferentes de acordo com a patologia de base e isso sugere que processos diferentes de modulação neuronal levam a sintomas semelhantes de amplificação da dor por meio da SSC.

O melhor entendimento dos mecanismos de sensibilização central em grupos de patologias semelhantes, com a presença ou ausência de lesão estrutural, podem contribuir para elucidar mecanismos subjacentes de patologias que envolvam a dor crônica, além de abrir precedentes para elaboração de novos tratamentos que envolvam aspectos neuromodulatórios.

Na busca de respostas, este estudo realizado deu origem um artigo que constitui essa dissertação, intitulado de:

- Biomarkers BDNF and Serum S100B levels according the spectrum of structural pathology in chronic pain patients.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Descrever o perfil de marcadores periféricos de dor em pacientes portadores de dor crônica com Síndrome de Sensibilização Central, com e sem lesão estrutural.

5.2 Objetivos Específicos

- Verificar a associação entre a proteína S100B em pacientes portadores de Dor Crônica com Sensibilização Central com e sem Lesão Estrutural
- Verificar a associação entre a neurotrofina BDNF em pacientes portadores de Dor Crônica com Sensibilização Central com e sem Lesão Estrutural
- Verificar a associação entre a proteína S100B e a Neurotrofina BDNF em controles saudáveis e portadores de dor crônica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Stefani, Luciana Paula Cadore. BDNF E Efeito Dose-Resposta da melatonina no limiar de dor em indivíduos saudáveis. Porto Alegre. Tese [Doutorado em Ciências Médicas] – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
2. Cangiani LM, Slullitel A, Potério GMB, Pires OC, Posso IP, Nogueira CS, Ferez D, Callegari DC. Tratado de Anestesiologia . 7a Ed. São Paulo: Atheneu; 2011.
3. 30. Staud R, Rodriguez ME. Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2006;2(2):90-8.
4. Yunus, MB. Central Sensitivity Syndromes: A New Paradigm and Group Nosology for Fibromyalgia and Overlapping Conditions, and the Related Issue of Disease versus Illness. *Pain*. 2008 (37): 339- 352
5. Caumo W, Deitos A, Carvalho S, Leite J, Carvalho F, Dussán-Sarria JA, Lopes Tarragó MdaG, Souza A, Torres IL, Fregni F. Motor Cortex Excitability and BDNF Levels in Chronic Musculoskeletal Pain According to Structural Pathology. *Front. Hum. Neurosci*. 2016. 10(357): 1-15.
6. Deitos A, Dussán-Sarria JA, de Souza A, Medeiros L, da Graça Tarragô M, Sehn F, Chassot M, Zanette S, Schwertner A, Fregni F, Torres I L S, Caumo W L. Clinical Value of Serum Neuroplasticity Mediators in Identifying the Central Sensitivity Syndrome in Patients With Chronic Pain With and Without Structural Pathology. *Clin J Pain*. 2015 Nov; 31(11): 959-67.
7. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965 Nov 19; 150(3699): 971-9.
8. Gamermann PW, Stefani LC, Felix EA. Rotinas em Anestesiologia e Medicina Perioperatória. Porto Alegre: Artmed; 2016, 38: 452-463
9. Derbyshire SW, Whalley MG, Stenger VA, Oakley DA. Cerebral activation during hypnotically induced and imagined pain. *Neuroimage*. 2004; 23(1): 392-401.
10. Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*. 2007; 55(3): 377-91.
11. Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 1983; 306:686–688.
12. Yunus MB, Masi AT, Calabro JJ, Miller KA, Feigenbaum SL. Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched normal controls. *Semin Arthritis Rheum* 1981;11: 151-71.

13. Yunus MB. Primary fibromyalgia syndrome: current concepts. *Compr Ther* 1984;10:21-8.
14. Mayer T G; Neblett R, Cohen H, Howard K J, Choi Y H, Williams M J, Perez Y, Gatchel R J. The Development and Psychometric Validation of the Central Sensitization Inventory. *Pain Practice*. 2012; 12 (4): 276–285.
15. Staud R. Evidence of involvement of central neural mechanisms in generating fibromyalgia pain. *Current rheumatology reports*. 2002;4(4):299-305.
16. Latremoliere A, Woolf C J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain*. 2009 September ; 10(9): 895–926.
17. Staud R, Robinson ME, Price DD. Temporal summation of second pain and its maintenance are useful for characterizing widespread central sensitization of fibromyalgia patients. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(11):893-901.
18. Price DD, Staud R. Neurobiology of fibromyalgia syndrome. *The Journal of rheumatology Supplement*. 2005;75:22-8.
19. Henriksson KG, Sorensen J. The promise of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in fibromyalgia. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2002;28(2):343-5
20. Rasmussen BK, Jensen R, Schroll M, Olesen J. Epidemiology of headache in a general population—Da prevalence study. *J Clin Epidemiol* 1991; 44:1147±57.
21. Rasmussen BK, Jensen R, Olesen J. Impact of headache on sickness absence and utilisation of medical services: a Danish population study. *J Epidemiol Community Health* 1992; 46:443±6.
22. Bendtsen L. Central sensitization in tension-type headache—possible pathophysiological mechanisms. *Cephalalgia* 2000; 20:486 -508.
23. Langemark M, Olesen J. Pericranial tenderness in tension headache. A blind, controlled study. *Cephalalgia* 1987; 7:249± 55.
24. Jensen R, Rasmussen BK, Pedersen B, Olesen J. Muscle tenderness and pressure pain thresholds in headache. A population study. *Pain* 1993; 52:193±9.
25. Kellgren JH. Observations on referred pain arising from muscle. *Clin Sci* 1938; 3:175±90.
26. Bazzichi L, Sernissi F, Consensi A, Gia-Comelli C, Sarzi-Puttini P: Fibromyalgia: a critical digest of the recent literature. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29 (Suppl. 69): S1-11.
27. Yunus MB. Fibromyalgia and overlapping disorders: the unifying concept of central sensitivity syndromes. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2007;36(6):339-56

28. Kosek E, Hansson P. Modulatory influence on somatosensory perception from vibration and heterotopic noxious conditioning stimulation (HNCS) in fibromyalgia patients and healthy subjects. *Pain*. 1997;70(1):41-51.
29. Lautenbacher S, Rollman GB. Possible deficiencies of pain modulation in fibromyalgia. *The Clinical journal of pain*. 1997;13(3):189-96.
30. Price DD, Staud R, Robinson ME, Mauderli AP, Cannon R, Vierck CJ. Enhanced temporal summation of second pain and its central modulation in fibromyalgia patients. *Pain*. 2002;99(1-2):49-59.
31. Riberto M, Pato TR. Fisiopatologia da fibromialgia. *Acta fisiatria*. 2004; 11(2): 78-81.
32. Hoffman GA, Harrington A, Fields HL. Pain and the placebo: what we have learned. *Perspectives in biology and medicine*. 2005;48(2):248-65.
33. Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life and treatment. *Eur. J. Pain*. 2006; 10, 287–333.
34. Neogi, T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil*. 21. 2013; 1145–1153.
35. Eitner A, Hofmann GO and Schaible H-G. *Mechanisms of Osteoarthritic Pain. Studies in Humans and Experimental Models. Front. Mol. Neurosci*. 2017; 10: 349 1-22
36. Schaible, H.-G., Richter, F., Ebersberger, A., Boettger, M. K., Vanegas, H., Natura, G., et al. Joint pain. *Exp. Brain Res*. 2009; 196, 153–162.
37. Ordeberg, G. “Evidence of sensitization to pain in human osteoarthritis,” in *Pain in Osteoarthritis*, ed. D. T. Felson and H.-G. Schaible (Hoboken: Wiley Blackwell). 2009; 199–209.
38. Schaible, H.-G. Mechanisms of chronic pain in osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep*. 14. 2012; 549–556. doi: 10.1007/s11926-012 -0279-x
39. Schaible, H.-G. “Joint pain—basic mechanisms,” in *Wall and Melzack’s Textbook of Pain*, 6th Edn. eds S. B. McMahon, M. Koltzenburg, I. Tracey and D. C. Turk (Philadelphia, PA: Elsevier Saunders). 2013; 609–619.
40. Suokas, A. K., Walsh, D. A., McWilliams, D. F., Condon, L., Moreton, B., Wylde, V., et al. Quantitative sensory testing in painful osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil*. 2012; 20, 1075–1085.
41. Thakur M, Dickenson AH, Baron R. Osteoarthritis pain: nociceptive or neuropathic?. *Nature reviews rheumatology*. 2014; (10): 374-380.

42. Aredo JV, Heyrana KJ, Karp BI, Shah JP, Stratton P. Relating Chronic Pelvic Pain and Endometriosis to Signs of Sensitization and Myofascial Pain and Dysfunction. *Semin Reprod Med.* 2017 January ; 35(1): 88–97
43. Burnstock G. Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009; 49:1–30.
44. Beste MT, Pfäffle-Doyle N, Prentice EA, et al. Molecular network analysis of endometriosis reveals a role for c-Jun-regulated macrophage activation. *Sci Transl Med.* 2014; 6(222):222ra16.
45. Willard, F. Basic Mechanisms of Pain. In: Audette, JF., Bailey, A., editors. *Integrative Pain Medicine: The Science and Practice of Complementary and Alternative Medicine in Pain Management.* Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 19-61.
46. Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci.* 2012; 15(8):1063–1067
47. Willard, F. Basic Mechanisms of Pain. In: Audette, JF., Bailey, A., editors. *Integrative Pain Medicine: The Science and Practice of Complementary and Alternative Medicine in Pain Management.* Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 19-61
48. Hsu AL, Sinaii N, Segars J, Nieman LK, Stratton P. Relating pelvic pain location to surgical findings of endometriosis. *Obstet Gynecol.* 2011; 118(2 Pt 1):223–230.
49. Zanette SA, Dussan-Sarria JA, Souza A, Deitos A, Torres IL, Caumo W. Higher serum S100B and BDNF levels are correlated with a lower pressure-pain threshold in fibromyalgia. *Mol Pain.* 2014; 10(46): 1-9. DOI: 10.1186/1744-8069-10-46.
50. Guo W, Robbins MT, Wei F, Zou S, Dubner R, Ren K. Supraspinal Brain-Derived neurotrophic Factor Signaling: A Novel Mechanism for Descending Pain Facilitation. *J Neurosci.* 2006 Jan 4; 26(1): 126-37.
51. Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, et al. BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol.* 2008; 85(3): 297-317.
52. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):1017-21.
53. Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, Saarma M. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K-Cl cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J Cell Biol.* 2002 Dec 9; 159(5): 747–752.
54. Zhang W, Liu LY, Xu TL. Reduced potassium-chloride co- transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience.* 2008 Mar 18;152(2):502-10.

55. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000 Jun 9; 288(5472): 1765-9.
56. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*. 2003 Dec; 26(12): 696-705.
57. Michetti F, Corvino V, Geloso MC, Lattanzi W, Bernardini C, Serpero L, Gazzolo D. The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J Neurochem*. 2012 Mar; 120(5): 644-59.
58. Narita M, Kuzumaki N, Narita M, Kaneko C, Hareyama N, Miyatake M, et al. Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical delta-opioid receptor dysfunction. *Journal of neurochemistry*. 2006;97(5):1369-78.
59. Watkins LR, Hutchinson MR, Ledeboer A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain, behavior, and immunity*. 2007;21(2):131-46
60. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005;438(7070):1017-21
61. Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19; 99(6): 4037-42.
62. Tanga FY, Raghavendra V, Nutile-McMenemy N, Marks A, Deleo JA. Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2006;140(3):1003-10
63. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(51):40096- 105.
64. Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiology of aging*. 2010;31(4):665-77.
65. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Current molecular medicine*. 2013;13(1):24-57

7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

7.1 Biomarkers Serum S100B and BDNF levels vary according to the presence or absence of structural pathology in chronic pain patients

Biomarkers BDNF and Serum S100B levels according to the spectrum of structural pathology in chronic pain patients

Fabricio Moura Leite¹, Maria da Graça Lopes Tarragó², Simone Azevedo Zanette³, Andressa de Souza⁴, Wolnei Caumo⁵, Luciana Cadore Stefani⁶

¹ Anesthesiologist, Post-graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

² Psychiatrist, Laboratory of Pain and Neuromodulation at UFRGS, Porto Alegre, Brazil,

³ Psychiatrist, Adjunt Professor, Department of Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Post-graduate Program in Health and Human Development, La Salle University Center, Canoas, Brazil

⁵ Associate Professor, Department of Surgery, UFRGS School of Medicine; Pain and Palliative Care Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil, Laboratory of Pain and Neuromodulation, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶ Adjunt Professor, Department of Surgery, UFRGS School of Medicine; Anaesthesia and Perioperative Medicine Service, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Luciana Cadore Stefani

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-003 - Porto Alegre, RS – Brazil

lpstefani@hcpa.ufrgs.br

Phone: +55-51-3359-8226

Summary

Central sensitivity syndrome (CSS) consists of adaptive pathophysiological changes mediated by the central nervous system associated with neuroplasticity in some chronic pain disorders. It could be grouped in two main conceptual conditions: one includes those chronic pain patients without overt structural pathology such as fibromyalgia and another subgroup includes conditions with recognizable structural abnormalities, both somatic (osteoarthritis, OA) and visceral (endometriosis). In order to understand the role of neuromodulators in CSS we aim to determine whether BDNF and S100B are associated to specific chronic pain disorders. Serum BDNF and S100B levels were measured in chronic pain women with different diagnosis: 88 with osteoarthritis, 36 with endometriosis, 117 with fibromyalgia, 33 with chronic tension type headache and in 41 health controls. BDNF and S100B levels were adjusted on an MANCOVA model for depression severity, pain levels, age and use of analgesics. Serum BDNF concentration were higher, but not different in patients with fibromyalgia and headache, the CSS group without structural pathology. In contrast, the serum concentrations of S100B were higher in patients with osteoarthritis, endometriosis and fibromyalgia, in comparison to controls and tensional headache patients. This study supports the hypothesis that BDNF and S100B neuromodulators present different serum levels according to the background disease associated to the chronic pain. They have the potential to be studied as markers of active disease or treatment evolution, since their measure requires only blood analysis.

Key words: brain-derived neurotrophic factor, S100B, central sensitization syndrome, osteoarthritis, fibromyalgia, tension headache, endometriosis, chronic pain.

Introduction

Chronic pain represents one of the main causes of incapacity and suffering in adult life. The term sensitivity is a clinical manifestation of sensitization, which is recognized by an amplified response to various nociceptive, nonnociceptive and environmental stimuli. Central sensitivity syndrome (CSS) consists of adaptive pathophysiological changes mediated by the central nervous system associated with neuroplasticity in some chronic pain disorders (1). It depicts an enlargement of the functions of the neurons and circuits of the nociceptive pathway caused by increased excitability and synaptic efficacy, as well as the reduction of inhibition. CSS is a manifestation of somatosensory nervous system plasticity in response to an inflammatory activity or neuronal injury. It includes symptoms as psychological distress, sleeping disorders, fatigue, pain, allodynia (painful sensation to a normally non-painful stimulus, e.g. touch and massage), hyperalgesia (excessive sensitivity to a normally painful stimulus, e.g. pressure), expansion of the receptive field (pain beyond the area of peripheral nerve supply), prolonged electrophysiological discharge, and an after-stimulus unpleasant quality of the pain [e.g. burning, throbbing, tingling or numbness] (2)(1).

It is important to recognize subgroups in chronic pain patients. The CSS could be grouped in two main conceptual conditions: one includes those without overt structural pathology, such as fibromyalgia (FM), myofascial pain syndrome (MPS), and chronic tension type headache (CTT). The other subgroup includes conditions with recognizable structural abnormalities, both somatic (osteoarthritis, OA) and visceral (endometriosis) (3)(4). Identifying the chronic pain patients with CSS helps to design the treatment, agrees to the prognostic and gets the patients and their families be involved in the complex management of the disorder. An early CSS detection may reduce time and resources invested in misleading and stressful tests (e.g., laparoscopy, imaging, nerve conduction studies), enabling efforts to be directed towards safer and more effective interventions (egg, psychotherapy and, physical activity). To delineate the profile of Central sensitization conditions, some objective testing can be done, including functional magnetic resonance imaging and cerebral evoked potential recorded by electroencephalography (5). Also, the physiology of CSS involves activation of several neurotransmitters and neuromodulators acting along pain pathways, which could be used in a more accessible manner (blood sampling) to help the CSS identification (5).

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is a remarkable marker and modulator of neuronal activity and NMDA receptor dependent neuronal plasticity in both ascending and descending pain transmission pathways (6). In animals, when neutralizing BDNF by anti-BDNF antibody, or TrkB receptor, mechanical allodynia (7) and thermal hyperalgesia were relieved (8). In humans, our group has demonstrated higher levels of BDNF in patients with fibromyalgia, headache, and myofascial pain (3). Furthermore, serum BDNF levels were significantly correlated with decreased inhibitory system as assessed by Conditioned pain modulation (9) and with the reduction of pressure pain thresholds in fibromyalgia (10).

The S100B is a Ca^2 binding protein associated to the upregulation of other mediators expression such as Interleukin 1-beta and Tumor Necrosis Factor and to the activation of the Nuclear Factor Kappa-Light-chain-enhancer [NF- κ B] in microglia and astrocytes (11). In animal models, S100B was associated to hyperalgesia (12), and in humans with fibromyalgia, it was associated to reduced pain thresholds in pressure pain testing (10). The diagnosis refinement and the better understanding of molecular mechanisms are utmost important to strengthen the concept of central sensitivity syndrome and its importance for appropriate physician education and patient management.

Considering the common mechanisms shared by some diseases with peripheral and central mechanisms associated to central sensitivity syndrome, it is reasonable to hypothesize that BDNF and S100B serum levels may have different courses according to the disease associated to chronic pain and central sensitization diagnosis.

Methods

Design Overview, Settings, and Participants

This is a cross-sectional study in which the final sample data was pooled from five clinical trials from September 2012 to March 2013 at the Pain and Neuromodulation Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). All of the trials had their respective protocols approved by the HCPA Ethics Committee and the informed written consent was obtained from all subjects. The studies involved women with chronic pain conditions such as fibromyalgia (NCT02041455; NCT01804097), osteoarthritis (NCT01747070; NCT01855958), endometriosis (NCT02161302) and chronic tension type headache (NCT01954277). The baseline data from the samples of the five trials conducted in our institution were retrieved. Details of the

inclusion of each study can be seen in Figure 1. All patients were recruited by directly contacting them from the institutional chronic pain clinic or by referrals from other clinic units and media advertisement. Patients who had failed to understand Brazilian Portuguese or who presented any oncologic condition, uterine fibroids (myomas), ovarian cysts, inflammatory pelvic disease, pregnancy, and kidney or hepatic insufficiency were excluded. Each clinical trial had strict inclusion criteria and the diagnoses were confirmed by a doctor with more than 15 years of experience in chronic pain management. The diagnosis was determined by the presence of clinical complaints and physical examination, as well as current and past medication, medical and psychiatric care. Within it were patients who had experienced pain both scored in the visual analog scale (VAS) as $> 40\text{mm}$ (i.e., moderate or severe pain - which was an inclusion criteria shared by the clinical trials used) (13) and that lasted >3 months, associated with functional disability. Functional disability was assessed using a structured questionnaire with dichotomous questions (yes/no), inquiring whether the disease had troubled patients, in the last 3 months, with (1) work; (2) enjoyable activities; (3) responsibilities at home; (4) relationships; (5) personal goals; and (6) thinking clearly, problem solving, concentrating, or recall. For inclusion, patients had to have at least one positive answer.

Trials details criteria are summarized as follow:

1. Diagnosis criteria for Osteoarthritis (OA): Confirmation of OA required by the clinical and radiographic criteria of the American College of Rheumatology (14). Furthermore, in OA, the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) was also used because it is a valid, reliable, and responsive instrument commonly used to assess pain and disability in studies of knee OA (15). The WOMAC is based on symptoms in the preceding 48 hours for assessing pain, joint stiffness, and perceived disability through 24 questions using Likert scales. The disability subscale is comprised of 17 items and assesses perceived physical function in different daily situations (e.g., getting in and out of a car). Patients with a disability score on the WOMAC ≥ 21 were included.
2. FM diagnosis adhered to the 2010 American College of Rheumatology criteria (16).
3. Endometriosis was confirmed by laparoscopy and, for its inclusion, it had to be associated with pelvic pain and/or dyspareunia of moderate to severe intensity (pain level > 4 on the VAS)(13) lasting >6 months.

4. **Chronic Tensional Type Headache (CTTH):** the diagnosis was based on criteria from the International Classification of Headache Disorders (17). The participants had to experience headaches with the following characteristics for more than 180 days in the last year: pain lasting hours to days or unremitting; bilateral, pressing or tightening (non-pulsating) quality; mild or moderate intensity; and not aggravated by routine physical activities. A headache treatment specialist confirmed the diagnosis.
5. **Volunteers:** Pain-free control volunteers were prospectively recruited. They were invited from the community using media advertisement. They were asked to complete screening questionnaires, and were excluded if they were experiencing any painful condition (either acute or chronic); used analgesics or corticosteroids; had any rheumatologic, psychiatric, or neurological disorder; had abused of alcohol or psychotropic substances during the 6 months previous to the screening; or used medications with known effects on the central nervous system (CNS). After obtaining informed written consent, a structured interview and respective serum tests were performed. All biological samples were collected at the HCPA in agreement with institutional policies. None of the control volunteers underwent physical examination. Although apparently healthy population, they might have underlying disease, or asymptomatic tender points. The lack of pain symptoms or use of analgesics or other drugs in the last 6 months, makes the presence of current disease unlikely. None of the patients, neither the pain-free volunteers, received compensation (monetary or of any other kind) for participating in the studies.

Serum Neuroplasticity Mediators' Concentration

The BDNF and serum S100B serums were the dependent variables of interest. Biological samples were collected early in the morning. All the material was obtained in plastic tubes and centrifuged for 10 minutes at 4500 rpm at 4°C. The serum was frozen at -80°C until further analyses. Serum mediator concentrations were determined by using BDNF (Chemi-Con/Millipore, catalogue #CYT306, kit's lower detection limit = 7.8 pg/mL) and S100B (Millipore, Missouri, USA, catalogue #EZHS100B-33 K, kit's lower detection limit = 2.7 pg./mL) enzyme-linked immunosorbent assay kits (ELISA), according to the manufacturers' instructions.

Potential Confounding Variables

All of the psychological tests used in these studies had been validated for the Brazilian population and were applied by an experienced psychiatrist in the administration of these tests. The patients' baseline depressive symptoms were assessed using the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) (18). According to their Hamilton Depression Rating Scale score, patients' depression symptoms were classified as mild if ranging from 11 to 17; and moderate to severe if ≥ 18 . OA patients' depressive symptoms were evaluated using the Beck Depression Inventory (BDI). BDI scores were classified as mild if ≤ 18 and as moderate to severe if > 18 . (19). The number of doses used weekly within the last 3 months determined analgesic use. Demographic data and medical comorbidities were surveyed using a standardized questionnaire from our laboratory.

Statistical Analysis

Comparisons between continuous variables were performed using either ANOVA or Kruskal- Wallis tests according to the variables' distribution. To evaluate the supposition of ANOVA model we proceed to the residual analysis. Level of significance for post hoc analyses was adjusted for multiple comparisons by Bonferroni correction. Categorical variables were compared using the square or Fisher exact test.

A MANCOVA model was used to adjust models for 2 dependend variables S100B and BDNF levels. the relationship between the BDNF and S100 (dependent variables) according to the spectrum of structural pathology present or absent. Covariates that could interfere in theses results were included in the model: pain severity, age, degree of depressive symptoms and use of psychotropic medications. The covariates were checked for their multicollinearity. The model was adjusted to deal with heteroscedasticity through a the *heteroscedasticity-consistent covariance matrix* (20). The alpha level was set at 0.05. The data were analyzed using SAS Studio.

Results

A sample of 315 patients was allocated from six different studies conducted by the same research group. 382 patients were excluded because they did not meet the inclusion criteria (VAS

<40mm). According to their underlying pathologies, chronic pain patients were divided into two groups considering the central sensitization syndrome with persistent somatic/visceral nociceptive input (the presence of structural lesion) or its absence. Patients with osteoarthritis (n = 88) and endometriosis (n = 36) were included in the group with structural pathology, and patients with fibromyalgia (n=117) and tensional headache (n=33) were grouped as absent structural lesion. For the non-patient comparison sample, 41 female volunteers were screened. Final samples characteristics are presented in Table 1.

Insert FIG 1

Fig 1. CONSORT 2010 flow diagrams. The present cross-sectional study pooled baseline data from six clinical trial runs at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), that recruited women with fibromyalgia, osteoarthritis, endometriosis, and chronic tension type headache.

The groups classified with respect to age, body mass index, pain severity, depressive symptoms, and use of pain medications (table 1). The differences in pain and in depressive symptoms were expected in the non-patient comparison sample because they were requirements for their inclusion. The distribution of the neuroplasticity mediators varied significantly across the presence or absence of structural pathology (fig 2).

Insert Table 1

Table 1. Sample Characteristics

Insert FIG 2

Fig 2. Serum neuroplasticity mediator concentration according to the presence or absence of structural lesion

Table 2 and Fig 3 shows the neuromodulators values controlling to confounding factors as

degree of pain, depression or analgesic consumption. BDNF serum concentration was higher and not different in patients with fibromyalgia and headache, the CSS group without structural pathology. In contrast, the concentrations of S100B were higher in patients with osteoarthritis, endometriosis and fibromyalgia in comparison to controls and tensional headache patients.

 Insert Table 2

Table 2 – Serum Neuroplasticity Mediator’s Concentration

Insert FIG 3

Fig 3. Serum neuroplasticity mediator concentration. Differences were tested using MANCOVA adjusted to covariates: moderate/severe depression, age, pain scale, and use of pain medication. The groups sharing a letter are not significantly different.

DISCUSSION

This study supports the hypothesis that BDNF and S100B neuromodulators present different serum levels according to the background disease associated to the chronic pain. Our main find is the confirmation of the increase BDNF in patients with CSS without structural pathology, as in fibromyalgia and chronic tension headaches. In these groups, the BDNF serum level - controlled to other factors such as depression, age, pain levels, and the use analgesics - was significantly greater than in women that are healthy or affected by diseases with the presence of structural pathology, namely with persistent nociceptive stimulus.

Both fibromyalgia and chronic tension headache share common sensitization mechanisms as amplification of afferent signals and inadequate descendent inhibitory control (22) associated to a psychological chronic stress. In CTTH it has been demonstrated that continuous nociceptive input from pericranial myofascial tissues may induce supraspinal sensitization and thereby the chronification of headaches (23). The psychological stress condition may cause a prolonged increase of muscle tone via the limbic system and at the same time potentiate pain facilitation from the brain stem to the spinal dorsal horn (24).

In fibromyalgia there is also a scarce evidence of structural pathology, that is, a non-nociceptive component related to the phenomenon of central sensitization. It is considered a disorder of the nociceptive processing with immunity system deregulation and inflammation (25). In addition, affective changes and mood disorders are typically observed in both diseases. BDNF orchestrates mechanisms of neuronal plasticity and survival, holding the capacity to sensitize peripheral nociceptors and increasing excitability of second order neurons (in the dorsal horn). Furthermore, BDNF levels alter the descending nociceptive inhibition towards nociceptive facilitation in the brain. It is also an important facilitator of long-term potentiation (LTP), especially in regions involved in learning and memory, which may be related to the generation of pain memories in chronic pain patients (26). Giving this multiplicity of actions, our results corroborate that pain associated to central sensitivity and related to central nervous dysfunction has a biological substrate. This study confirms the previous study of our group that observed increased levels of BDNF and TNF alpha in patients with CSS without structural pathology, represented by fibromyalgia and myofascial pain (3). In addition, our group demonstrated that the BDNF serum may be involved in the processes that mediate the disinhibition of motor cortex excitability, along with the function of the descending inhibitory pain modulation system, independently of the physiopathology mechanism of musculoskeletal pain syndromes (9). In patients with CTTH BDNF levels changed after pain modulation provided by electroacupuncture analgesia versus sham stimulation (27).

These findings are important in narrowing the gap between the patient's perception of their illness and their health care professional. Patients with 'unexplained' chronic musculoskeletal pain who are misinformed about pain, have low adherence for active treatments (28). The objective serum biological marker could help reconceptualise pain before initiating the treatment. Also, this approach can prevent the patient from suffering about the scientific background of their pain. The early CSS diagnosis can help reduce the staff and resources invested in misleading and stressful tests (e.g., laparoscopy, imaging, nerve conduction studies), enabling efforts to be directed toward safer and effective interventions (e.g., psychotherapy, physical activity) (3).

Distinctively, while the BDNF was predominantly higher in chronic pain patients without structural pathology, the S100B levels were predominantly elevated in patients with CSS with structural pathology, represented by OA and endometriosis. However we have found the same

elevation in fibromyalgia, but in lower levels than in OA. Osteoarthritis carries a strong nociceptive joint component associated to central sensitization in advanced stages. This central sensitization was demonstrated in a cross-sectional study on women with OA in which the change in cortical plasticity was associated with less intracortical inhibition (29). Several key mediators are particularly involved in the generation and maintenance of OA pain, such as NGF, that binds to the TrkA receptor, and cytokines (30).

Glia is thought to be involved in the propagation and modulation of acute and chronic painful stimuli, as well as in the neurotransmission and plastic changes. S100B protein is released from the glia after neuronal damage, for instance, after a head injury [12] or cardiopulmonary bypass. In an animal model it was observed a significant increase in S100B expression after pulpar tooth injury (31). Furthermore, in a recent study with patients submitted to bilateral total knee arthroplasty, liquoric S100B decreased significantly 1 week after the operation, compared to the basal value (638 ± 178 vs. 509 ± 167 pg/m, $p=0.019$) (32). A decrease in S100B could be associated with a potent postoperative analgesic strategy to maintain numeric rating pain scores <4.

Patients with endometriosis also have shown elevated basal levels of S100B in our sample. Endometrial lesions give rise to different types of pain, including visceral and myofascial nociception. Visceral nociception and peripheral sensitization are secondary to the direct innervation of endometrial injuries, but over time, central sensitization creates a process for pain sustention that is independent of the initial pathology. Besides, the viscerosomatic convergence provides the means for pain referral to somatic structures and induces the muscle spasm reflex and the eventual formation of myofascial trigger points too. These trigger points, in turn, may serve as an extra source of nociceptive input, becoming a key component of chronic pelvic pain (33). As far we know, this is the first exploratory study that has shown increased S100B levels in women with moderate to severe chronic pelvic pain. Giving the complex pain physiopathology associated to endometriosis, it is reasonable to consider S100b as promising biomarker.

Limitations

This study has some limitations. First, neuroplasticity mediators are not specifically for CSS. They have demonstrated association in different scenarios other than pain-like mood or psychiatric disorders, inflammation, trauma, and even physical exercises (34). BDNF and S100B

could also be influenced by both pain severity and depression symptoms. These two factors differed between our samples and to address the potential confounding effect, we included them as covariates in our analysis. Second, the division of CSS in absence or presence of structural pathology may be suboptimal. Granted the complexity of each syndrome, and the presence of multiple mechanisms that could contribute to the final perception of pain, an approach to design the signature of each disease could be considered. Third, our sample is strictly made of females and the results related to BDNF could not be extrapolated to males. In a experimental acute pain model in volunteers, it was demonstrated that gender interferes in BDNF levels (35). Finally the study's cross-sectional nature allows associations and not any causality inference, which requires future investigations.

Conclusion

The present finding has presented increased BDNF levels in chronic pain patients with CSS in the absence of tissue injury. Otherwise, S100B had predominantly increased levels in chronic pain patients with tissue injury. Taking in consideration the overlapping symptoms and pathophysiological findings in some conditions, these biomarkers could be used individually as an objective profile validation of the CSS. Also, they have the potential to be studied as markers of either the active disease or treatment evolution, since their measurement requires only blood analysis.

Bibliography

1. Yunus MB. Central Sensitivity Syndromes: A New Paradigm and Group Nosology for Fibromyalgia and Overlapping Conditions, and the Related Issue of Disease versus Illness. *Semin Arthritis Rheum.* 2008;37(6):339–52.
2. Staud R, Rodriguez ME. Mechanisms of Disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nat Clin Pract Rheumatol* [Internet]. 2006;2(2):90–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncprheum0091>
3. Deitos A, Dussán-Sarria JA, de Souza A, Medeiros L, da Graça Tarragô M, Sehn F, et al. Clinical Value of Serum Neuroplasticity Mediators in Identifying the Central Sensitivity

- Syndrome in Patients With Chronic Pain With and Without Structural Pathology. *Clin J Pain* [Internet]. 2015;31(11):959–67. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002508-201511000-00004>
4. Gwilym SE, Keltner JR, Warnaby CE, Carr AJ, Chizh B, Chessell I, et al. Psychophysical and functional imaging evidence supporting the presence of central sensitization in a cohort of osteoarthritis patients. *Arthritis Care Res.* 2009;61(9):1226–34.
 5. Yunus MB. Fibromyalgia and Overlapping Disorders: The Unifying Concept of Central Sensitivity Syndromes. *Semin Arthritis Rheum.* 2007;36(6):339–56.
 6. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: An embarrassment of riches. Vol. 44, *Neuron.* 2004. p. 5–21.
 7. Zhou XF, Deng YS, Xian CJ, Zhong JH. Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2000;12(1):100–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10651864>
 8. Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J Neurosci.* 2001;21(13):4891–900.
 9. Caumo W, Deitos A, Carvalho S, Leite J, Carvalho F, Dussán-Sarria JA, et al. Motor Cortex Excitability and BDNF Levels in Chronic Musculoskeletal Pain According to Structural Pathology. *Front Hum Neurosci* [Internet]. 2016;10(July):1–15. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnhum.2016.00357/abstract>
 10. Zanette SA, Dussan-Sania JA, Souza A, Deitos A, Torres ILS, Caumo W. Higher Serum S100B and BDNF Levels are Correlated with a Lower Pressure-Pain Threshold in Fibromyalgia. *Mol Pain* [Internet]. 2014;10(1):1744-8069-10–46. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1186/1744-8069-10-46>
 11. Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1. Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α . *Neurobiol Aging.* 2010;31(4):665–77.
 12. Imbe H, Kimura A, Donishi T, Kaneoke Y. Effects of restraint stress on glial activity in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience.* 2013;241:10–21.
 13. Palos GR, Mendoza TR, Mobley GM, Cantor SB, Cleeland CS. Asking the community

- about cutpoints used to describe mild, moderate, and severe pain. *J Pain*. 2006;7(1):49–56.
14. Peat G, Thomas E, Duncan R, Wood L, Hay E, Croft P. Clinical classification criteria for knee osteoarthritis: performance in the general population and primary care. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(10):1363–7.
 15. Nunes G, de Castro LV, Wageck B, Kume V, Chiesa GS, de Noronha M. Translation into Portuguese of questionnaires to assess knee injuries. *Acta Ortop Bras* [Internet]. 2013;21(5):288–94. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3874993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 16. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Häuser W, Katz RS, et al. Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: A modification of the ACR preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia. *J Rheumatol*. 2011;38(6):1113–22.
 17. Olesen J. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia* [Internet]. 2013;33(9):629–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18808500><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24409431><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22325197><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805756><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238370><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24238370>
 18. Freire MA, de Figueiredo VLM, Gomide A, Jansen K, da Silva RA, da Silva Magalhaes PV, et al. Hamilton Scale: Study of the psychometric characteristics in a sample from Southern Brazil. [Internet]. Vol. 63, *Escala Hamilton: Estudo das características psicometricas em uma amostra do sul do Brasil*. 2014. p. 281–9. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=psyc11&NEWS=N&AN=2015-09769-002>
 19. Gomes-Oliveira MH, Gorenstein C, Neto FL, Andrade LH, Wang YP. Validation of the Brazilian Portuguese Version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample. *Rev Bras Psiquiatr* [Internet]. 2012;34(4):389–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1516444612000487>
 20. MacKinnon JG, White H. Some heteroskedasticity-consistent covariance matrix estimators with improved finite sample properties. *J Econom*. 1985;29(3):305–25.

21. White H. A heteroskedasticity-consistent covariance matrix and a direct test for heteroskedasticity. *Econometrica*. 1980;48:817–38.
22. Fumal A, Schoenen J. Tension-type headache: current research and clinical management. Vol. 7, *The Lancet Neurology*. 2008. p. 70–83.
23. Bezov D, Ashina S, Jensen R, Bendtsen L. Pain perception studies in tension-type headache. Vol. 51, *Headache*. 2011. p. 262–71.
24. Bendtsen L. Central sensitization in tension-type headache--possible pathophysiological mechanisms. *Cephalalgia* [Internet]. 2000;20(5):486–508. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11037746> <http://cep.sagepub.com/cgi/doi/10.1046/j.1468-2982.2000.00070.x>
25. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Di Franco M, Buskila D, Alciati A, Giacomelli C, et al. Dysfunctional syndromes and fibromyalgia: A 2012 critical digest. Vol. 30, *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2012.
26. Nijs J, Meeus M, Versijpt J, Moens M, Bos I, Knaepen K, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2015;19(4):565–76. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2014.994506>
27. Chassot M, Dussan-Sarria JA, Sehn FC, Deitos A, de Souza A, Vercelino R, et al. Electroacupuncture analgesia is associated with increased serum brain-derived neurotrophic factor in chronic tension-type headache: a randomized, sham controlled, crossover trial. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2015;15(1):144. Available from: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-015-0664-x>
28. Nijs J, Paul van Wilgen C, Van Oosterwijck J, van Ittersum M, Meeus M. How to explain central sensitization to patients with “unexplained” chronic musculoskeletal pain: Practice guidelines. *Man Ther*. 2011;16(5):413–8.
29. Tarragó M da GL, Deitos A, Brietzke AP, Vercelino R, Torres ILS, Fregni F, et al. Descending Control of Nociceptive Processing in Knee Osteoarthritis Is Associated With Intracortical Disinhibition. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016;95(17):e3353. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792->

201604260-00010

30. Eitner Annet, Hofmann Gunther O SH. Mechanisms of Osteoarthritic Pain. Studies in Humans and Experimental Modelso Title. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:349.
31. Canzobre MC, Ríos H. Pulpar tooth injury induces plastic changes in S100B positive astroglial cells in the trigeminal subnucleus caudalis. *Neurosci Lett.* 2010;470(1):71–5.
32. Jeon Y-T, Kim B-G, Park YH, Sohn H-M, Kim J, Kim SC, et al. Postoperative cognitive changes after total knee arthroplasty under regional anesthesia. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016;95(52):e5635. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201612300-00011>
33. Aredo J V., Heyrana KJ, Karp BI, Shah JP, Stratton P. Relating Chronic Pelvic Pain and Endometriosis to Signs of Sensitization and Myofascial Pain and Dysfunction. *Semin Reprod Med.* 2017;35(1):088–97.
34. Szuhany KL, Bugatti M, Otto MW. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. Vol. 60, *Journal of Psychiatric Research.* 2015. p. 56–64.
35. Stefani LC, Torres IL da S, De Souza ICC, Rozisky JR, Fregni F, Caumo W. BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects. *Neurosci Lett.* 2012;514(1):62–6.

Fig 1: CONSORT 2010 flow diagrams. The present cross-sectional study pooled baseline data from six clinical trials run at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), that recruited women with fibromyalgia, osteoarthritis, endometriosis and chronic tension type headache.

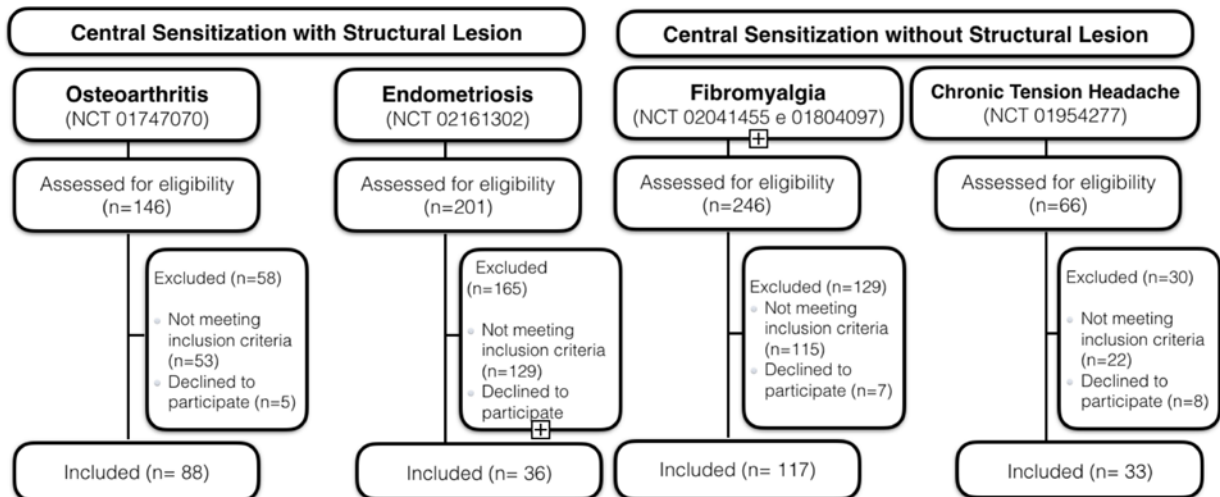


Fig 2 Serum neuroplasticity mediators concentration according the presence or absence of structural lesion

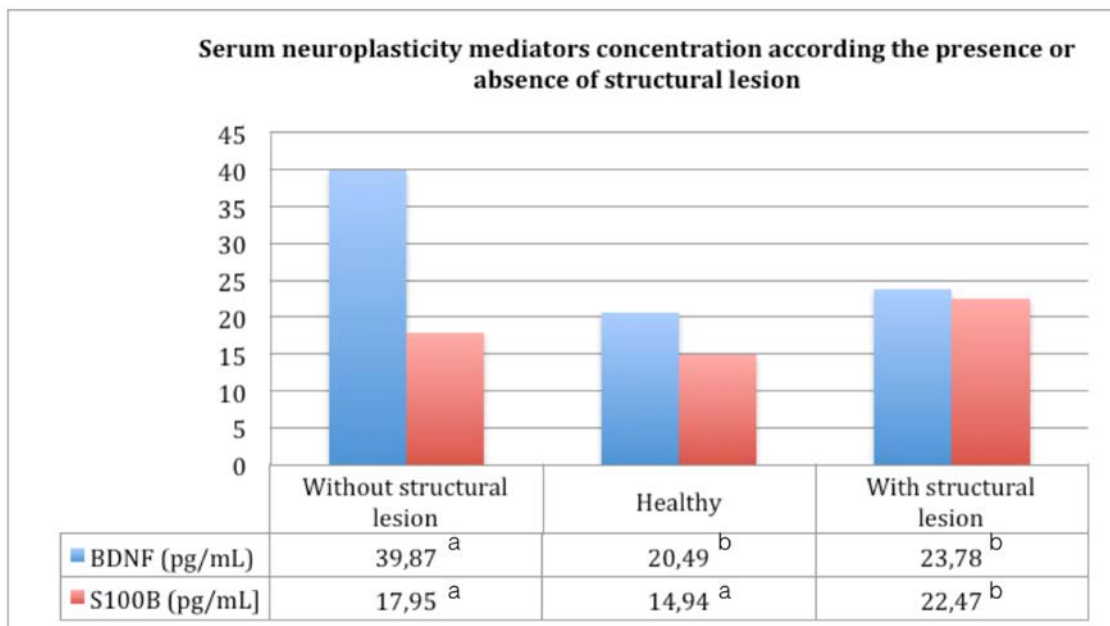


Fig 3 Serum neuroplasticity mediators concentration. Differences were tested using MANCOVA adjusted to covariants: moderate/severe depression, age, pain scale and use of pain medication. The groups sharing a letter are not significantly different.

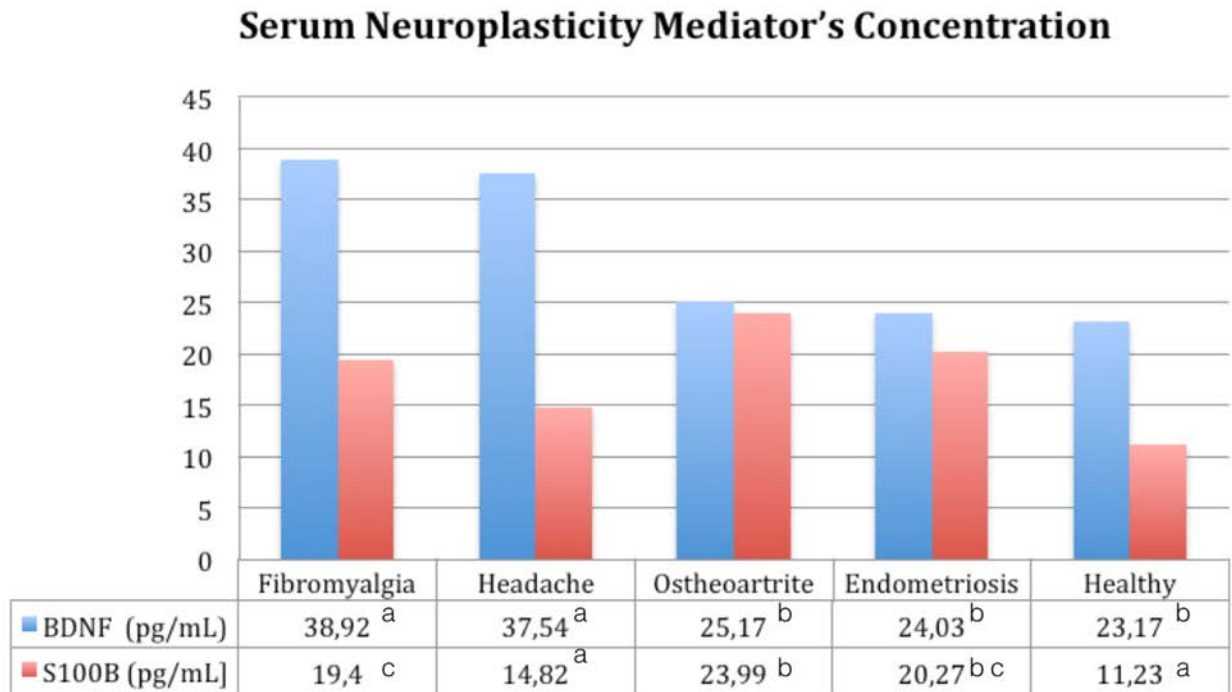


Table 1. Sample Characteristics

Characteristics	Healthy Controls	Osteoarthritis	Endometriosis	Fibromyalgia	Tension Headache	P
	(n = 41)	(n = 88)	(n = 36)	(n = 117)	(n=33)	
Age (years)	30.78 (10.5)	64.55 (7.86)	37.22 (5.91)	49.34 (8.7)	39.97 (10.2)	0.00
Body mass index (kg / m2)	23.18 (2.96)	29.33 (4.60)	25.12 (5.75)	26.2 (5.49)	24.80 (3.27)	0.00
Years of study	10.34 (6.94)	8.6 (4.79)	10.88 (2.80)	10.54 (4.18)	14,12 (3.60)	0.00
Smoking (yes / no)	-	3/85	6/30	15/102	1/40	0.01
Alcohol Consumption (yes / no)	-	17/71	7/29	23/94	15/26	0.00
Psychopharmaceuticals (yes / no)	-	38/50	7/29	78/39	9/24	0.00
Depressive Symptoms (Absent-Mild / Mod-Severe)	-	17/71	14/22	79/38	0/33	0.00
Chronic Disease (yes / no)	-	72/16	13/23	45/72	7/26	0.00
Systemic Arterial Hypertension (yes / no)	-	53/35	3/33	29/88	2/31	0.00
Acute Myocardial Infarction (yes / no)	-	4/84	0/36	1/116	0/33	0,13
Diabetes Melito (yes / no)	-	15/73	0/36	3/114	0/33	0.00
Asthma (yes / no)	-	9/79	2/34	5/112	2/31	0.18
Thyroid Diseases (yes / no)	-	21/67	3/33	1/116	3/30	0.00
Analgesic consumption doses / week (0-3 doses /> 3 doses)	-	42/46	13/23	98/19	14/19	0.00
Pain in EAV	0.0	5.54 (2.40)	??	6.95 (1.76)	6.24 (1.49)	0.00
Painkiller	0.0	5.80 (6.50)	2.78 (2.58)	14.50 (12.06)	5,64 (5,21)	0.00
Sleep Quality	4.37 (3.54)	19.33 (11.64)	17.2 (7.00)	16.98 (8.09)	17,42(7,04)	0.00

Data are presented as mean (standard deviation). Abbreviations: Not Rated (NR)

Table 2 – Serum Neuroplasticity Mediator's Concentration

Neuroplasticity Mediators	Pain-free controls (n = 17)	Osteoarthritis (n = 86)	Endometriose (n = 36)	Fibromialgia (n = 79)	Headache (n=33)	P*
BDNF levels (pg/mL)	23,17 (8,85) ^b	25.17 (10,4) ^b	24,03 (8,41) ^b	38,92(19,8) ^a	37,54(17,3) ^a	0.00
S100B levels pg/mL)	11,23 (8,27) ^a	23,99 (11,06) ^b	20,27 (10,07) ^{b,c}	19,40 (9,71) ^c	14,82(4,63) ^a	0.01

Differences were tested using MANCOVA adjusted to covariants: moderate/severe depression, age, pain scale and use of pain medication. The groups sharing a letter are not significantly different.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1 Conclusão

Dor é um dos sintomas médicos de maior importância e seu processo cronificação deve ser e compreendido. O complexo processo pró-inflamatório de sinalização central contribui de forma significativa para a ampliação e manutenção de níveis elevados de dor, e o estudo de seus marcadores e processos biológicos tornam-se um alvo importante. A dor crônica e os sistemas imunológicos se autorregulam e esse mecanismos e marcadores não são completamente conhecidos.

O presente estudo foca no estudo da fisiopatologia da dor e assim como outros trabalhos, pertencentes ao mesmo grupo de pesquisadores, está envolvido no mecanismo do estudo da neuroplasticidade, com ênfase em dor. Os dados do nosso estudo demonstraram associação entre os níveis de BDNF e S100B em patologias de componente somático/visceral em um padrão de associação inverso, considerando-se a presença ou ausência de lesão estrutural somática/visceral.

Esses resultados apresentados podem além de virem a contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos subjacentes de patologias que envolvam dor crônica, abrir precedentes para elaboração de novos tratamentos e métodos diagnósticos que envolvam aspectos patológicos de neuroplasticidade.

8.2 Perspectivas

Nos últimos anos muito se descobriu a cerca da fisiopatologia da dor aguda, bem como da dor crônica. O manejo terapêutico dos diferentes grupos fisiopatológicos de dor também apresentou grande avanço na ciência, porém ainda não se dispõe de um mecanismo diagnóstico eficaz e precoce da SCC, seja por meio de marcadores séricos ou outros exames complementares, diagnóstico da SCC vem a ser essencialmente clínico.

Esse presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida no laboratório de dor e neuromodulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, o qual é voltado ao estudo da plasticidade neuronal adaptativa de doenças que cursam com dor crônica. Como parte da evolução dessa mesma linha de pesquisa vamos sugerir o estudo com novos marcadores como

, por exemplo, o Nerve Growth Factor – NGF o qual também apresenta bastante relação com síndromes de dor crônica.

Essa dissertação corrobora para o desenvolvimento da linha de pesquisa que estuda processos de neuromodulação, os resultados obtidos poderão ajudar em pesquisas futuras usando estratégias metodológicas em que se pode inferir causalidade, tendo em vista este ter sido um estudo transversal.

9. ANEXOS

9.1 STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *observational studies*

	Item No	Recommendation	Please insert check where included or N/A where not applicable
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	41-2
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	42
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	43-4
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	44
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	44
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, treatment, follow-up, and data collection	45-6
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	45-6
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of treated and untreated <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	N/A
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	45 - 6
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	48
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on other treatments and potential confounders	48
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	48
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	48
Variables	7	Clearly define all outcomes, treatments, predictors,	48

		potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	N/A
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	44-45
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	47
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	47
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	46
		(c) Explain how missing data were addressed	N/A
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	44
		(e) Describe any sensitivity analyses	N/A

*Give information separately for cases and controls.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at <http://www.strobe-statement.org>.

