

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

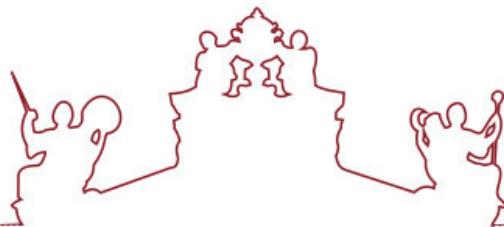
Dissertação

Diferenças na variabilidade da frequência cardíaca e em biomarcadores salivares entre doentes com fibromialgia e saudáveis com a aplicação de um protocolo de fadiga muscular.

Ana Freire Pinto Rodrigues

Orientador(es) | Ana Rodrigues Costa
José Alberto Parraça

Évora 2022



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

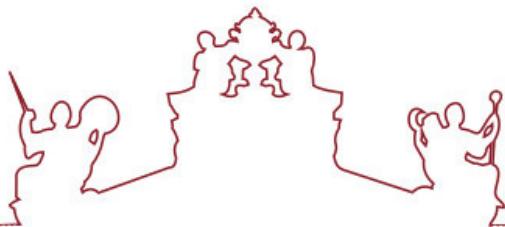
Dissertação

Diferenças na variabilidade da frequência cardíaca e em biomarcadores salivares entre doentes com fibromialgia e saudáveis com a aplicação de um protocolo de fadiga muscular.

Ana Freire Pinto Rodrigues

Orientador(es) | Ana Rodrigues Costa
José Alberto Parraça

Évora 2022



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora)

Vogais | Célia Maria Antunes (Universidade de Évora) (Arguente)
José Alberto Parraça (Universidade de Évora) (Orientador)

Évora 2022

Índice

Índice de figuras	iv
Índice de tabelas	v
Abreviaturas.....	vi
Financiamento	viii
1. Introdução.....	2
1.1. Fibromialgia, prevalência e diagnóstico	2
1.2. Alterações do Sistema Nervoso em Fibromialgia.....	2
1.3. Stress oxidativo e fibromialgia	5
1.3.1. Stress oxidativo e nociceção.....	8
1.3.2. Stress oxidativo e depressão.....	9
1.4. Exercício físico e sua relevância na fibromialgia	10
1.4.1. Tecido muscular esquelético em fibromialgia.....	10
1.4.2. Efeitos do exercício físico no organismo saudável	14
1.4.3. Efeitos do exercício físico em doentes com fibromialgia.....	18
1.5. Biomarcadores em fibromialgia.....	23
1.5.1. Biomarcadores da atividade do sistema nervoso autónomo	24
1.5.2. Biomarcadores salivares	31
2. Objetivos.....	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos	43
3. Metodologia.....	45
3.1 Estratégia	45
3.1.1. Local de realização	45
3.1.2. Período de realização.....	45
3.1.3. Amostras.....	45
3.1.4. Técnicas utilizadas.....	45

3.2	Esquema do procedimento experimental	46
3.3.	Procedimento Experimental.....	47
3.3.1.	Caracterização da amostra	47
3.3.2.	Prova de esforço	47
3.3.3.	Parâmetros avaliados relativos à atividade física	48
3.3.4.	Parâmetros salivares	49
3.3.4.1.	Equipamentos e reagentes.....	49
3.3.4.2.	Colheita e processamento das Amostras.....	50
3.3.4.3.	Determinação do Fluxo Salivar	50
3.3.4.4.	Quantificação da Proteína Total.....	51
3.3.4.5.	Determinação da α -amilase salivar.....	52
3.3.4.6.	Determinação da Atividade da Catalase	53
3.3.4.7.	Determinação da Atividade da GPx.....	53
3.4.	Análise estatística	54
4.	Resultados.....	56
4.1.	Perceção de esforço em mulheres saudáveis e fibromiálgicas.....	56
4.2.	Alterações na variabilidade da frequência cardíaca entre mulheres saudáveis e fibromiálgicas antes e após a prova de esforço.....	57
4.3.	Alterações nos parâmetros salivares entre mulheres saudáveis e fibromiálgicas antes e após a prova de esforço	61
4.3.1.	Relação entre a concentração proteica e o fluxo salivar.....	64
4.3.2.	Relação entre a atividade da α -amilase salivar e a concentração proteica	65
5.	Discussão de Resultados.....	67
6.	Conclusões.....	72
	Referências Bibliográficas.....	74
	Anexos.....	91

Índice de figuras

Figura 1- Sequência de eventos de transmissão de dor.	3
Figura 2- Proposta explicativa da função sinalizadora do anião superóxido na via da dor.....	8
Figura 3 - Representação esquemática do tecido muscular	11
Figura 4 - Efeito da administração de antioxidantes no exercício físico. As ROS em excesso induzidas pela prática de atividade física causam danos musculares, fadiga e stress oxidativo	16
Figura 5 - Representação da atividade elétrica do coração	25
Figura 6 - Exemplo de gráfico Poincaré representativo de uma série de intervalos RR mensurada em repouso (A) e durante uma prova de exercício (B).	30
Figura 7 - Glândulas salivares. A – Representação ilustrativa da localização das glândulas salivares. B – Esquema da constituição de uma glândula salivar.....	32
Figura 8 - Produção e regulação salivar	32
Figura 9 - Diferenças na RPE entre o grupo de mulheres saudáveis e o grupo de mulheres com fibromialgia antes e após a prova de esforço.....	56
Figura 10 - Diferenças nos parâmetros da HRV entre o grupo de mulheres saudáveis e o grupo de mulheres com fibromialgia antes e após a prova de esforço	58
Figura 11 - Diferenças nos parâmetros da HRV entre o grupo de mulheres saudáveis e o grupo de mulheres com fibromialgia antes e após a prova de esforço	60
Figura 12 - Diferenças nos parâmetros salivares entre o grupo de mulheres saudáveis e o grupo de mulheres com fibromialgia antes e após a prova de esforço	61
Figura 13 - Diferenças nos parâmetros salivares entre o grupo de mulheres saudáveis e o grupo de mulheres com fibromialgia antes e após a prova de esforço	62
Figura 14 - Relação entre a concentração proteica e o fluxo salivar.....	64
Figura 15 - Relação entre a atividade da α -amilase salivar e a concentração proteica.	65
Figura 16 - Exemplo de escala subjetiva de percepção do esforço de Borg.....	91
Figura 17 - Curva de calibração para determinação da concentração proteica.....	92

Índice de tabelas

Tabela 1- Caracterização antropométrica das participantes do estudo.....	47
Tabela 2 - Diferenças entre mulheres fibromiálgicas e mulheres saudáveis na escala de Borg em repouso e após a prova de esforço	93
Tabela 3 - Variações da variabilidade da frequência cardíaca em mulheres fibromiálgicas e mulheres saudáveis em repouso	93
Tabela 4 - Variações da variabilidade da frequência cardíaca em mulheres saudáveis antes e após a prova de esforço	94
Tabela 5 - Variações da variabilidade da frequência cardíaca em mulheres fibromiálgicas antes e após a prova de esforço.	95
Tabela 6 - Diferenças encontradas nos parâmetros salivares entre mulheres fibromiálgicas e mulheres saudáveis em repouso	95
Tabela 7 - Diferenças encontradas nos parâmetros salivares no grupo controlo antes e após a prova de esforço.....	96
Tabela 8 - Diferenças encontradas nos parâmetros salivares no grupo das fibromiálgicas antes e após a prova de esforço	96

Abreviaturas

Ach – Acetilcolina

ACR – *American College of Rheumatology*

ADP – Adenosina difosfato

ANCOVA – Análise de covariância. Do inglês *Analysis of Covariance*

ANOVA – Análise de variância, do inglês *Analysis of Variance*

ATP – Adenosina trifosfato

BMI – Índice de massa corporal, do inglês *Body Mass Index*

BSA – Albumina de Soro Bovino, do inglês *Bovine Serum Albumine*

CBBG – Corante Coomassie Brilliant Blue G-250

DH – Corno dorsal da espinhal medula, do inglês *Dorsal Horn*

DNS – Reagente Ácido Dinitrosalicílico, do inglês *Dinitrosalicylic acid*

ECG – Eletrocardiograma

EPR – Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrónica, do inglês *Electronic Paramagnetic Resonance spectroscopy*

EVA – Escala Visual Analógica

GPx – Glutationo peroxidase

GSH – γ -glutamilcisteinilglicina ou glutationo reduzido

GSSH – Glutationo oxidado

HRV – Variabilidade da Frequência Cardíaca, do inglês *Heart Rate Variability*

MDA – Malondialdeído

ANA FREIRE - Diferenças na variabilidade da frequência cardíaca e em marcadores salivares entre doentes com fibromialgia e saudáveis com a aplicação de um protocolo de fadiga muscular

NADPH – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NIH – Instituto nacional de saúde, do inglês *National Institute of Health*

pH – Potencial de hidrogénio

Pi – Fosfato inorgânico

PSA – Análise de espectro de potência, do inglês *Power Spectrum Analysis*

ROS – Substâncias Reativas do Oxigénio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

RPE – Esforço percebido pela escala de Borg, do inglês *Rating of Perceived Exertion*

SD – Significativamente diferente

SNA – Sistema Nervoso Autónomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Parassimpático

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SOD – Superóxido dismutase

SS – Índice de severidade dos sintomas, do inglês *Symptom Severity*

TAC – Capacidade Antioxidante Total, do inglês *Total Antioxidant Capacity*

TBS – Solução salina tamponada com tris, do inglês *Tris-Buffered Saline*

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

VO_{2máx} – Consumo máximo de oxigénio

WPI – Índice de dor, do inglês *Widespread Pain Index*

Financiamento

Este estudo contou com o apoio do programa UÉvora—UniverCIDADE VII. Instituto Português do Desporto e Juventude - I.P., Apoio à Atividade Desportiva 2022, Desenvolvimento do Desporto. Contrato de Programa, CP/217/DDT/2022.

Diferenças na Variabilidade da Frequência Cardíaca e em Biomarcadores Salivares Entre Doentes com Fibromialgia e Saudáveis com a Aplicação de um Protocolo de Fadiga Muscular

Resumo

Em estudos anteriores observou-se que doentes com fibromialgia sofrem de disautonomia, hiper-reactividade do sistema nervoso autónomo em repouso e hipo-reactividade durante stress.

Parâmetros que refletem a interação entre o SNA e o sistema cardiovascular durante o exercício podem fornecer informações fisiopatológicas. Este estudo teve como objetivo investigar as diferenças entre pessoas com fibromialgia e controlos saudáveis na HRV e em parâmetros salivares (como fluxo, concentração proteica, atividades enzimáticas da α -amilase, catalase e GPx) em dois momentos: em repouso e após uma prova de esforço. Um total de 37 participantes, vinte e um com fibromialgia e dezasseis controlos saudáveis, participaram neste estudo transversal. Parâmetros da HRV e amostras salivares foram obtidos antes e após a prova de esforço. A prova de esforço consistiu em 20 repetições de extensão do joelho e flexão da perna dominante a $180^\circ \cdot s^{-1}$.

Foram detetadas diferenças significativas entre o grupo da fibromialgia e o grupo controlo em repouso no domínio do tempo, domínio da frequência e domínio não linear da HRV. A atividade da α -amilase salivar revelou-se mais elevada na fibromialgia comparativamente com o controlo. A atividade da catalase difere entre os grupos. Os efeitos agudos do exercício na HRV demonstraram que as doentes com fibromialgia não reagiram significativamente ao exercício. Foram detetadas diferenças significativas entre a fibromialgia e o grupo controlo após a prova na HRV. A catalase aumentou significativamente após a prova no grupo controlo, enquanto o fluxo salivar diminuiu significativamente em mulheres com fibromialgia. Este estudo sugere que uma atividade da α -amilase mais elevada, uma atividade da catalase mais baixa e uma HRV alterada podem ser biomarcadores de fibromialgia, associados a uma redução no fluxo salivar sem alterações na HRV após prova de esforço. Mais estudos devem ser realizados no futuro para avaliar esta hipótese, a fim de encontrar biomarcadores de diagnóstico para fibromialgia.

Palavras-chave: modulação autónoma; exercício físico; fadiga; Sistema nervoso simpático.

Heart Rate Variability and Salivary Biomarkers Differences between Fibromyalgia and Healthy Participants after an Exercise Fatigue Protocol

Abstract

Previous studies showed that people with fibromyalgia suffer from dysautonomia, a persistent ANS hyperactivity at rest and hyporeactivity during stressful situations. Parameters reflecting the complex interplay between the ANS and the cardiovascular system during exercise can provide significant pathophysiological information. Therefore, this study aimed to investigate the differences between people with fibromyalgia and healthy controls on HRV and salivary parameters (such as flow, protein concentration, enzymatic activities of α -amylase, catalase and GPx) in two moments: at baseline, and after an exercise fatigue protocol. A total of 37 participants, twenty-one were people with fibromyalgia and sixteen were healthy controls, participated in this cross-sectional study. HRV parameters and salivary samples were collected before and after an exercise fatigue protocol. The fatigue protocol consisted of 20 repetition of knee extension and flexion of the dominant leg at 180 °·s-1. Significant differences were found at baseline between people with fibromyalgia and control group in time domain, frequency domain and non-linear domain of the HRV. In addition, salivary α -amylase activity was higher in fibromyalgia than in control group and catalase activity was different between groups in the opposite way. Exercise acute effects on HRV showed that people with fibromyalgia didn't significantly react to exercise. However, significant differences between baseline and post-exercise on HRV were observed in healthy controls. Catalase significantly increased after exercise in healthy controls whereas salivary flow significantly decreased in women with fibromyalgia after an exercise fatigue protocol. This study suggests that a higher α -amylase activity, a lower catalase activity and an impaired HRV can be used as possible biomarkers of fibromyalgia, associated with a reduction in salivary flow without changes in HRV or catalase activity after a fatigue exercise protocol. More studies should be carried out in the future to evaluate this hypothesis, in order to find diagnostic biomarkers in fibromyalgia.

Keywords: autonomic modulation; physical exercise; fatigue; sympathetic nervous system.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO



1. Introdução

1.1. Fibromialgia, prevalência e diagnóstico

A fibromialgia faz parte de um espectro de síndromes que carecem de uma classificação precisa (Borchers & Gershwin, 2015) pois, embora tenha vindo a ser o objeto de diversos estudos, ainda se conhece pouco acerca da sua etiologia e a causa dos seus sintomas permanece uma incógnita.

Trata-se de uma doença não inflamatória caracterizada por dor musculoesquelética crónica generalizada, podendo existir outros sintomas associados, como cefaleias, fadiga, ou sono não reparador (Borchers & Gershwin, 2015). O critério de diagnóstico combina a dor generalizada há mais de 3 meses, com o índice de dor, WPI (*Widespread Pain Index*) ≥ 7 e o índice de severidade dos sintomas, SS (*Symptom Severity*) ≥ 5 ou o WPI entre 3 e 6 e o SS ≥ 9 , de acordo com a proposta de diagnóstico lançada pela *American College of Rheumatology* (ACR) em 2010 (Wolfe et al., 1990, 2011), comprometendo a qualidade de vida do paciente.

Uma vez que se trata de uma patologia que não deixa sequelas físicas diretas, o seu diagnóstico é desafiante, sem que tenham sido identificados marcadores bioquímicos para o efeito (Illescas-Montes et al., 2021; Mease, 2005), o que leva a que estes pacientes sejam submetidos a baterias de exames morosas até que, finalmente, lhes seja diagnosticada, por exclusão de outras patologias, a fibromialgia (Fitzcharles et al., 2013).

A fibromialgia afeta cerca de 2.7% da população mundial, sendo mais incidente em países desenvolvidos e na população feminina (4.2%) com uma razão mulher/homem de 3:1 (Borchers & Gershwin, 2015; Wolfe et al., 2011).

1.2. Alterações do Sistema Nervoso em Fibromialgia

O sistema nervoso é composto pelo Sistema Nervoso Central (SNC), constituído pelo cérebro e pela espinal medula, tendo como função integrar e interpretar as informações enviadas através do sistema nervoso periférico, a outra componente do sistema nervoso, responsável por transmitir as informações das restantes partes do corpo ao SNC, e posteriormente coordenar todas as atividades do corpo ao enviar resposta aos órgãos efetores (Yam et al., 2018).

O sistema nervoso periférico compreende nervos e gângrios localizados fora do cérebro e da espinha medula, tendo como função conectar o SNC aos órgãos e membros (Yam et al., 2018).

A dor, cuja via de sinalização se encontra ilustrada na Figura 1, é um mecanismo de defesa do organismo que envolve os sistema nervoso periférico e SNC. Trata-se da reação a um determinado estímulo proveniente do ambiente, geralmente potencialmente perigoso, colocando o organismo em estado de alerta, sendo, para isso, uma série de eventos sensoriais para que o cérebro desenvolva uma resposta a este estímulo (Yam et al., 2018).

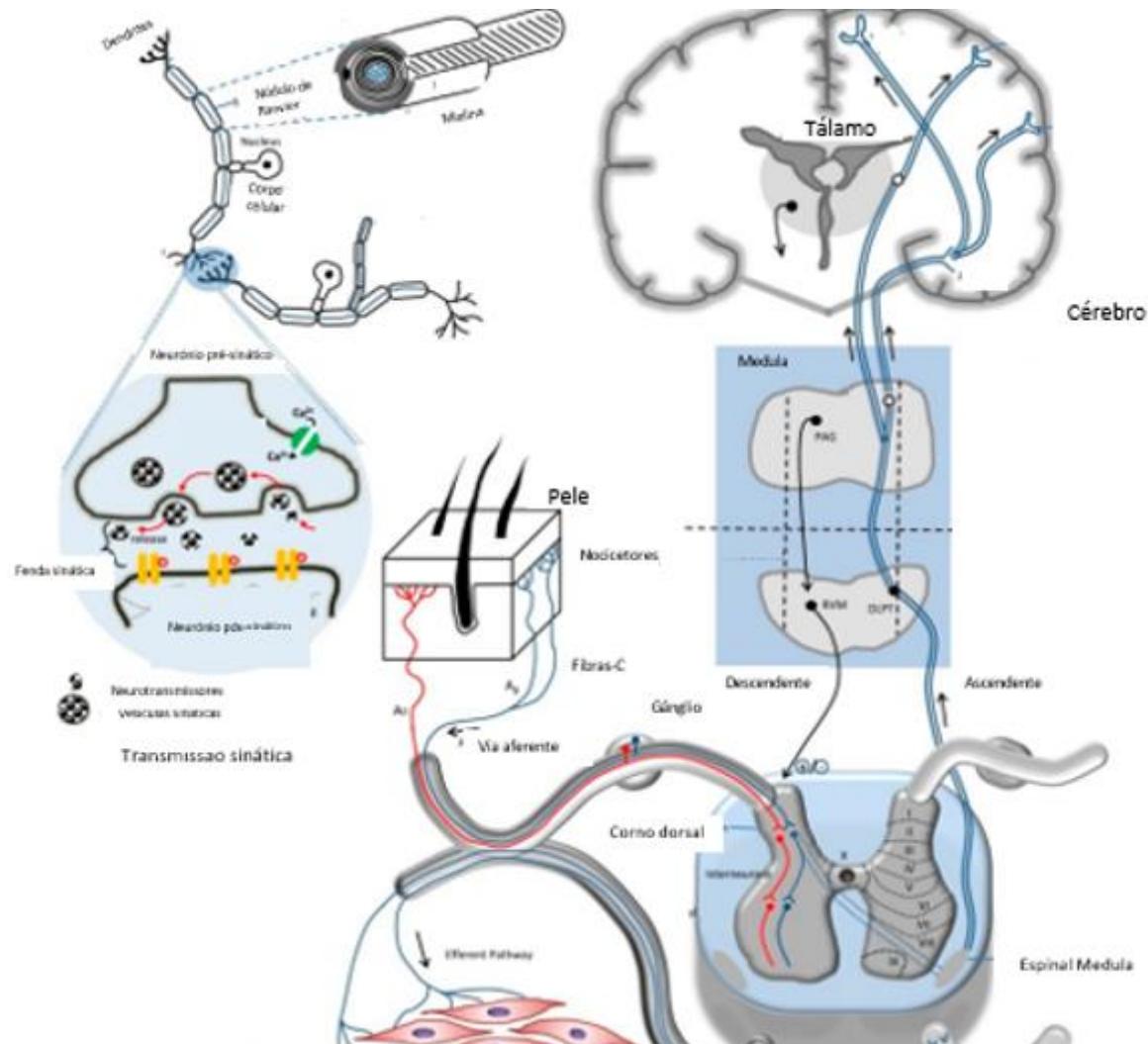


Figura 1- Sequência de eventos de transmissão de dor. Rota básica da transmissão do estímulo doloroso em ordem ascendente e descendente. Adaptado de General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation (2018).

O mecanismo básico da dor compreende três eventos: a) transdução, na qual o estímulo é convertido em sinais químicos tecidulares que, após atravessarem a fenda sináptica, são convertidos em sinais elétricos para que atravessem os neurônios, trata-se da sensibilidade à

dor; b) transmissão dos sinais elétricos ao longo das vias neuronais da periferia para o corno dorsal (DH) da espinal medula através do sistema nervoso periférico, enquanto os neurotransmissores na fenda sináptica transmitem informações de um terminal pré-sináptico para um terminal pós-sináptico; c) modulação, que ocorre em todos os níveis das vias nociceptivas através do neurônio aferente primário, DH e centro cerebral superior, trata-se da transmissão dos sinais para o cérebro através do SNC de modo a que a informação seja interpretada para a geração de uma resposta. Assim, o caminho da dor é iniciado e completado, permitindo a sensação dolorosa desencadeada pelo estímulo e a reação de defesa por parte dos órgãos efetores (Yam et al., 2018).

Estes eventos, no seu conjunto, constituem a via ascendente da dor. A via descendente consiste na transmissão da resposta gerada no cérebro para a espinal medula e desta até aos órgãos efetores através do sistema nervoso periférico (Yam et al., 2018).

Os neurônios aferentes ou sensoriais são responsáveis pela transmissão dos estímulos da periferia para a espinal medula, enquanto os neurônios eferentes ou motores transportam os impulsos dos sinais de movimento motor da espinal medula para os órgãos efetores periféricos, que incluem o músculo esquelético e o músculo liso (Cesare & McNaughton, 1997).

A dor advém da ativação de neurônios sensíveis a estímulos potencialmente nocivos, denominados por nociceptores (não mielinizados, fibras C e mielinizados, fibras A) que permanecem silenciados em homeostase (Dubin & Patapoutian, 2010). Existem diferentes tipos de nociceptores de acordo com a sua velocidade de condução e limiar de sensibilidade a estímulos mecânicos (M) e térmicos (H de *Heat*, calor; C de *Cold*, frio), sendo os mais comuns os que respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (polimodais) do tipo C (C-MH, C-MC, C-MHC). Os nociceptores do tipo A são predominantemente sensíveis ao calor e/ou mecanossensíveis (A-MH, A-H, A-M) (Dubin & Patapoutian, 2010).

Alterações no processamento sensorial ao nível do SNC podem alterar a sensibilidade dos nociceptores levando a anomalias na percepção da dor, conduzindo ao principal sintoma associado à fibromialgia: dor constante e exacerbada sem causar dano e sem inflamação, decorrente de uma sensibilização central (Yam et al., 2018).

A fibromialgia parece ser consequência de um desequilíbrio no organismo, com ativação do ramo simpático do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), aumento da expressão de

marcadores de stress oxidativo e diminuição de defesas antioxidantes (Borchers & Gershwin, 2015; Clauw et al., 2018; Hendrix et al., 2020; Illescas-Montes et al., 2021; Ozgocmen et al., 2006). A desregulação autónoma e fatores epigenéticos são potenciais mecanismos de ação subjacentes ao aumento do stress oxidativo celular, causa ou consequência destas disfunções.

Fatores genéticos e eventos ambientais podem estar na origem desta patologia (Gracely et al., 2012). Em indivíduos com alguma pré-disposição genética, situações tais como traumas físicos ou psicológicos, infecções como o HIV, cirurgias, doenças autoimunes, acidentes automobilísticos, eventos catastróficos como a guerra ou o abuso sexual podem desencadear o surgimento dos sintomas da fibromialgia (Bradley, 2009).

As alterações encontradas entre indivíduos saudáveis e doentes com fibromialgia, nomeadamente no que diz respeito ao funcionamento do SNA, capacidade antioxidante, stress oxidativo e oxigenação tecidual, são conhecidas por causar um estímulo doloroso (Mehta et al., 2013; Z.-Q. Wang et al., 2004; Yam et al., 2018), sendo importante encontrar e catalogar alterações nos parâmetros bioquímicos que possam ser utilizados como elemento diferenciador, auxiliando no correto diagnóstico e na prescrição de uma terapêutica eficaz, reduzindo o sofrimento dos pacientes e os custos associados à patologia.

1.3. Stress oxidativo e fibromialgia

O oxigénio é o aceitador final de eletrões na cadeia transportadora de oxigénio do metabolismo aeróbio (Radak et al., 2013) e, como tal, trata-se de uma molécula essencial a organismos aeróbios. No entanto, o oxigénio molecular (O_2) é tóxico para os sistemas vivos, pois é uma molécula muito reativa, o que se deve à estrutura atómica e molecular - cada átomo de oxigénio tem um eletrão desemparelhado na sua camada de valência, pelo que, o oxigénio molecular tem dois eletrões desemparelhados, como tal, o oxigénio atómico é um radical livre e o oxigénio molecular é um bi-radical (Davies, 1995).

Na cadeia respiratória, responsável pela geração de energia, principalmente na forma de gradiente eletroquímico de protões e que sustenta a produção de ATP (adenosina trifosfato) (Cordero et al., 2010), levada a cabo nas mitocôndrias, cerca de 85% do O_2 está envolvido no mecanismo de produção energética, que tem como subprodutos as espécies reativas de oxigénio (ROS) que incluem espécies com eletrões desemparelhados, denominadas radicais

livres como o anião superóxido, O_2^- , e radical hidroxilo, OH^- , e compostos da família do oxigénio como o peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , produzido quando o O_2 é reduzido (Ji et al., 1998). Só é possível a existência de seres aeróbios, que recorrem ao O_2 como aceitador final de eletrões nos processos de obtenção de energia, graças ao desenvolvimento de mecanismos antioxidantes, sistemas de deleção dos subprodutos da respiração (Halliwell & Gutteridge, 2015). Em baixas concentrações, as ROS são importantes mensageiros celulares pois estão envolvidas em vias de sinalização importantes, na atividade bactericida dos fagócitos e nas vias de transdução de sinal, regulando o crescimento celular e o estado REDOX (Gomez-Cabrera et al., 2015), no entanto, a acumulação de ROS induz danos lipídicos, proteicos e nos ácidos nucleicos conduzindo a alterações moleculares que podem estar na origem do desenvolvimento de diversas patologias, sendo por isso crucial a existência de mecanismos fisiológicos de deleção destas substâncias (Cordero et al., 2010; Davies, 1995).

Fatores ambientais podem causar alterações metabólicas que aumentam a produção de ROS ou, por outro lado, diminuem a atividade antioxidante levando à acumulação de ROS e, consequentemente ao stress oxidativo, consequência da perda do equilíbrio entre a produção e a deleção destas substâncias. A medição bioquímica de ROS baseia-se principalmente na análise indireta dos subprodutos do stress oxidativo como o malondialdeído (MDA), consequência de peroxidação lipídica devida ao ataque das ROS às membranas plasmáticas, os carbonilos proteicos oriundos da oxidação proteica devido ao ataque das ROS às proteínas, entre outros (Ashton et al., 1998).

Associados à rutura celular consequente da peroxidação lipídica, derivada da acumulação de ROS, estão processos inflamatórios verificando-se um aumento da expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 devido ao extravasamento do conteúdo intracelular para o meio externo levando à inflamação, na base da nociceção exacerbada. Os níveis de MDA interferem na cadeia respiratória de eletrões levada a cabo nas cristas mitocondriais e a enzima superóxido dismutase (SOD) tem a capacidade de neutralizar a toxicidade do MDA. Uma vez diminuída a atividade da SOD, verifica-se a acumulação de MDA e dos respetivos danos.

Em circunstâncias normais, o estado REDOX da célula e do espaço extracelular encontram-se em equilíbrio. A exposição a situações indutoras de stress exacerbado, como situações traumáticas, leva à perda do equilíbrio entre a produção de ROS, produto do

metabolismo energético celular, e a capacidade antioxidante, responsável pela deleção das ROS produzidas e, como tal, essencial para a manutenção do equilíbrio REDOX, o que poderá estar na origem das alterações observadas no funcionamento do SNA em pacientes com fibromialgia (Hendrix et al., 2020). Estudos anteriores demonstraram uma relação entre o stress oxidativo e a nociceção em fibromialgia (Bagis et al., 2005; Cordero et al., 2009; Hendrix et al., 2020; Z.-Q. Wang et al., 2004).

No estudo de Altindag e Celik, onde foram envolvidos 21 pacientes diagnosticados com fibromialgia e igual número de indivíduos saudáveis (grupo controlo), foi demonstrada uma capacidade antioxidante total (TAC) plasmática, que reflete o estado antioxidante do plasma, inferior no grupo dos doentes comparativamente com os controlos e um nível total de peróxidos no plasma superior, indicando diferenças no que respeita ao estado REDOX entre indivíduos com a patologia e indivíduos saudáveis (Altindag & Celik, 2006). Bazzichi e colegas desenvolveram um estudo em 2009 no qual avaliaram o proteoma salivar de 22 doentes com fibromialgia e de 26 indivíduos saudáveis detetando uma expressão de proteínas como a transaldolase, enzima da fase não oxidativa da via das pentoses-fosfato envolvida na geração de nicotinamida adenina dinucleotido fosfafo reduzido (NADPH), mais elevada nos pacientes do que nos indivíduos saudáveis revelando diferenças na expressão proteica salivar ou na regulação da secreção, entre indivíduos doentes e saudáveis (Bazzichi et al., 2009).

Em fibromialgia existem evidências de stress oxidativo (Altindag & Celik, 2006; Bazzichi et al., 2009; Cordero et al., 2010; Hendrix et al., 2020; Sánchez-Domínguez et al., 2015), como um aumento na expressão de marcadores de danos causados por stress oxidativo tais como os níveis de MDA e os níveis de carbonilos proteicos (Cordero et al., 2009) bem como o estado oxidante total (Adığüzel et al., 2022). Tem-se vindo a observar uma atividade diminuída da catalase, da glutationo peroxidase (GPx) (Fatima et al., 2017), ambas enzimas capazes de converter o H_2O_2 em H_2O e da SOD (Bagis et al., 2005), enzima que catalisa a conversão do O_2^- em O_2 e H_2O_2 , em indivíduos com fibromialgia, indicando uma capacidade antioxidante reduzida comparativamente com indivíduos saudáveis, o que poderá estar na origem do stress oxidativo, comum nestes doentes. A TAC tem sido descrita como significativamente inferior em pacientes com fibromialgia, (Altindag & Celik, 2006).

1.3.1. Stress oxidativo e nociceção

Múltiplos fatores anormais, como deficiência no metabolismo energético, disfunção mitocondrial, sobrecarga de íões e stress oxidativo podem conduzir a um processo de excitação neuronal aberrante que pode ser traduzido em dor (Mehta et al., 2013).

Existem evidências de que o stress oxidativo está envolvido no aumento da percepção da dor (Adığüzel et al., 2022; Z.-Q. Wang et al., 2004) resultando em hiperalgesia, sensação de dor exacerbada, mediada por mecanismos oxidantes locais e espinhais devido à acumulação de ROS nos tecidos. As ROS, ao reagirem com as moléculas circundantes, provocam a libertação de mediadores pró-inflamatórios, responsáveis pela sensação de dor. A Figura 2 ilustra a possível função de uma ROS, neste caso do $O_2^{\cdot-}$, na nociceção.

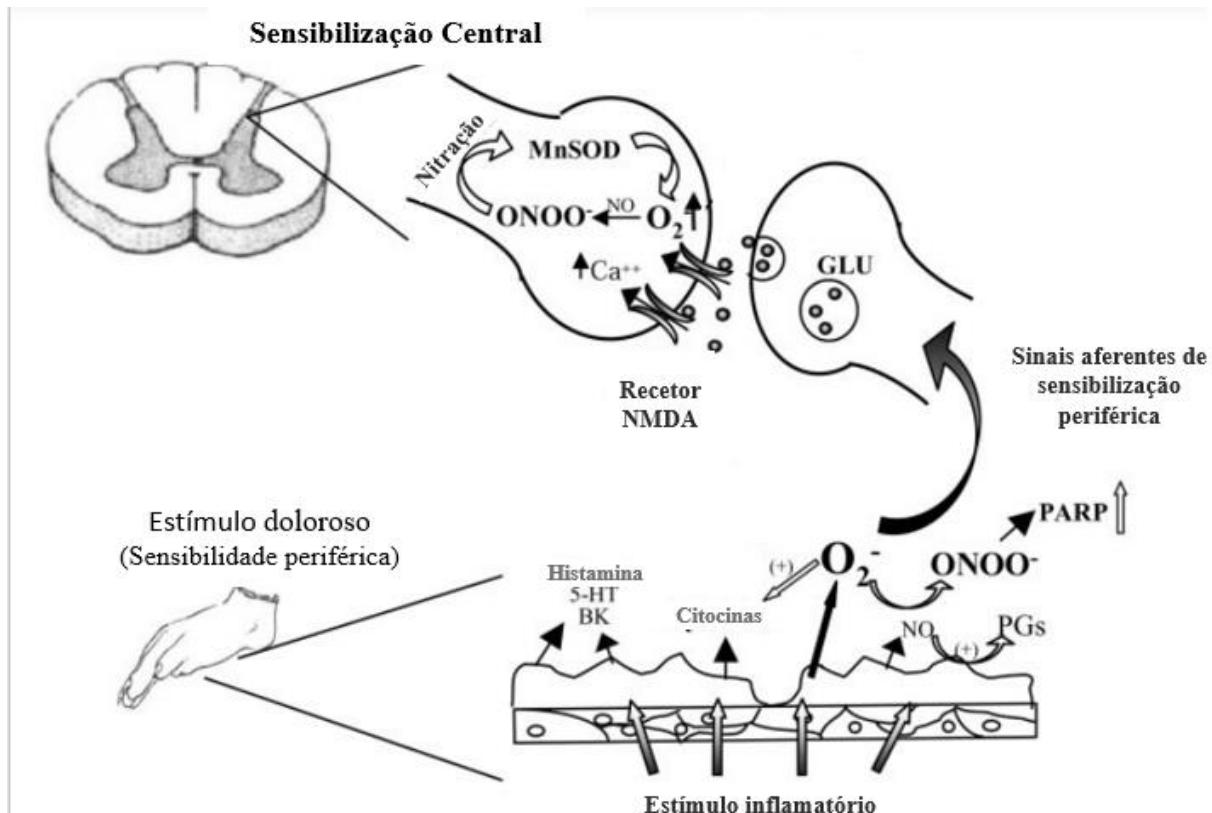


Figura 2 - Proposta explicativa da função sinalizadora do anião superóxido na via da dor. A hiperalgesia inflamatória aguda, evocada por estímulos inflamatórios, libera uma variedade de mediadores pro-inflamatórios e pro-nociceptivos como prostaglandinas (PGs), bradiquininas (BK), serotonina (5-HT), histamina, óxido nítrico (NO) e citocinas como TNF- α , IL-1 β , e IL-6 bem como anião superóxido, que desempenha um papel importante no desenvolvimento da dor através da sensibilização periférica. O $O_2^{\cdot-}$ libertado ao nível da espinal medula, provavelmente em resposta ao glutamato, interage com o NO para formar peroxinitrito (ONOO $^{\cdot-}$) o qual inativa a MnSOD na espinal medula. Como consequência, os níveis de $O_2^{\cdot-}$ mantêm-se elevados mantendo-se o estímulo nociceptivo. Adaptado de Wang et al (2004), A newly identified role for superoxide in inflammatory pain.

As ROS em excesso desempenham um papel importante no desenvolvimento da dor através da sensibilização periférica e da peroxidação lipídica (Z.-Q. Wang et al., 2004), consequência do stress oxidativo.

Nos doentes com fibromialgia, a capacidade antioxidantre encontra-se reduzida, o que culmina na perda do equilíbrio REDOX e, consequentemente, na acumulação de ROS, ocorrendo danos resultantes de stress oxidativo. Como tal, é comum existirem no organismo destes doentes mais processos de inflamação derivados do stress oxidativo. Uma mais baixa atividade da SOD, frequente nestes indivíduos (Bagis et al., 2005), pode estar envolvida na hiperalgesia uma vez que se trata de uma enzima que mantém a reatividade do anião superóxido, O_2^- , que tem um papel particularmente significativo na nociceção (Beckman et al., 1990), controlada em circunstâncias normais (Z.-Q. Wang et al., 2004). Quando a produção do anião superóxido excede a capacidade da atividade da SOD ou esta última diminui, permitindo a acumulação desta ROS, dão-se danos nas células endoteliais, aumento da permeabilidade microvascular (Szabo et al., 1991), libertação de citocinas (Matata & Galiñanes, 2002; Préville et al., 1999), recrutamento de neutrófilos até ao local da inflamação (Boughton-Smith et al., 1994; Préville et al., 1999), danos no ácido desoxirribonucleico e libertação de MDA como produto final da peroxidação lipídica, sendo por isso utilizado como marcador de danos causados por ROS em moléculas lipídicas (Draper & Hadley, 1990).

1.3.2. Stress oxidativo e depressão

Um outro sintoma muito comum em doentes com fibromialgia é a depressão. Fuller-Thomson e os colegas relataram uma maior taxa de depressão em doentes com fibromialgia (22,2%) do que em indivíduos sem esta patologia (7,1%) numa comunidade do Canadá (Fuller-Thomson et al., 2012), como já tinha sido reportado em 1995 por Wolf e os seus colegas (Wolfe et al., 1995).

A grande incidência depressiva nos doentes com fibromialgia, para além de se tratar de uma patologia que leva a uma grande perda na qualidade de vida dos pacientes, o que, por si só se traduz numa sensação depressiva, relaciona-se com elevadas quantidades de ROS, já que a acumulação destas moléculas potencia o surgimento da depressão.

O cérebro é um dos órgãos mais vulneráveis aos efeitos nocivos das ROS devido à sua elevada taxa metabólica oxidativa (Bajpai et al., 2014; Evans, 1993) e ao baixo nível de

enzimas antioxidantes (Evans, 1993; Ozgocmen et al., 2006) pois, apesar da abundante oxidação no tecido cerebral, a atividade da catalase e da GPx são mínimas em comparação com outros tecidos, dificultando a eliminação de ROS (Evans, 1993). A acumulação de ROS no tecido cerebral leva a que estas substâncias interfiram na estrutura e proporção dos ácidos gordos poli-insaturados provocando a perda de fluidez das membranas biológicas. Como resultado destas alterações, as membranas biológicas induzem a produção de citocinas, mediadores inflamatórios. Por outro lado, a elevação do MDA induz a fosfolipase A2, o que altera as funções do receptor nas membranas celulares, induz células imunes e leva à secreção de interleucinas por parte das células T (Bilici et al., 2001). As alterações na fluidez das membranas podem influenciar a função dos receptores de serotonina. A peroxidação lipídica desempenha um papel importante na depressão, já que reduz diferentes inibidores seletivos da recaptação da serotonina (Bilici et al., 2001). O MDA tem um efeito inibidor nestes receptores (Britt et al., 1992).

1.4. Exercício físico e sua relevância na fibromialgia

Por definição, o exercício consiste na execução de “movimentos corporais planeados, estruturados e repetitivos para melhorar ou manter um ou mais componentes da aptidão física” (Howley, 2001). O tecido muscular esquelético é o principal responsável pelos movimentos corporais e, como tal, está continuamente exposto a flutuações REDOX inerentes à sua função (Altindag & Celik, 2006). Estima-se que durante a contração muscular máxima, o consumo de oxigénio pelas fibras musculares locais possa atingir até 100 vezes os níveis de repouso, enquanto o consumo de oxigénio em todo o corpo aumenta cerca de 15 vezes (Ashton et al., 1998).

1.4.1. Tecido muscular esquelético em fibromialgia

O tecido muscular esquelético, representado esquematicamente pela Figura 3, sendo o principal responsável pela locomoção, é bastante irrigado. O parênquima muscular é composto por fibras musculares, células que têm a capacidade de contrair quando a acetilcolina (Ach), libertada pelos neurónios motores para a placa neuromotora, se liga aos respetivos receptores nicotínicos (ionotrópicos) no sarcolema gerando um potencial de ação (Figura 3 B). Este potencial de ação, ao atravessar os túbulos T, causa a liberação de Ca^+ do

retículo sarcoplasmático que se irá ligar às troponinas dos filamentos de actina das fibras musculares alterando a conformação da tropomiosina de modo a que os sítios ativos da actina fiquem expostos, permitindo que a miosina se ligue aos sítios ativos da actina, processo que depende da hidrólise de ATP a adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) (Figura 3 C). Assim, a actina vai deslizar sobre a miosina, originando a contração muscular. Para que o tecido muscular volte ao estado de relaxamento, é necessária outra molécula de ATP que quebrará a ponte entre a miosina e a actina. Esta molécula de ATP é então hidrolisada para permitir que o ciclo se repita enquanto a fibra muscular recebe o sinal motor. As fibras musculares são então ricas em mitocôndrias, dadas as exigências de oxigenação inerentes à sua principal função. Como tal, o conteúdo do tecido muscular em mitocôndrias está associado à capacidade física e, uma das adaptações do tecido muscular esquelético à prática de exercício físico regular, é a biogénese deste organito nas fibras musculares, de modo a que seja produzida mais ATP, aumentando a capacidade de contração muscular.

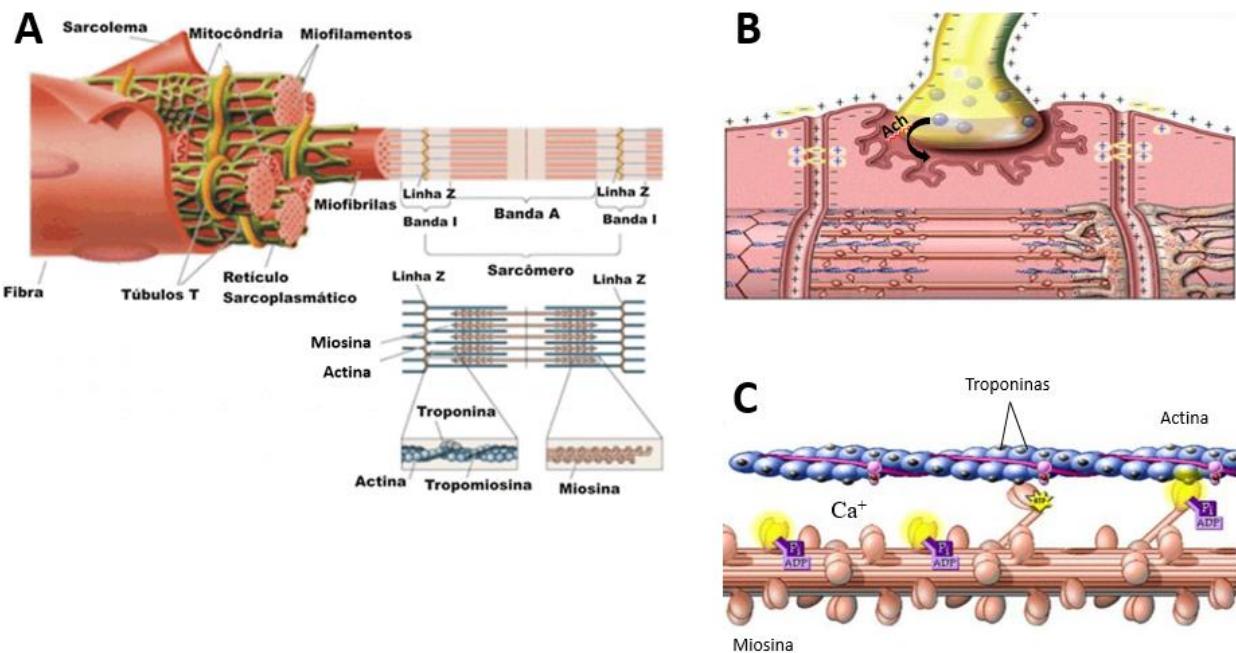


Figura 3 - Representação esquemática do tecido muscular. A – Representação fisiológica do tecido muscular; B – Propagação do potencial de ação através dos túbulos T; C – Ligação dos filamentos de miosina ao sítio ativo das troponinas nos filamentos de actina. Adaptado do sítio Só Biologia: Músculo e exercícios em Virtuous Tecnologia da Informação (2008-2022).

A diminuída força de contração muscular (50 a 60% comparativamente com indivíduos saudáveis) (E. Lund et al., 2003) e a baixa capacidade para realizar exercício sentida pelos pacientes com fibromialgia podem estar associadas às diferenças encontradas no

tecido muscular entre indivíduos doentes e saudáveis, nomeadamente na microcirculação, no volume de mitocôndrias, no aporte de oxigénio, essenciais para que este tecido desempenhe as suas funções. Biópsias musculares, com o músculo em repouso, provenientes de pacientes com fibromialgia demonstraram níveis reduzidos de ATP neste tecido (E. Lund et al., 2003).

Comparativamente com indivíduos sedentários saudáveis, os pacientes com fibromialgia têm um afluxo sanguíneo muscular reduzido durante o exercício (Strobel et al., 1997), dificultando a capacidade de realização de esforço físico. Lund e os colegas realizaram um estudo no qual submeteram pacientes com fibromialgia a diferentes intensidades de exercício e verificaram que nos pacientes o consumo máximo de oxigénio é inferior comparativamente com o grupo controlo, até mesmo em repouso (E. Lund et al., 2003).

A microcirculação do tecido muscular é controlada por metabolitos produzidos localmente, pelo sistema nervoso e fatores humorais (Bengtsson, 2002). Nos pacientes com fibromialgia existem alterações na microcirculação bem como valores de pressão de oxigénio tecidual patológicos (N. Lund et al., 1986) que levam à hipoxia no tecido muscular, traduzindo-se em estímulos dolorosos porque a hipoxia, em conjunto com o movimento muscular, causa dor e depleção energética (Bengtsson, 2002). Uma diminuição da ATP vai prejudicar a função muscular. No entanto, Strobel e os colegas observaram que em regiões nas quais o tecido muscular se encontrava rígido nos pacientes com fibromialgia, existia uma maior tensão de oxigénio comparativamente com zonas em que o tecido muscular se encontrava relaxado, bem como um pH mais alcalino e uma maior concentração de fosfato inorgânico comparativamente com indivíduos saudáveis (Strobel et al., 1997), o que poderá indicar uma contração muscular involuntária constante, congruente com alteração a nível do SNC.

Lindh e os colegas avaliaram biópsias do músculo *Vastus lateralis* de doentes com fibromialgia e de indivíduos controlo saudáveis não tendo sido observadas alterações histopatológicas macroscópicas nem diferenças na composição das fibras. No entanto, descobriram que nos doentes com fibromialgia existe uma menor densidade capilar, que corresponde ao número de capilares por fibra e por mm², e que o tecido muscular dos doentes apresenta níveis diminuídos de 3-hidroxi-CoA-desidrogenase, importante enzima responsável pela β-oxidação mitocondrial dos ácidos gordos de cadeia longa como fonte de energia e de citrato sintase, transferase mitocondrial responsável por controlar o primeiro passo do ciclo de Krebs (Lindh et al., 1995).

Também foram encontradas diferenças na estrutura dos capilares sanguíneos musculares nos pacientes com fibromialgia num estudo levado a cabo por Lindeman e colaboradores que, recorrendo a microscopia eletrónica e análise morfométrica a biópsias do músculo trapézio (um músculo naturalmente pouco rico em mitocôndrias) de pacientes e de indivíduos saudáveis, detetaram uma maior área e espessura do endotélio capilar no grupo dos pacientes com fibromialgia comparativamente com o grupo controlo (Lindman et al., 1995). Este estudo evidenciou que nestes doentes, além de existir uma menor área de capilares sanguíneos, estes são morfologicamente diferentes, comprometendo o suprimento sanguíneo e, consequentemente, a oxigenação tecidual, prejudicando a geração de energia sob a forma de ATP, necessária à contração muscular. As alterações capilares nos pacientes com fibromialgia podem ser secundárias a distúrbios na microcirculação muscular causando hipóxia localizada que se traduz num aumento do stress oxidativo e da dor.

Em diversos estudos que recorreram a métodos histoquímicos e histopatológicos, foram detetadas fibras vermelhas musculares (ricas em mioglobina e de contração lenta) irregulares em pacientes com fibromialgia, (Bengtsson et al., 1986; E. Lund et al., 2003; Staud & Rodriguez, 2006). Fibras musculares com estas características são frequentemente encontradas em doenças crónicas neuromusculares (Bengtsson, 2002). O surgimento das fibras musculares irregulares está associado a um insuficiente aporte sanguíneo e poderá ser consequência da hipoxia que advém da diminuída densidade e das alterações morfofisiológicas dos capilares sanguíneos. No entanto, no estudo de Bengtsson e colegas não foram encontradas diferenças na densidade dos capilares (Bengtsson et al., 1986).

Investigações recorrendo a espetroscopia de ressonância magnética nuclear ^{31}P têm vindo a demonstrar que os pacientes com fibromialgia apresentam um potencial de fosforilação e capacidade oxidativa total significativamente inferiores no músculo, quer em repouso, quer com a prática de exercício (E. Lund et al., 2003; Strobel et al., 1997).

Até ao momento, as biópsias musculares não evidenciaram alterações específicas para esta patologia, mas estão presentes, indicando que existem alterações morfofisiológicas que culminam em distúrbios na microcirculação que podem prejudicar o desempenho do tecido muscular destes doentes que podem estar na origem da sintomatologia. As alterações na microcirculação e/ou no metabolismo muscular podem sensibilizar os nociceptores musculares causando dor, fadiga e fraqueza muscular.

Apesar das diferenças, a capacidade dos doentes com fibromialgia em desenvolver força muscular é a mesma do que a de indivíduos saudáveis (Häkkinen et al., 2001; Valkeinen et al., 2006). Häkkinen e a equipa desenvolveram um estudo no qual foram envolvidas 21 mulheres com fibromialgia e 12 saudáveis com idades compreendidas entre os 33 e os 45, pré-menopausa, num programa de treino de força progressiva na função neuromuscular durante 21 semanas, com avaliação da percepção da sintomatologia. Demonstraram que, ao fim do programa de treino, as doentes com fibromialgia aumentaram a sua força máxima na mesma medida que o grupo controlo e que o treino beneficiou a fadiga, depressão e dor nas pacientes (Häkkinen et al., 2001). Valkeinen e os colegas, num estudo equivalente demonstraram resultados semelhantes mas em mulheres com idades superiores a 55 anos (Valkeinen et al., 2006), o que nos permite concluir que tanto mulheres mais jovens como com mais idade têm a capacidade de atingir os mesmos benefícios de saúde que advém do treino de força.

No entanto, os resultados dos estudos em tecido muscular dos pacientes são inconsistentes em relação às características histológicas e bioquímicas (Rooks et al., 2002). Por exemplo, Simms e os colegas verificaram que pacientes com fibromialgia e controlos apresentaram níveis semelhantes de $VO_{2\text{máx}}$ (consumo máximo de oxigénio) bem como de contração voluntária máxima dos músculos trapézio superior e tibial anterior (Simms et al., 1994). Os níveis de Pi e de pH intracelular nestes músculos não eram significativamente diferentes em pacientes com fibromialgia comparativamente com os controlos sedentários em repouso, durante o exercício ou na recuperação. Neste estudo, o metabolismo energético muscular na fibromialgia não é diferente comparativamente com controlos sedentários, o que não vai de encontro com o reportado nos outros estudos referenciados.

1.4.2. Efeitos do exercício físico no organismo saudável

A alteração biológica mais proeminente durante a prática de exercício físico trata-se do aumento da taxa metabólica com o aumento da taxa de respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa, já que o consumo de oxigénio pelo músculo esquelético e pelo miocárdio aumenta drasticamente devido à redistribuição do fluxo sanguíneo a estes tecidos para fazer face à necessidade de oxigenação que a prática física exige (Ashton et al., 1998). O aumento do fluxo de oxigénio induz a uma maior libertação de ROS devido à maior quantidade de moléculas de O_2 a ser decomposta nas cristas mitocondriais, pelo que, a concentração de ROS aumenta em alguns tecidos como resposta fisiológica ao exercício.

O tecido muscular esquelético tem a capacidade de se adaptar rapidamente em resposta ao exercício físico através da remodelação da expressão genética, modificando a sua estrutura celular com aumento do volume de mitocôndrias e dos mecanismos de defesa antioxidante (McArdle et al., 2002) para que se torne menos suscetível a lesões após a repetição do mesmo exercício. O organismo deteta a repetição do exercício, adaptando-se ao mesmo, através da diminuição da expressão do receptor de superfície celular dos leucócitos (Peake et al., 2005). A prática regular de exercício físico de intensidade moderada aumenta a variabilidade da frequência cardíaca, *Heart Rate Variability* (HRV) (Earnest et al., 2008), e está associada à diminuição do stress oxidativo e a melhorias na capacidade antioxidante (J.-S. Wang & Huang, 2005) como demonstrado por Ilhan Nevin e colegas que no seu estudo observaram uma redução dos produtos da peroxidação lipídica após programas de exercício intenso recorrente, por meio da ativação de sistemas antioxidantes (Ilhan et al., 2004) e pode, por isso, ser considerada como antioxidante por si só (Gomez-Cabrera et al., 2015; Meeus et al., 2013). David González e colegas avaliaram a TAC a partir de amostras de saliva recolhida a 24 participantes antes e após fazerem uma corrida de 10000 metros, verificando uma melhoria significativa após o exercício (González et al., 2008). Adriele V. Souza e colegas, num estudo feito em 2019, verificaram também uma melhoria na TAC após a prática de exercício físico de diferentes intensidades em saliva e em plasma colhidos a 30 participantes antes e após o exercício (Souza et al., 2019). Estes resultados demonstram que o exercício aeróbico provoca um aumento significativo na TAC, com um aumento da atividade das enzimas antioxidantes, o que reflete o aumento das defesas antioxidantes em resposta ao stress oxidativo induzido pelo exercício físico, diminuindo os marcadores de stress oxidativo.

Apesar de associadas ao stress oxidativo, as ROS são essenciais à adaptação do músculo esquelético ao exercício visto que ativam importantes vias de sinalização celular, como a biogénesis mitocondrial, a indução da defesa antioxidante endógena e a hipertrofia (Gomez-Cabrera et al., 2016) fazendo, por isso, parte do processo antioxidante ativado pela

prática de exercício físico. A Figura 4 sumariza a importância das ROS para o funcionamento das fibras musculares e a atividade inibidora de antioxidantes.

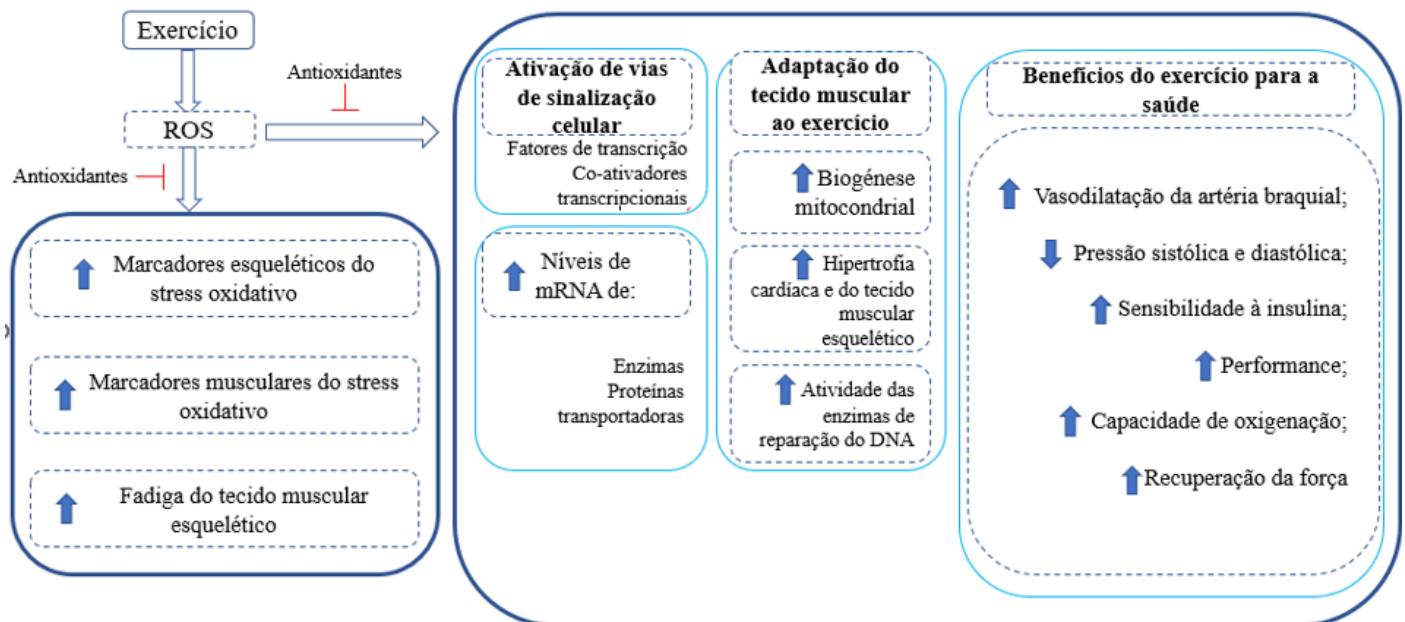


Figura 4 - Efeito da administração de antioxidantes no exercício físico. As ROS em excesso induzidas pela prática de atividade física causam danos musculares, fadiga e stress oxidativo. No entanto, são essenciais porque atuam como moléculas sinalizadoras e medeiam as respostas adaptativas à prática de atividade física que advém dos efeitos cumulativos de exercícios repetidos. Ao inibir as ROS deixam de ocorrer: a ativação de vias de sinalização celulares importantes; a adaptação do tecido muscular ao exercício; alguns benefícios para a saúde derivados do exercício. Adaptado de Gomez-Cabrera MC et al (2015). Redox modulation of mitochondrion genesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training?.

No entanto, a prática de exercício físico pode ter efeitos nefastos. Por exemplo, indivíduos que praticam exercício físico extenuante correm maiores riscos de vir a sofrer com infecções do trato respiratório superior (Heath et al., 1991; Novas et al., 2003; Peters & Bateman, 1983) comparativamente a indivíduos que praticam exercício moderado ou sedentários, uma vez que esta prática leva à supressão imunitária, que normalmente dura entre 3 a 24h após o exercício (Gleeson et al., 2001), deixando uma “janela aberta” para o desenvolvimento de infecções.

A prática de exercício físico extenuante causa distúrbios na homeostase intracelular devido à maior libertação de ROS e, se a libertação destas moléculas ultrapassar a capacidade antioxidante celular, ocorre stress oxidativo (Davies, 1995). Tony Ashton e os colegas avaliaram a produção de ROS e a peroxidação lipídica (níveis de MDA) no sangue venoso de 12 voluntários saudáveis antes e após uma sessão de exercício exaustivo em bicicleta estática bem como a TAC, observando o maior aumento nas ROS pós-exercício nos indivíduos com

o maior $VO_{2\max}$, aumento dos níveis de MDA após o exercício e aumento da TAC não significativo (Ashton et al., 1998), como também já tinha sido reportado num estudo levado a cabo por R. Lovlin e colegas em 1987. Neste estudo verificou-se uma diminuição significativa (10,3%) no MDA plasmático com um $VO_{2\max}$ a 40% (intensidade moderada) mas, com um $VO_{2\max}$ a 70% (elevada intensidade) o MDA plasmático evidenciou que há uma tendência crescente nos níveis de MDA com o aumento da intensidade do esforço, já na exaustão, o MDA plasmático e o lactato foram significativamente mais elevados comparativamente com os valores obtidos em repouso (Lovlin et al., 1987).

Recorrendo ao método de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrónica (EPR), técnica de deteção de radicais livres, Jackson e a sua equipa relataram um aumento de 70% nos sinais de EPR no músculo em contração estimulado eletricamente em comparação com os controlos em repouso (Jackson et al., 1985). Kumar e os colegas detetaram um aumento de ROS no miocárdio após uma sessão aguda de exercício exaustivo em ratos e que a suplementação de vitamina E, um antioxidante, atenuou a produção de ROS (Kumar et al., 1992). Esses estudos evidenciam que o exercício físico promove o aumento da geração de ROS.

Os parâmetros fisiológicos e bioquímicos dependem do tipo, da intensidade e da duração do exercício físico (Ashton et al., 1998; Burton et al., 2004; A. J. Busch et al., 2011; Hargreaves & Spriet, 2020; Leaf et al., 1997; Shi et al., 2007; Souza et al., 2019) pelo que, a intensidade, tipo e duração da prática desportiva são fatores a ter em conta no que respeita à avaliação do estado REDOX.

Estudos demonstram um aumento da concentração total proteica e da atividade da α -amilase, ambos marcadores da intensidade do exercício físico, logo após a prática de exercício muito intenso (Bortolini et al., 2009; Li & Gleeson, 2004; Ligtenberg et al., 2015; Souza et al., 2019; Walsh et al., 1999) embora isso não se verifique após a prática de exercício de intensidade moderada (Ligtenberg et al., 2015).

A resposta do organismo à prática de exercício físico também depende do nível de treino em que se encontra o indivíduo, uma vez que as alterações do estado REDOX em indivíduos sedentários são muito mais acentuadas comparativamente com indivíduos fisicamente ativos (Cipryan, 2018; Peres et al., 2021) porque nestes últimos o seu tecido muscular já se encontra adaptado ao maior aporte sanguíneo exigido pela prática desportiva.

São reportados menores parâmetros de stress oxidativo em indivíduos treinados do que em indivíduos sedentários, quer em repouso, quer após a prática de exercício físico (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). A menor vulnerabilidade aos danos resultantes do stress oxidativo induzido pelo exercício observada nos indivíduos que treinam regularmente deve-se a mecanismos de adaptação, como a ativação dos sistemas antioxidantes, a atividade de enzimas como a catalase, a GPx, a SOD, de sistemas de recuperação de danos resultantes do stress oxidativo mediados pelo aumento da produção de ROS e às alterações morfológicas do tecido muscular que diminuem a produção de ROS, alterações estas que ocorrem em resposta ao stress oxidativo durante a fase de recuperação (Gomez-Cabrera et al., 2016).

O exercício físico ativa o ramo simpático do SNA devido à estimulação dos centros motores do cérebro e aos impulsos aferentes dos músculos em atividade (Kjaer et al., 1987), sendo considerado um indutor de stress. Ao avaliar a resposta dos indivíduos a uma prova de esforço físico, a partir da análise de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, é possível inferir acerca da modulação autónoma e do estado REDOX, detetando anomalias, caso presentes.

1.4.3. Efeitos do exercício físico em doentes com fibromialgia

Uma vez que o exercício físico regular de intensidade moderada melhora a oxigenação do tecido muscular esquelético levando à diminuição da sensibilização central e da nociceção (Sarıfakioğlu et al., 2014), têm-se vindo a investigar os efeitos psicofisiológicos positivos do exercício nos pacientes com fibromialgia, com vista a aplicar a prática de exercício físico como potencial tratamento.

A partir de avaliações fisiológicas, como a medida da HRV, que pode ser utilizada como um indicador de stress (De Vito et al., 2002), é possível determinar uma hiper-reactividade do ramo simpático do sistema nervoso autónomo, característica frequente em indivíduos com esta patologia, mesmo em condições basais, indicando uma alteração no funcionamento do SNA nesses pacientes (Staud, 2008).

A resposta psicofisiológica dos doentes com fibromialgia à prática de exercício físico comparativamente com indivíduos saudáveis apresenta também outras diferenças significativas, nomeadamente no que respeita à resposta vascular periférica, como foi demonstrado num estudo de caso-controlo por Suárez et al em 2021, no qual uma paciente com fibromialgia e um indivíduo saudável do mesmo sexo e idade foram submetidas a um

protocolo de fadiga muscular de elevada intensidade revelando uma maior frequência cardíaca e uma temperatura da mão inferior na paciente quer no momento basal, quer após a prova de esforço (Suárez et al., 2021).

Como o exercício físico altera o estado REDOX em indivíduos saudáveis e em pacientes (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009; Hendrix et al., 2020), a aplicação de um momento de exercício intenso em indivíduos sedentários com fibromialgia leva à diminuição da capacidade antioxidant, com uma atividade reduzida da catalase, da superóxido dismutase e de enzimas envolvidas no metabolismo do glutationo e provoca um aumento da expressão de marcadores de stress oxidativo (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009) mais acentuada comparativamente com indivíduos saudáveis.

Estas alterações, provavelmente, devem-se ao facto de os parâmetros mensurados se encontrarem já alterados nos pacientes no estado basal comparativamente com indivíduos saudáveis (Sarıfakıoğlu et al., 2014; Shukla et al., 2020; Soliman et al., 2016; Suárez et al., 2021) demonstrando uma capacidade de resposta ímpar, por parte destes à exposição a indutores de stress, o que revela alterações na modulação do SNA e no estado REDOX, comuns nestes pacientes. Tem-se vindo a verificar uma reduzida capacidade de resposta do SNA destes doentes a provas de esforço físico (Suárez et al., 2021), indicando uma reduzida capacidade de resposta a indutores de stress.

Os pacientes com fibromialgia conseguem praticar exercício moderado e até vigoroso (Inanıcı et al., 2011), no entanto, apresentam uma baixa tolerância aeróbia bem como reduzida flexibilidade e resistência muscular dinâmica (Sarıfakıoğlu et al., 2014), tendo uma performance física muito inferior comparativamente com indivíduos saudáveis (Jones et al., 2010; Mannerkorpi et al., 1994). Como tal, sentem muita dificuldade ao iniciar programas regulares de exercício físico. A baixa capacidade muscular pode estar na origem da menor resistência existente nos doentes com fibromialgia (E. Lund et al., 2003).

Antes de o organismo se adaptar às alterações que o exercício induz, os sintomas da patologia são assoberbados e dificultam a prática de exercício (Altindag & Celik, 2006; A. J. Busch et al., 2011).

Com a prática de exercício físico aeróbio regular, verificam-se melhorias na sintomatologia (A. J. Busch et al., 2011; Dinler et al., 2009; Valim et al., 2003) bem como nos parâmetros bioquímicos, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantas (catalase e

glutatônio peroxidase) e a diminuição da presença de marcadores de stress oxidativo (carbonilos proteicos, óxido nítrico, malondialdeído) em pacientes com fibromialgia.

No entanto, também nos pacientes, diferentes tipos de exercício levam a diferentes resultados (Häuser et al., 2010), como exemplo, o estudo de Valim e os colegas levado a cabo em 2003, demonstrou que as pacientes com fibromialgia que efetuaram o programa de exercício de alongamento não demonstraram melhorias no sintoma de depressão, ao contrário das que efetuaram o programa de exercício aeróbio (Valim et al., 2003).

Dadas as evidências de que a prática regular de exercício físico de intensidade moderada traz benefícios, têm-se efetuado diversos estudos com o objetivo de avaliar os seus efeitos psicofisiológicos em pacientes com fibromialgia. Os efeitos benéficos do exercício podem estar associados ao aumento do aporte sanguíneo, melhorando a oxigenação tanto ao nível cardiopulmonar como ao nível muscular (Dinler et al., 2009), melhorando a sintomatologia.

Clinicamente, o exercício é administrado em conjunto com outros tratamentos projetados para controlar os sintomas em pacientes com fibromialgia, incluindo fármacos (antidepressivos, relaxantes musculares, analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides), programas de educação e de autogestão e estratégias de gestão da ansiedade (Goldenberg et al., 2004).

McCain e os colegas foram pioneiros no estudo dos efeitos do exercício na sintomatologia da fibromialgia. Demonstraram, pela primeira vez (A. J. Busch et al., 2011), os benefícios do exercício físico na sintomatologia da fibromialgia num estudo no qual 20 pacientes realizaram exercícios de flexibilidade e 18 realizaram exercícios cardiovasculares durante 20 semanas ao fim das quais se verificou que o grupo de pacientes submetido ao exercício cardiovascular melhorou significativamente os seus parâmetros de *fitness* cardiovascular e a sintomatologia comparativamente com o grupo submetido ao exercício de flexibilidade (McCain, 1986; McCain et al., 1988).

O interesse em examinar o efeito do exercício nos doentes com fibromialgia tem aumentado nas últimas décadas e a pesquisa apoia que a modalidade mais benéfica para este efeito é o exercício aeróbio praticado regularmente (A. J. Busch et al., 2011; Häuser et al., 2010; Rooks et al., 2002) na medida em que melhora a capacidade aeróbia, a microcirculação muscular, os parâmetros bioquímicos bem como a sintomatologia (Dinler et al., 2009;

Kingsley et al., 2010; McCain et al., 1988; Soliman et al., 2016) e o estado de espírito (Gowans et al., 2001). O treino aeróbio aumenta o consumo de oxigénio e a microcirculação no tecido muscular melhorando a sua capacidade e diminuindo a intensidade da dor e a fadiga (Dinler et al., 2009; Martin et al., 1996; Mengshoel et al., 1992; Rooks et al., 2002; Wigers et al., 1996), o treino aeróbio de resistência melhora a força muscular (Kingsley et al., 2010; Panton et al., 2009; Rooks et al., 2002), no entanto não induz alterações na HRV, como Kingsley e colegas descobriram (Kingsley et al., 2010). No estudo referenciado concluiu-se que a modulação autónoma foi semelhante em repouso e após o exercício de resistência aguda da perna entre mulheres com fibromialgia e as controlo saudáveis não havendo também diferenças antes ou depois do programa de treino de resistência. No que respeita à força muscular, as mulheres com fibromialgia apresentaram níveis de força máxima semelhantes aos do grupo controlo antes e após a intervenção. No entanto, há estudos que mostraram menor força muscular em mulheres com fibromialgia comparativamente com controlos antes do programa de exercício (Gowans et al., 2001; Häkkinen et al., 2001; Valkeinen et al., 2006).

A partir destas evidências foram efetuados mais estudos com o intuito de relacionar diferentes tipos e intensidade de exercício físico com a sintomatologia e com parâmetros físicos e bioquímicos.

Buckelew e os seus colegas, realizaram um estudo com o objetivo de comparar a eficácia do *biofeedback*/relaxamento, exercício e um programa combinado para o tratamento da fibromialgia. Para tal, recorreram a 119 doentes com fibromialgia e dividiram-nos em quatro grupos para que um dos grupos fizesse o *biofeedback*, o segundo o treino de exercício, o terceiro uma combinação de ambas as estratégias e o quarto grupo fosse submetido a um programa educacional. Concluíram que os três primeiros tratamentos induziram melhorias significativas e o quarto tratamento, de programa educacional, não apresentou melhorias (Buckelew et al., 1998).

Num estudo levado a cabo por Nørregaard e colegas não foi observado nenhum aumento anormal da creatina quinase ou mioglobina após uma prova de exercício de intensidade crescente em pacientes com fibromialgia, o que indica que as membranas musculares permaneceram intactas durante o exercício, o que leva a crer que o tecido muscular nos doentes com fibromialgia não é mais vulnerável a microtraumas do que o saudável (Nørregaard et al., 1994).

Soliman e os colegas avaliaram o estado antioxidant de doentes e de indivíduos saudáveis antes e após o cumprimento de um programa de exercício aeróbio e de força intensivo durante 12 semanas. Os investigadores avaliaram o stress oxidativo e a sua relação com os sintomas da patologia. No seu estudo, antes do início do programa de exercício, detetaram níveis plasmáticos de marcadores de stress oxidativo (carbonilos proteicos e MDA), significativamente mais elevados em pacientes com fibromialgia comparativamente com os controlos, evidenciando oxidação proteica e peroxidação lipídica, danos resultantes de stress oxidativo. Detetaram também uma reduzida TAC por avaliação da atividade da catalase e dos níveis de tióis plasmáticos nas pacientes com fibromialgia. Os investigadores descobriram que estes níveis estão significativamente correlacionados com o quadro clínico da doença, especialmente a dor. Após as 12 semanas de exercício, todos os parâmetros mensurados melhoraram significativamente (os marcadores de stress oxidativo diminuíram e os marcadores de atividade antioxidant aumentaram), bem como a sintomatologia, revelando que o programa de treino aplicado é eficaz (Soliman et al., 2016).

Os resultados do estudo referenciado foram congruentes com os do estudo de Sarıfakioğlu e colegas levado a cabo em 2014 de metodologia semelhante com 30 pacientes com fibromialgia e 23 controlos saudáveis (Sarıfakioğlu et al., 2014).

Os objetivos da atividade física e do treino físico são melhorar a aptidão e função físicas, reduzir os sintomas da fibromialgia otimizando a saúde e o bem-estar geral (A. J. Busch et al., 2011). Os pacientes com fibromialgia podem praticar exercício de forma a alcançar os efeitos do treino e ganhar benefícios a longo prazo.

Para que os resultados da prática de exercício se mantenham, é necessário que seja continuado, se se interromper o exercício, as melhorias perdem-se pois o efeito não é de longo prazo (Häuser et al., 2010; Martin et al., 1996; Rooks et al., 2002; Wigers et al., 1996).

Há que ter em conta o tipo de exercício, a intensidade e frequência a recomendar (Wigers et al., 1996) já que a intensidade do exercício é determinante crítica da magnitude do seu efeito e porque há o risco do exercício causar uma exacerbação dos sintomas e dor prolongada (Mengshoel et al., 1995). Exercício de baixa intensidade não consegue melhorar a dor, no entanto o de moderada intensidade já melhora substancialmente este sintoma (Häuser et al., 2010). Também é necessário ter em conta a duração do programa de exercício. No estudo efetuado por Alentorn-Geli que envolveu um programa de exercício feito duas vezes

por semana durante 6 semanas, verificou-se que o exercício por si só não induz a melhorias significativas (Alentorn-Geli et al., 2008).

As melhorias induzidas pelo exercício podem ser atribuídas à maior oxigenação tecidual, nomeadamente ao nível muscular, bem como no aumento da ATP e na adaptação do organismo ao treino regular.

Parece também haver uma associação entre o exercício físico e os mecanismos do processamento da dor do SNC, como demonstrado no estudo de McLoughlin e colegas, no qual demonstraram uma associação significativa entre o exercício físico e a diminuição da percepção da dor em pacientes com fibromialgia. Os investigadores observaram uma relação positiva entre o exercício e a resposta cerebral à dor no córtex dorso-lateral pré-frontal, no córtex cingulado posterior e ínsula posterior, regiões importantes na regulação da dor de pacientes com fibromialgia e uma relação negativa para os córtex sensorial primário e parietal superior, regiões implicadas nos aspectos sensoriais da dor (McLoughlin et al., 2011).

1.5. Biomarcadores em fibromialgia

O *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América, em 2001, definiu biomarcadores como sendo “características que podem ser objetivamente mensuradas e avaliadas como uma indicação de processos normais ou patogénicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (“Biomarkers and Surrogate Endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework.,” 2001). Por vezes, o resultado da medição de um parâmetro biológico que possa ser considerado biomarcador não representa a sua verdadeira bioatividade, pelo que, para inferir sobre um estado fisiológico ou patológico é preferível recorrer a mais do que um biomarcador.

Têm-se vindo a verificar alterações consistentes na expressão de diferentes moléculas entre os doentes com fibromialgia e indivíduos saudáveis tais como em marcadores de atividade do SNA, como a HRV, o fluxo salivar, a atividade da enzima α -amilase salivar e a concentração proteica total bem como marcadores da capacidade antioxidante como a atividade das enzimas catalase, GPx, SOD e marcadores de stress oxidativo, que refletem a perda do balanço entre a atividade antioxidante e a produção de ROS. Os avanços no conhecimento acerca desta patologia têm permitido avaliar diferentes moléculas com valor de diagnóstico.

As alterações moleculares observadas nos doentes podem ser utilizadas para auxiliar o diagnóstico da fibromialgia ao relacionar a diferente expressão de determinadas moléculas com os sintomas, distinguindo indivíduos doentes dos saudáveis.

1.5.1. Biomarcadores da atividade do sistema nervoso autónomo

1.5.1.1. Variabilidade da frequência cardíaca - HRV

A função do coração, composto por células musculares cardíacas, miocárdio, é bombear o sangue para todo o corpo e é controlado pelo SNA. Como tal, a sua atividade é cíclica e ilustrada sob a forma de ondas em eletrocardiogramas (ECG), representado pela Figura 5 A. O ECG é, portanto, um espelho da atividade elétrica do coração, dependente dos estímulos simpato-vagais cuja avaliação permite a observação da velocidade de condução entre aurículas e ventrículos (intervalo P-R), da frequência de despolarização arterial (intervalo P-Q), da duração da contração ventricular (intervalo Q-T) e estimar a frequência cardíaca (intervalos R-R).

O nódulo sinoarterial, localizado na aurícula direita na proximidade da veia cava superior, é continuamente controlado por mecanismos neurais (Lombardi et al., 1996) e libera potenciais de ação que se propagam através das aurículas, levando à sua contração (ondas P, despolarização das aurículas) até ao nódulo atrioventricular. O nódulo atrioventricular, localizado no extremo oposto da aurícula direita, no topo do septo auriculoventricular, é responsável pelo atraso do impulso nervoso dando tempo para que as aurículas esvaziem todo o seu conteúdo para os ventrículos. A partir do nódulo atrioventricular, o impulso nervoso passa pelo feixe de His, localizado no septo aurículo ventricular, que se divide em dois ramos de modo a que passe por ambos os ventrículos (ondas Q, despolarização do septo auriculoventricular) até ao ápice do coração e às fibras de Purkinje, dando-se a contração ventricular (ondas R, despolarização ventricular) responsável pelo bombeamento do sangue para a circulação sistémica e pulmonar. Após a saída do sangue do coração a partir das artérias, os ventrículos repolarizam, relaxando (ondas T, repolarização ventricular), conforme ilustrado esquematicamente na Figura 5 B.

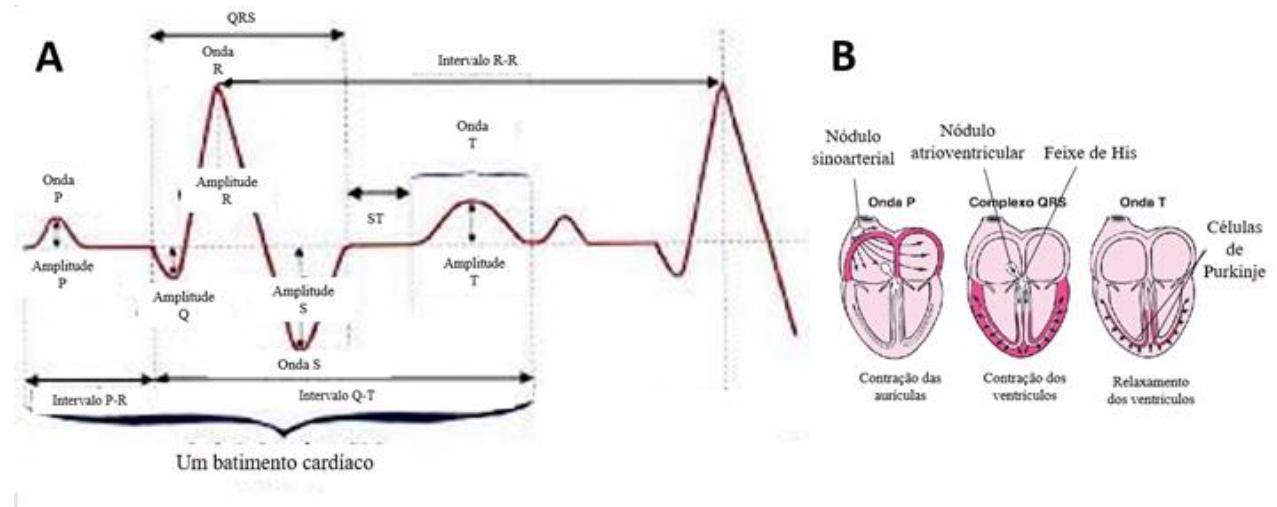


Figura 5 – Representação da atividade elétrica do coração. A – ECG, que representa a atividade elétrica do coração através de ondas, neste caso de um batimento cardíaco até ao início do batimento seguinte; B – Movimento da corrente elétrica através do coração durante um batimento cardíaco. O estímulo é iniciado pelo nódulo sinoarterial, disseminando-se até ao nódulo atrioventricular, de onde prossegue através do feixe de His que tem uma bifurcação para ambos os ventrículos, sendo finalmente irradiado através das fibras interventriculares (células de Purkinje). Adaptado de Barreto & Madeiro (2018), Comparação de modelos matemáticos para classificação morfológica do complexo QRS do sinal eletrocardiográfico e do sitio Manual MSD: www.msmanuals.com.

O batimento cardíaco responde dinamicamente a alterações fisiológicas mediadas por estímulos simpáticos e parassimpáticos no nódulo sinoarterial, pelo que, embora rítmico, não é totalmente constante apresentando oscilações mediante o estado fisiológico do organismo (Kleiger et al., 2005). Como tal, o ECG de indivíduos saudáveis, mesmo em repouso, apresenta variações periódicas nos intervalos RR (Lombardi et al., 1996), intervalo entre batimentos cardíacos consecutivos que corresponde ao intervalo de tempo entre duas ondas R consecutivas num ECG (Staud, 2008) e que, geralmente, varia entre 0.07 a 0.10 seg.

A HRV pode ser analisada a partir de *softwares* de análise de ECGs disponíveis, tais como o Kubius (Tervainen et al., 2014) obtendo-se uma avaliação da atividade do SNA a partir da análise da atividade elétrica do coração. Este *software* inclui um algoritmo de deteção do complexo QRS adaptável e ferramentas para calcular todos os parâmetros de HRV no domínio do tempo e no domínio da frequência e vários parâmetros não lineares (ver ponto 1.5.1.2.).

Em condições fisiológicas normais, a exposição a situações de stress, como a prática de exercício físico, induz a respostas adaptativas do SNA, como um aumento do tônus simpático com atenuação do parassimpático, contribuindo para a manutenção da homeostasia

e de um ambiente interno saudável, que se refletem, entre outras, em alterações na frequência cardíaca (De Vito et al., 2002). A complexidade dos ritmos autónomos bem como a sua interação com todos os sistemas do organismo, caracterizam o estado cardiovascular na saúde e na doença (Staud, 2008), pelo que, as flutuações observadas na HRV refletem a modulação autónoma e têm significado prognóstico em estados patológicos.(Kleiger et al., 2005). A HRV pode então ser utilizada como uma ferramenta não invasiva para aceder à modulação autónoma já que fornece informações acerca do balanço entre a modulação simpática e parassimpática. A indução a situações de stress, bem como o stress crónico, contribuem para a diminuição da HRV num organismo saudável, devido ao aumento do estímulo simpático e atenuação do parassimpático (Hoshi et al., 2013; Soares-Miranda et al., 2014).

Estudos anteriores relataram uma baixa HRV em doentes com fibromialgia que poderá ser compatível com disautonomia (Martinez-Lavin, 2004; Raj et al., 2000; Ulas et al., 2006).

A disautonomia presente em fibromialgia é caracterizada pela hiper-reactividade persistente do SNA em repouso e hipo-reactividade durante situações de stress (Furlan et al., 2005). A hipo-reactividade observada nestes doentes parece estar correlacionada com os sintomas.

Doentes com fibromialgia apresentam alterações na HRV consistentes com uma hiper-reactividade simpática e uma hipo-reactividade parassimpática (Cohen et al., 2000; Figueroa et al., 2008; Kulshreshtha & Deepak, 2013), o que é congruente com a incapacidade de reagir apropriadamente a indutores de stress, nomeadamente a uma prova de exercício físico de curta duração e elevada intensidade (Kingsley et al., 2010; Suárez et al., 2021). Martínez e colegas descobriram, no seu estudo, que os 30 doentes com fibromialgia avaliados comparativamente com 30 controlos saudáveis tinham diminuído a HRV acumulada de 24 horas, manifestada por uma diminuição do desvio padrão de todos os intervalos RR e uma proporção diminuída de pares de intervalos RR adjacentes diferindo em > 50 ms. Estes resultados devem-se ao facto de os doentes terem uma HRV de 24 horas diminuída devido à predominância da modulação simpática noturna, o que poderá estar associado à fadiga e distúrbios do sono sentidos por estes indivíduos (Martínez-Lavín et al., 1998).

No estudo levado a cabo por Cohen e colegas com o objetivo de estudar a interação entre os sistemas simpático e parassimpático e de explorar a associação entre a HRV e os sintomas em pacientes com fibromialgia utilizando análise de espectro de potência (PSA) da

HRV, observou-se uma frequência cardíaca significativamente maior em pacientes com fibromialgia comparativamente com os controlos saudáveis levando à conclusão de que o estado autónomo basal dos pacientes é caracterizado por um tónus simpático aumentado e um tónus parassimpático reduzido e de que a desregulação autónoma pode ter implicações na sintomatologia (Cohen et al., 2000).

Figueroa e equipa demonstraram que a HRV e a força muscular, naturalmente reduzidas nos pacientes com fibromialgia, melhoraram significativamente após o cumprimento de um programa de exercícios de 16 semanas. Ou seja, verificaram uma maior HRV e maior capacidade de realizar força após as 16 semanas de exercício comparativamente com o início (Figueroa et al., 2008).

1.5.1.2. Cálculo da variabilidade da frequência cardíaca

A HRV é mensurada observando-se as flutuações da frequência de despolarização ventricular (intervalos RR) ao longo de um determinado período de tempo causadas pelos mecanismos de regulação autónoma do sistema cardiovascular. Para analisar a HRV, recorrem-se a métodos estatísticos, domínio do tempo, a espectros de potência, domínio da frequência, e a análise geométrica não-linear, gráfico de Poincaré (Kleiger et al., 2005).

Domínio do tempo

As medidas realizadas no domínio do tempo derivam de métodos estatísticos. Como os intervalos entre as ondas RR adjacentes são medidos durante a realização do ECG, pode-se recorrer a manipulações aritméticas destes intervalos para calcular a HRV a partir dos dados dos intervalos RR do ECG, obtendo-se índices como: SDNN, desvio padrão da média dos intervalos RR; SDANN, desvio padrão da média dos intervalos RR de 5 minutos; pNN50, percentagem das diferenças sucessivas maiores que 50 ms entre intervalos RR, apresentada na Equação 1; rMSSD, raiz quadrada da média quadrada da diferença entre os intervalos RR sucessivos, apresentada na Equação 2 (Kleiger et al., 2005; Staud, 2008).

$$pNN50 = \frac{\sum RR_{50}}{\sum RR}$$

Equação 1 - Percentagem das diferenças sucessivas maiores que 50 ms entre intervalos RR. Onde RR_{50} é igual às diferenças entre os intervalos RR sucessivos maiores que 50 ms. Adaptado de Neumann et al (2011), Estudo da variabilidade da frequência cardíaca em exercício progressivo máximo.

$$rMSSD = \sqrt{\sum \left(\frac{RR_i - RR_{i+1}}{N} \right)^2}$$

Equação 2 - Raiz quadrada da média quadrada da diferença entre os intervalos RR sucessivos. Onde N é o número de intervalos RR e i é a posição do intervalo RR. Adaptado de Neumann et al (2011), Estudo da variabilidade da frequência cardíaca em exercício progressivo máximo.

Domínio da frequência

Outro método de avaliação da HRV comumente utilizado é a análise no domínio da frequência, baseada na análise espectral de dados derivados de ECG para detetar a frequência das alterações do intervalo RR ao longo do tempo porque a atividade nervosa simpática e parassimpática contribui para o espectro de potência da frequência cardíaca (Akselrod et al., 1981). A análise espectral requer que a série de eventos possa ser representada por uma soma de componentes sinusoidais de diferentes amplitudes e frequências. O sinal é representado como uma combinação de ondas de seno e de cosseno, com diferentes amplitudes e frequências (Staud, 2008).

A análise espectral de potência recorre a técnicas como a transformada de Fourier ou de auto-regressão de dados provenientes de um ECG que resulta na identificação de várias bandas de frequência associadas à atividade do SNA para quantificar flutuações cíclicas nos intervalos RR (Lombardi et al., 1996). Os principais componentes do espectro da HRV consistem: numa banda de alta frequência (HF: 0,15 – 0,40 Hz), que é síncrona com a respiração e é inteiramente gerada por impulsos eferentes parassimpáticos (provenientes dos nervos vagos cardíacos) tratando-se de um medidor da atividade parassimpática (Lombardi et al., 1996); uma banda de baixa frequência (LF: 0,04 – 0,15 Hz), modulada por barorreflexos com uma combinação de enervação simpática e parassimpática para o nódulo sinoarterial

(Kleiger et al., 2005); e uma banda de muito baixa frequência (VLF: 0,0033 – 0,04 Hz), mediada por estímulos parassimpáticos que representa a influência dos sistemas vasomotor periférico e renina-angiotensina (Staud, 2008; Taylor et al., 1998), sendo o restante do espectro de potência composto pela banda de frequência ultrabaixa, que reflete toda a variação abaixo de 0,0033 Hz e reflete principalmente o ritmo circadiano.

Os parâmetros LF e HF são avaliados em termos de frequência e amplitude, as quais são determinadas pela área (potência) de cada componente pelo que, os resultados são obtidos em ms^2 (Lombardi et al., 1996).

A razão dos espectros de baixa e de alta frequência (LF/HF) é usada como um índice de atividade simpato-vagal.

A análise espectral da HRV trata-se de um teste com utilidade na identificação dos pacientes com fibromialgia porque estes apresentam disautonomia (Martínez-Lavín et al., 1998; Staud, 2008). Uma baixa HF e elevadas LF e LF/HF refletem uma acentuada atividade do SNS com a do parassimpático atenuada.

Método de Poincaré

Se apenas forem aplicados métodos lineares, algumas informações podem-se perder uma vez que os sistemas orgânicos não são totalmente lineares (Hoshi et al., 2013). Como tal, há a necessidade da aplicação de métodos de análise não linear para caracterizar sistemas complexos.

O gráfico de Poincaré, cujo um exemplo está representado na Figura 6, é uma técnica geométrica utilizada para avaliar a dinâmica da HRV através de uma representação visual num espaço cartesiano dos valores (pontos) de cada par de elementos sucessivos numa série temporal, neste caso de intervalos RR (Hoshi et al., 2013). Pretende relacionar cada intervalo RR obtido com o intervalo imediatamente posterior (RR_i versus RR_{i+1}) e pode reconhecer padrões de correlação ocultos de um sinal de série temporal (Karmakar et al., 2010). O gráfico de Poincaré descreve a dinâmica não linear da HRV, permitindo visualizar os padrões dos intervalos RR (Kleiger et al., 2005). A série dos pontos representativos da variável em estudo em tempos sucessivos é ajustada a uma elipse que descreve a evolução do sistema de modo a que se obtenham índices mensuráveis (Brennan et al., 2001; Tulppo et al., 1996). O menor

eixo da elipse representa o desvio padrão da variabilidade instantânea do intervalo RR (SD1), mediada pelo estímulo parassimpático no nódulo sinoarterial representando as rápidas alterações nos intervalos RR; o maior eixo da elipse representa o desvio padrão da variabilidade contínua do intervalo RR de longo prazo (SD2), influenciado pelo estímulo parassimpático e simpático. A partir destes dois índices é possível determinar a razão SD1/SD2, para representar a relação entre ambos os índices, que se trata da razão de curta variação de intervalo para longa variação de intervalo (Hoshi et al., 2013).

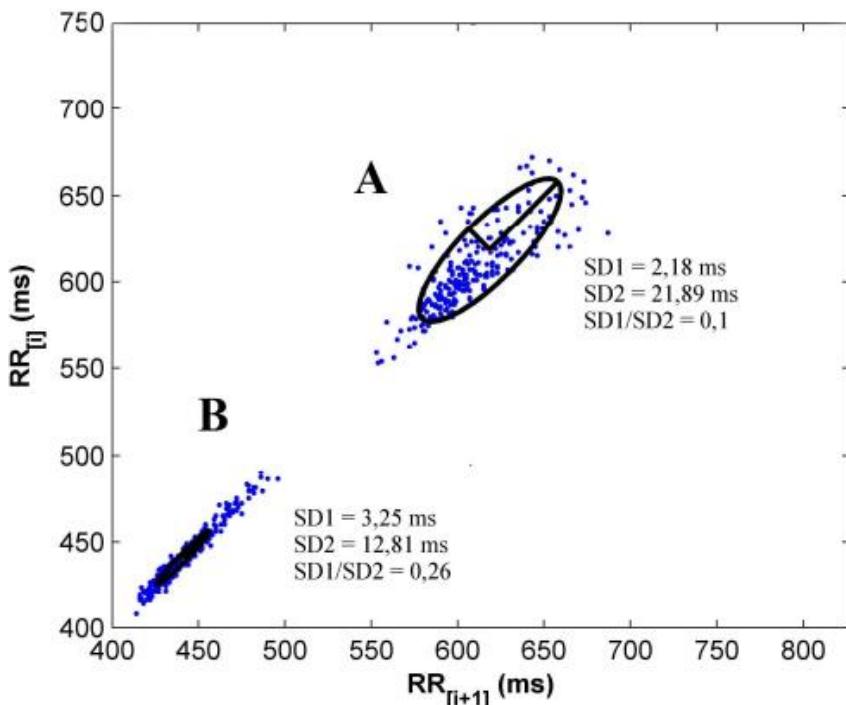


Figura 6 – Exemplo de gráfico Poincaré representativo de uma série de intervalos RR mensurada em repouso (A) e durante uma prova de exercício (B). A dispersão ortogonal, expressa pelo menor raio da elipse (SD1), representa a variabilidade da frequência cardíaca de curto prazo. A dispersão longitudinal, expressa pelo maior raio da elipse (SD2), representa a variabilidade da frequência cardíaca de longo prazo. Adaptado de Neumann et al (2011), Estudo da variabilidade da frequência cardíaca em exercício progressivo máximo.

Esta expressão gráfica inclui a forma, tamanho, dispersão, posição e localização para todos os dados da HRV no sistema cartesiano. Os estado físico, psicológico e fisiológico de uma pessoa estão relacionados com esses parâmetros gráficos devido à modulação autónoma decorrente de estímulos externos e internos (Ahn, 2020).

A geometria do gráfico de Poincaré auxilia na distinção entre indivíduos saudáveis e não saudáveis (Brennan et al., 2001).

1.5.2. Biomarcadores salivares

A saliva trata-se de um fluido biológico essencial para a manutenção da saúde oral com pH de aproximadamente 6,6 a 7,1 (Zhang et al., 2016), podendo o fluxo variar entre 0,32 (baixo fluxo) e 0,47 mL/min (pico de fluxo) (Humphrey & Williamson, 2001). A saliva é produzida pelas células acinares (secretoras) das diferentes glândulas salivares, presentes na cavidade oral, representadas na Figura 7 A, sendo 65% da saliva segregada espontaneamente (sem indução) pelas glândulas submandibulares, localizadas anteriormente aos primeiros molares superiores, 20% pelas glândulas parótidas, 7 a 8% pelas glândulas sublinguais, localizadas na parte inferior bocal (os três pares de grandes glândulas salivares) e aproximadamente 10% é segregada pelas glândulas menores, que se encontram espalhadas pela cavidade bocal, no lábio inferior, língua, palato, bochechas e faringe e que contribuem para a maior concentração de marcadores plasmáticos na saliva (Humphrey & Williamson, 2001). A saliva total é uma complexa mistura mucosa de fluidos segregados pelo conjunto das glândulas salivares maiores e menores e do fluido crevicular gengival, que contém bactérias orais e partículas.

As glândulas salivares, representadas pelo esquema da Figura 7 B, são constituídas por células acinares (serosas e mucosas), que produzem a saliva, por células ductais, que conduzem a saliva quando há estímulo para a sua secreção das células acinares até à cavidade oral e por células mioepiteliais, que contraem em resposta a estímulos nervosos (Loo et al., 2010). As células acinares determinam o tipo de secreção produzida pelas diferentes glândulas, podendo esta ser classificada como serosa, produzida principalmente pelas glândulas parótidas; mucosa, produzida maioritariamente pelas glândulas menores; ou mista, proveniente principalmente das glândulas submandibulares e sublinguais. As células ductais, dos ductos das glândulas, dividem-se em intercaladas, estriadas e secretórias, sendo as células ductais intercaladas as primeiras da rede de ductos que ligam as secreções acinares ao resto da glândula seguidas das células ductais estriadas que regulam a reabsorção de sódio e das células ductais excretórias, as últimas da rede de ductos, que contribuem para a reabsorção contínua de sódio e secreção de potássio. As células mioepiteliais tratam-se de longas células que envolvem as células acinares sendo responsáveis pela contração ductal que promove a excreção de saliva para a cavidade oral de acordo com a estimulação nervosa (Humphrey & Williamson, 2001).

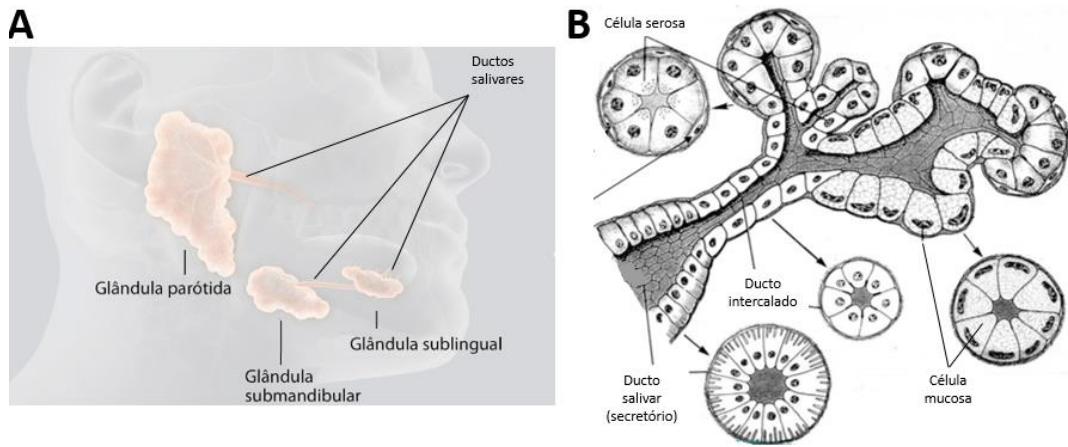


Figura 7 - Glândulas salivares. A – Representação ilustrativa da localização das glândulas salivares. B – Esquema da constituição de uma glândula salivar. Adaptado do sítio <https://tiagofonsecaestomatologia.pt/glandulas-salivares/>, e de Silva, M. (2017). Análise de características orgânicas, pH e fluxo de saliva total não estimulada de recém-nascido a termo.

Inicialmente, a saliva é isotónica mas torna-se hipotónica à medida que percorre a rede de ductos das glândulas para atingir a cavidade oral (Humphrey & Williamson, 2001), pois a água e os eletrólitos são ativamente transportados pelas células acinares sendo que, seguidamente, o conteúdo eletrolítico da saliva é modificado, principalmente com a remoção do cloreto de sódio durante a passagem através do sistema ductal para a cavidade oral (Proctor & Carpenter, 2007). A hipotonicidade da saliva não estimulada permite que as papilas gustativas enviem o estímulo nervoso ao centro do paladar. A Figura 8 ilustra a produção e regulação da secreção salivar.

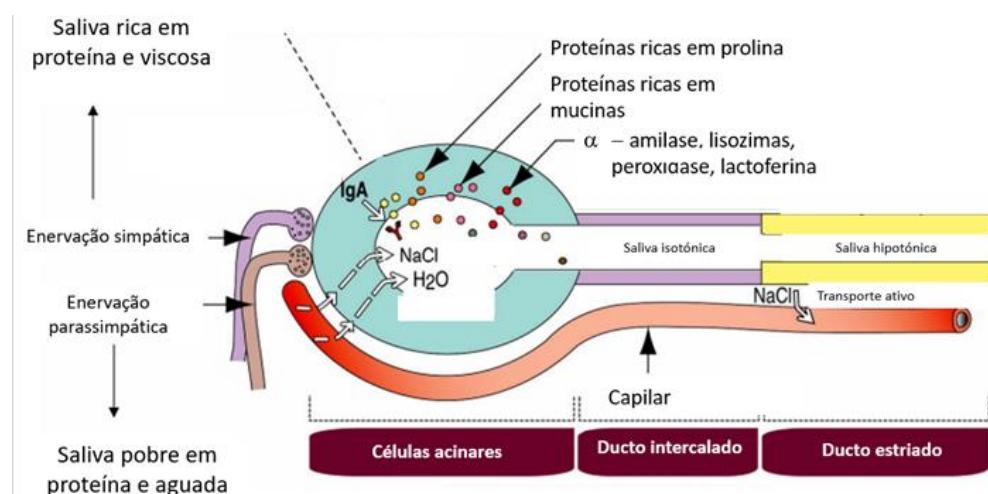


Figura 8 – Produção e regulação salivar. Adaptado do sítio https://www2.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/material_didatico/Profa_Maeli/Aulas_Bio/glands_anexas.pdf

A saliva é composta por 99% de água, sendo o restante 1% composto por bicarbonatos, fosfatos e ureia, que modelam o pH e a capacidade tampão da saliva por neutralização dos

ácidos; proteínas como mucinas, enzimas e imunoglobulinas, que são antibacterianas; cálcio e fosfato que, em conjunto com proteínas, funcionam como um fator anti solubilidade e modulam a remineralização; outros eletrólitos como sódio, potássio, magnésio; ácidos gordos; triglicéridos; amónia (Bosch, 2014; Humphrey & Williamson, 2001; Wilmarth et al., 2004). As mucinas, produzidas maioritariamente pelas glândulas salivares menores, tratam-se de proteínas de elevada viscosidade e elasticidade, baixa solubilidade e forte capacidade de aderência que contribuem para a capacidade lubrificante da saliva permitindo a fala, a mastigação e deglutição, para a capacidade antibacteriana visto que contribuem para a adesão de microorganismos às superfícies dos tecidos orais, controlando a colonização bacteriana e fúngica e para a proteção do esmalte devido à sua elevada adesão aos dentes, formando uma película protetora (Humphrey & Williamson, 2001).

A saliva desempenha diversas funções, nomeadamente proteção antibacteriana, pois é a primeira linha de defesa contra microorganismos e vírus da cavidade oral, proteção mecânica e química, lubrificação da mucosa oral, proteção contra a desmineralização dentária, percepção gustativa e digestão, como tal, uma das mais abundantes proteínas na saliva é α -amilase que perfaz cerca de 10 a 20% do conteúdo total de proteína na saliva (Arhakis et al., 2013). Esta enzima desempenha um importante papel na digestão do amido a maltose (Li & Gleeson, 2004; Nater & Rohleder, 2009), sendo essencial ao processo de digestão, que tem início na cavidade oral. Um fluxo e composição salivar apropriados são essenciais e tratam-se de variáveis com potencial de diagnóstico em determinadas patologias.

O fluxo e a composição salivar não são constantes e, além de variar entre indivíduos, variam de acordo com estímulos intrínsecos e extrínsecos como ciclos circadianos e hormonais, stress, inflamação, infecções e a prática de exercício físico (Humphrey & Williamson, 2001; Miočević et al., 2017).

As glândulas salivares são enervadas por fibras nervosas simpáticas e parassimpáticas, sendo a secreção salivar controlada pelo SNA. A estimulação simpática leva à secreção de pouca quantidade de uma saliva mais viscosa para que tenham lugar funções fisiológicas mais cruciais durante momentos de stress, enquanto que a estimulação parassimpática leva à secreção de uma grande quantidade de saliva mais aquosa durante os períodos de repouso para promover a digestão (Iorgulescu, 2009; Miočević et al., 2017). As glândulas salivares formam um ponto de regulação altamente sofisticado no sistema nervoso, capaz de responder

instantaneamente e com alto nível de especificidade a potenciais estímulos intrínsecos e/ou patológicos e extrínsecos (alimentos, stress ou inflamação) (Bosch, 2014).

O recurso à saliva para o estudo de marcadores bioquímicos para a investigação de diversas patologias é cada vez mais frequente, apresentando elevado potencial para as que se encontram relacionadas com disfunções do sistema nervoso (Illescas-Montes et al., 2021; Ship et al., 1990), uma vez que tanto o fluxo como a composição salivar dependem do estímulo nervoso que atua nas glândulas que a produzem permitindo inferir sobre a modulação autónoma das glândulas salivares.

A saliva está continuamente a ser produzida e renovada (cerca de 0,8 mL permanece na cavidade oral após a deglutição (Humphrey & Williamson, 2001)), por isso reflete o estado fisiológico momentâneo e encontra-se disponível em grandes quantidades. Os métodos de colheita de saliva são simples e não invasivos, como tal, o recurso a este espécime para análise é uma vantagem relativamente ao sangue (Miočević et al., 2017), principalmente para o estudo de doenças que envolvem o stress, já que este método não induz stress. A colheita de amostras de sangue para análise de biomarcadores trata-se de um procedimento invasivo e, consequentemente, stressante para o dador, sendo um procedimento moroso quando necessárias colheitas repetitivas podendo até contribuir para alterar a expressão de determinados biomarcadores, além de que exige pessoal (flebotomista) e equipamentos qualificados (Miočević et al., 2017).

O controlo simpático da produção salivar faz-se através do gânglio cervical superior. A estimulação simpática resulta na liberação de noradrenalina, que atua sobre os receptores α - e β -adrenérgicos das glândulas salivares, resultando em: a) diminuição da produção de saliva pelas células acinares; b) aumento da secreção proteica; c) diminuição do fluxo sanguíneo para as glândulas. A enervação simpática entre as glândulas salivares é variável (Culp et al., 1991).

O controlo parassimpático é coordenado por meio de centros na medula e faz-se através dos nervos facial e glossofaríngeo. Informações aferentes da boca, língua, nariz e reflexos condicionados são integrados no cérebro e ocorre estimulação parassimpática (Humphrey & Williamson, 2001). O estímulo parassimpático resulta na liberação de Ach que atua nos receptores muscarínicos M3 e M1 das glândulas salivares, resultando em: a) aumento da secreção de saliva pelas células acinares; b) as células ductais aumentam a secreção de

HCO_3 ; c) aumento do fluxo sanguíneo para as glândulas salivares; d) contração do mioepitélio para aumentar a taxa de expulsão de saliva (Humphrey & Williamson, 2001; Proctor & Carpenter, 2007). Na presença de alimentos na cavidade oral, por exemplo, e de acordo com o seu sabor e consistência, dá-se o aumento do fluxo salivar e, quando o volume de saliva atingir aproximadamente 1,1 mL, é acionado o reflexo da deglutição no tronco encefálico (Iorgulescu, 2009).

A saliva reflete parcialmente a composição sanguínea visto que as glândulas salivares se encontram irrigadas por capilares sanguíneos ocorrendo trocas moleculares, por difusão passiva, ultrafiltração ou transporte ativo entre o sangue e este fluido (Loo et al., 2010). Como tal, a partir da análise de componentes salivares, é possível inferir sobre o estado fisiológico do indivíduo no momento da colheita, porém, o *timing* da colheita pode induzir diferentes resultados (Miočević et al., 2017).

Os métodos comuns de colheita de saliva sem estímulo incluem: colheita passiva, que envolve o acúmulo de saliva na boca e a colheita, por expetoração direta ou através de um canudo para um tubo de amostra, uso de algodão ou cotonetes e *swabs* ou dispositivos de sucção para extração de amostra diretamente das glândulas salivares. Também se pode induzir o fluxo salivar para que se proceda à sua colheita por mastigação de pastilhas ou recorrendo a dispositivos de colheita semelhantes a *swabs* ou algodão impregnados com ácido cítrico. As desvantagens de se estimular o fluxo salivar incluem: alterações no pH, a contaminação da amostra e alterações na concentração de analitos específicos da saliva (Miočević et al., 2017).

1.5.2.1. Fluxo salivar

O fluxo salivar médio de uma pessoa saudável é de aproximadamente 0,3 mL/min (Edgar, 1990), sendo que a produção diária média normal varia entre 0,5 e 1,5 L (Iorgulescu, 2009). Há três tipos de estímulo para a produção de saliva: mastigação, o paladar e o olfato, sendo este o menos significativo (Humphrey & Williamson, 2001).

Associadas às variações no fluxo salivar estão variações de composição que dependem da atividade do SNA, modulada por fatores intrínsecos, fisiológicos, como o ciclo circadiano, fatores psicológicos ou patologias sistémicas, e extrínsecos como medicação, situações indutoras de stress, entre outras (Humphrey & Williamson, 2001). Por exemplo, a taxa de produção da saliva diminui para cerca de 0,1 mL/min durante o sono e aumenta para 4 a 5

mL/min durante a mastigação e outras atividades estimulantes (Iorgulescu, 2009). A taxa de fluxo salivar também tem tendência a diminuir em situações de stress, como por exemplo, em época de exames académicos como demonstrado no estudo levado a cabo por Matos-Gomes e colegas (Matos-Gomes et al., 2010).

Geralmente verifica-se uma diminuição do fluxo salivar com a prática de exercício intenso (Bishop et al., 2000; Chicharro et al., 1998; Ljungberg et al., 1997; Steerenberg et al., 1997), tal como descrito por Li e Gleeson que verificaram uma descida significativa na taxa de secreção salivar imediatamente antes de os participantes, homens saudáveis, terminarem de cumprir um programa de exercício a 60% $VO_{2\text{max}}$ numa bicicleta estática durante 2h, voltando aos valores de pré-exercício passada 1h (Li & Gleeson, 2004). As variações no fluxo salivar refletem a prontidão na resposta das glândulas salivares aos estímulos nervosos. Estes investigadores observaram elevada concentração plasmática de adrenalina após o exercício comparativamente com os valores em repouso, o que corrobora a ativação simpática, sendo esperáveis os resultados obtidos referentes ao fluxo salivar, já que este diminui perante ativação adrenérgica. Durante exercício de elevada intensidade ($VO_{2\text{max}} \geq 60\%$) a estimulação simpática, que induz vasoconstrição levando à diminuição da taxa de secreção de salivar (Chicharro et al., 1998), parece ser suficientemente forte para inibir a taxa de fluxo salivar.

No entanto, Ligtenberg e colegas, ao investigar o efeito do exercício físico de moderada e de elevada intensidade na taxa de secreção salivar, concentração proteica e atividade da α -amilase em indivíduos saudáveis, reportaram um aumento do fluxo em ambas as intensidades, em contraste com estudos anteriores (Ligtenberg et al., 2015). Os investigadores atribuíram este resultado à relativa baixa temperatura à qual os participantes realizaram o exercício (Kavanagh et al., 1998).

Em determinadas doenças, principalmente nas que envolvem disfunções do SNA, verificam-se alterações no fluxo salivar (Illescas-Montes et al., 2021; Ship et al., 1990), podendo, por isso, ser um marcador de disfunções do SNA, auxiliando no diagnóstico.

No entanto, num estudo efetuado por Schenone que pretendeu avaliar a prevalência de xerostomia em pacientes com fibromialgia, verificaram que 51% das doentes envolvidas ($n = 50$) apresentavam um fluxo salivar reduzido, não tendo sido encontradas associações estatisticamente significativas desta doença com uma diminuída secreção salivar (Schenone

et al., 2017), apesar das alterações verificadas ao nível do SNA nos pacientes com fibromialgia (Kulshreshtha & Deepak, 2013; Martínez-Lavín et al., 1998).

1.5.2.2. Concentração proteica

Já tinham sido detetadas diferenças no proteoma plasmático em doentes com fibromialgia comparativamente a indivíduos saudáveis correlacionadas com os sintomas clínicos (Han et al., 2021).

A partir de diferentes técnicas, tais como cromatografias, eletroforeses, espetrometria de massa, entre outras, foram separadas as diferentes proteínas na saliva total (Bazzichi et al., 2009; Ciregia et al., 2019; Gorr et al., 2005; Loo et al., 2010; Wilmarth et al., 2004), permitindo inferir acerca do proteoma salivar. Além das proteínas produzidas localmente pelas glândulas salivares, a saliva contém proteínas provenientes do sangue, sendo que, aproximadamente 27% das proteínas salivares encontram-se também na circulação sanguínea (Loo et al., 2010) sugerindo que se pode recorrer à saliva para a detecção de biomarcadores em circulação em alternativa ao sangue. A semelhança significativa que se observa entre a concentração de proteínas no sangue e na saliva sugere que esta pode ser utilizada em alternativa ao sangue para exames de diagnóstico, embora se desconheça o mecanismo preciso de passagem de proteínas do sangue para a saliva. Alterações nas concentrações de proteínas específicas são associadas a processos patológicos, podendo ser utilizadas na prática clínica e na pesquisa patológica a partir da deteção de determinadas diferenças na expressão proteica. O proteoma salivar contém uma proporção maior (14,5%) de proteínas de baixo peso molecular, < 20 kDa, comparativamente com os 7% no proteoma plasmático. A fração mais elevada das proteínas encontradas na saliva variam entre os 20 e os 40 kDa (26%), enquanto que no plasma variam de 40 a 60 kDa (18%). No total, 65% das proteínas da saliva têm um peso molecular inferior a 60 kDa, em comparação com 36% das proteínas plasmáticas. No que diz respeito às proteínas encontradas em comum entre a saliva e o plasma, as distribuições de peso molecular são semelhantes às distribuições do proteoma salivar (Loo et al., 2010).

À semelhança do que acontece no que respeita ao fluxo salivar, as células acinares das glândulas salivares segregam proteínas em resposta a estímulos nervosos (Gorr et al., 2005). Estas células contêm vesículas com a maioria das proteínas que são libertadas para a cavidade oral juntamente com a saliva por exocitose (Proctor & Carpenter, 2007), outras proteínas são segregadas pela via secretora regulada menor, vias secretoras constitutivas (apical ou

basolateral), ou via tipo constitutiva secretória (Gorr et al., 2005), de acordo com os estímulos nervosos que nelas atuam. As glândulas parótidas contribuem com uma variedade de proteínas secretoras, incluindo α -amilase e proteínas ricas em prolina (Gorr et al., 2005).

O proteoma salivar altera mediante os estímulos do SNA. Quando há estímulo do sistema nervoso simpático, como exposição a situações de stress (prática de exercício físico por exemplo), verifica-se um aumento da concentração proteica total salivar independente da redução do fluxo, comparativamente com os valores mensurados em repouso (Ligtenberg et al., 2015; Ljungberg et al., 1997).

A concentração de proteínas na saliva pode elucidar acerca do estado fisiológico dos indivíduos, como tal, é utilizada como meio para a descoberta de biomarcadores em algumas patologias (Loo et al., 2010).

Existem evidências de diferenças na composição total proteica salivar em indivíduos com fibromialgia comparativamente com indivíduos saudáveis (Bazzichi et al., 2009; Ciregia et al., 2019; Illescas-Montes et al., 2021) que se poderão dever à disfunção autónoma associada a esta patologia, já que a estimulação simpática induz à secreção de proteínas salivares contribuindo para um aumento da concentração proteica salivar. Bazzichi e colegas, em dois estudos diferentes, detetaram um aumento dos níveis de transaldolase e fosfoglicerato mutase I, bem como diferenças significativas na expressão de outras proteínas como a ciclofilina A, segregada em resposta a stress oxidativo, na saliva de indivíduos com fibromialgia comparativamente com o grupo controlo saudável (Bazzichi et al., 2009; Ciregia et al., 2019). A expressão aumentada da transaldolase pode ser interpretada como uma tentativa das células se defenderem contra o stress oxidativo, exacerbado nesta patologia, porque se trata da enzima limitante da fase não oxidativa da via das pentose fosfato, desempenhando um papel fundamental na regulação da síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Hackshaw, 2021), essencial à respiração e cuja produção no organismo destes doentes pode não ser suficiente para limitar o dano oxidativo tecidual. Já a fosfoglicerato mutase I, trata-se de uma das enzimas importantes na via da glicólise.

1.5.2.3. Atividade da α -amilase salivar

Cerca de 80% da α -amilase salivar é produzida pelas células acinares das glândulas parótidas e 20% pelas das glândulas submandibulares e sublinguais (L. Busch et al., 2002) em

resposta a estímulos provenientes do SNA, especialmente do ramo simpático, pelo que o aumento da atividade desta enzima na saliva é considerado um biomarcador de ativação adrenérgica (Bosch et al., 2011; Nater & Rohleder, 2009; Speirs et al., 1974; van Stegeren et al., 2006).

A secreção da α -amilase é estimulada pelo exercício (Ligtenberg et al., 2015; Steerenberg et al., 1997; Walsh et al., 1999) e por fatores psicológicos (Speirs et al., 1974).

Li e Gleeson observaram que a taxa de secreção da α -amilase salivar varia de acordo com o ciclo circadiano, sendo mais baixa pela manhã e subindo ao longo do dia (Fischer et al., 2016; Li & Gleeson, 2004), verificaram também que a sua atividade aumenta 1h após a prática de exercício, mantendo-se durante todo o programa de exercício de intensidade moderada e que, ao fim de 2h, a sua atividade retoma os valores basais. A secreção desta enzima é induzida pelo aumento de catecolaminas plasmáticas devido à estimulação adrenérgica associada ao exercício (Bishop et al., 2000; Ljungberg et al., 1997; Walsh et al., 1999). A noradrenalina desempenha um papel importante na indução da secreção de proteínas salivares havendo uma correlação significativa entre a α -amilase salivar e a concentração plasmática de noradrenalina após o exercício.

A atividade da α -amilase na saliva aumenta de acordo com a intensidade do exercício físico (Gleeson et al., 2001; Walsh et al., 1999), no entanto, Ligtenberg e colegas observaram um aumento muito mais significativo após exercício de intensidade moderada do que após o exercício de elevada intensidade (Ligtenberg et al., 2015).

Como tal, tanto o fluxo salivar como a concentração de proteína total e a atividade da α -amilase na saliva refletem o stress do indivíduo, na medida em que um reduzido fluxo, uma elevada concentração proteica total e elevada atividade da α -amilase refletem a ativação do sistema nervoso simpático com atividade do parassimpático atenuada, sendo bons marcadores de ativação adrenérgica. Tratam-se de parâmetros que permitem inferir acerca da estimulação adrenérgica de forma imediata porque são alterações instantâneas.

Vários artigos relatam maior atividade da α -amilase em pacientes com fibromialgia em relação a indivíduos saudáveis (Bazzichi et al., 2009; Fernández-de-las-Peñas et al., 2014; Fischer et al., 2016; Pintor et al., 2014; Sánchez et al., 2014) revelando uma hiper-reactividade simpática e hipo-reactividade parassimpática, mesmo em repouso.

Marcadores de stress oxidativo como os níveis de MDA e de carbolinos proteicos também podem ser utilizados como marcadores de diagnóstico da fibromialgia uma vez que a sua expressão se encontra mais elevada nestes pacientes comparativamente com indivíduos saudáveis.

Pode-se recorrer à saliva para detetar os níveis de stress oxidativo e de capacidade antioxidante uma vez que este fluido reflete parcialmente a composição sanguínea.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS



2. Objetivos

Existem vários desafios clínicos e biomédicos associados à fibromialgia, desde logo porque a etiologia permanece essencialmente desconhecida, não existe tratamento, e não estão estabelecidos biomarcadores de diagnóstico. Desta forma, o diagnóstico depende inteiramente do relato do paciente sobre sintomas e comprometimento funcional, resultando da exclusão de outras patologias de sintomatologia semelhante. Como tal, o diagnóstico pode demorar anos, levando a elevados custos aos sistemas de saúde, devido às visitas frequentes dos pacientes a profissionais de saúde e encaminhamento a vários especialistas, visto que se trata de uma doença multifatorial.

Uma melhor compreensão da fibromialgia pode reduzir o sofrimento do paciente, auxiliando num diagnóstico mais rápido e apostando em estratégias terapêuticas eficazes, bem como reduzir os custos globais associados a esta patologia.

A identificação de possíveis marcadores de diagnóstico em fibromialgia e a sua associação com a sintomatologia contribuirá para o avanço na direção da compreensão da etiologia da patologia bem como dos mecanismos envolvidos e para a promoção de uma terapia que ajude os doentes a recuperar alguma qualidade de vida.

A dor muscular, associada a esta patologia, constitui um inibidor à prática de atividade física nos doentes com fibromialgia. Contudo, a atividade física pode trazer enormes benefícios a estes doentes na sua qualidade de vida, como mostram vários estudos. Para além disso, estudar o doente durante a prática de atividade física pode contribuir para compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à fibromialgia, bem como contribuir para a identificação de marcadores bioquímicos característicos.

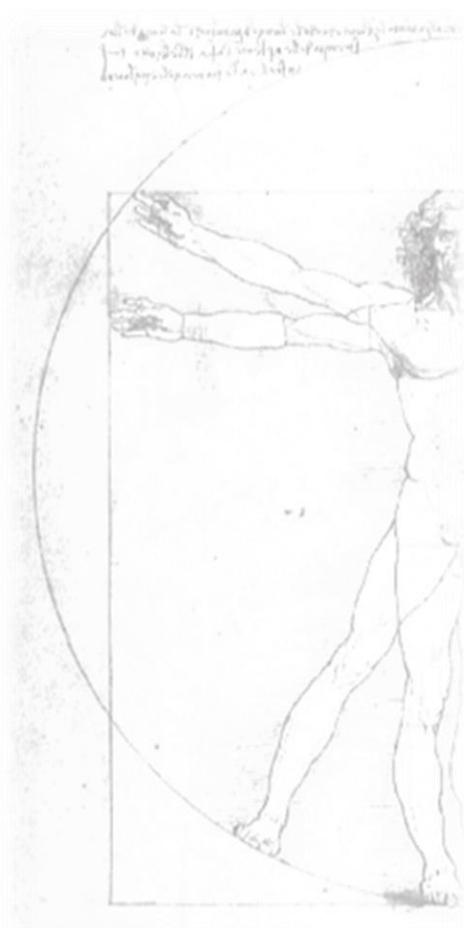
2.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral a avaliação da variabilidade da frequência cardíaca e de parâmetros salivares (associados à atividade do sistema nervoso autónomo e marcadores da capacidade antioxidante) antes e após o cumprimento de uma prova de esforço, em mulheres com fibromialgia, comparando com um grupo de mulheres saudáveis, grupo controlo.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Identificar diferenças na percepção da dor, do esforço e da fadiga entre indivíduos com fibromialgia e indivíduos saudáveis, recorrendo à escala de percepção do esforço percebido (escala subjetiva de percepção do esforço de Borg) antes e após a prova de esforço.
- ✓ Identificar diferenças na ativação adrenérgica entre indivíduos com fibromialgia e indivíduos saudáveis. Para tal, foram avaliados marcadores de atividade do sistema nervoso simpático, nomeadamente parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca, avaliados pelo *software* kubius, parâmetros salivares, como a taxa de secreção salivar, a concentração proteica e a atividade da enzima α -amilase salivar;
- ✓ Identificar alterações relacionadas com o stress oxidativo entre indivíduos com fibromialgia e indivíduos saudáveis e suas alterações por ação da prova de esforço, tendo sido mensurados parâmetros bioquímicos como a atividade das enzimas catalase e glutationo peroxidase, que refletem a capacidade antioxidante.

CAPÍTULO III: METODOLOGIA



3. Metodologia

3.1 Estratégia

3.1.1. Local de realização

A prova de esforço, colheitas de saliva e medição de parâmetros fisiológicos foram efetuadas no pavilhão desportivo da Universidade de Évora.

As análises bioquímicas tiveram lugar no Laboratório de Bioquímica Aplicada e Aerobiologia, Fase III, Colégio Luís António Verney, Departamento de Química da Escola de Saúde e Desenvolvimento Humano da Universidade de Évora.

3.1.2. Período de realização

Este trabalho foi realizado durante o ano letivo de 2021/2022.

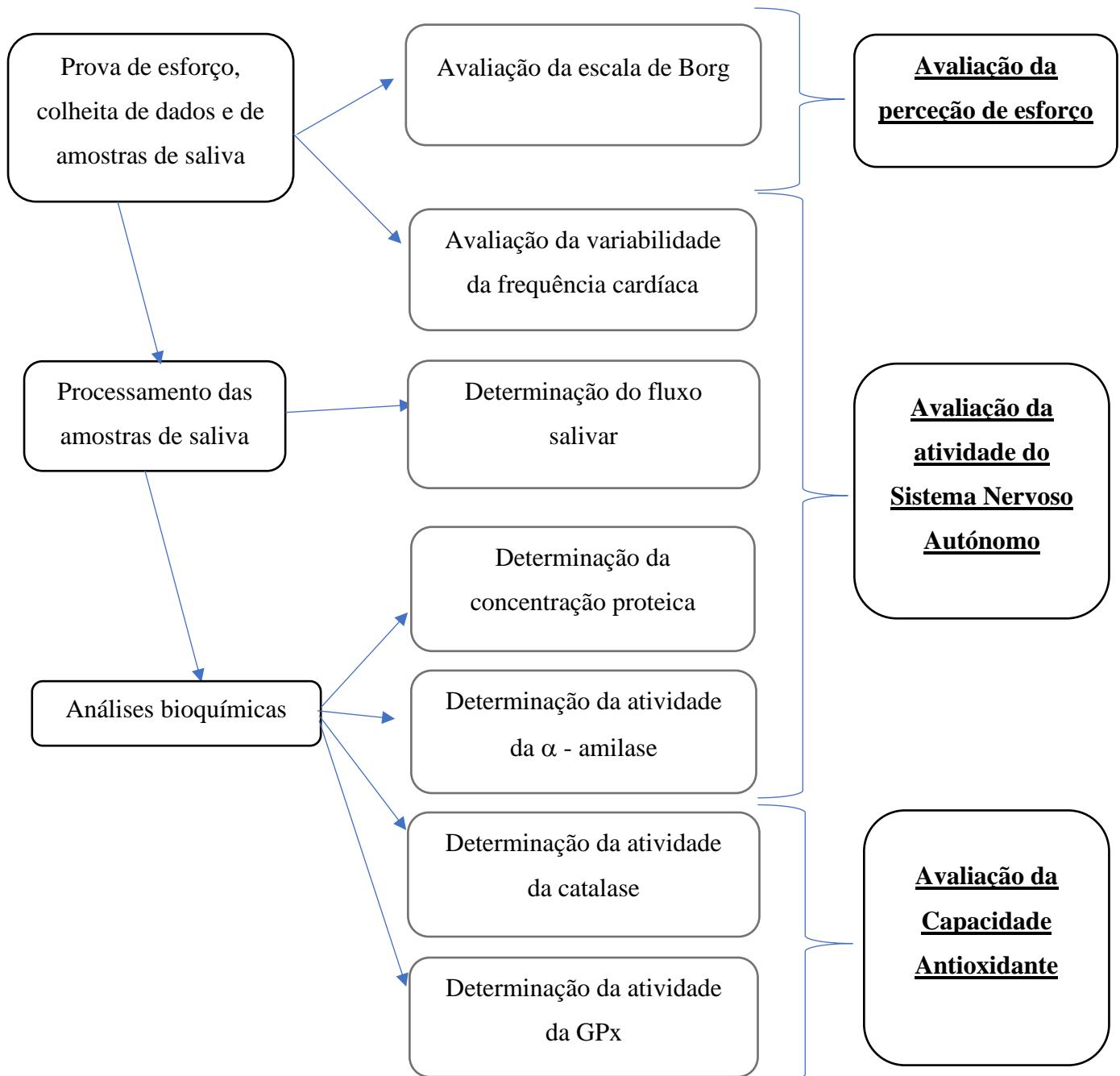
3.1.3. Amostras

- ✓ Saliva de indivíduos com fibromialgia em momento basal;
- ✓ Saliva de indivíduos com fibromialgia após prova de esforço;
- ✓ Saliva de indivíduos saudáveis em momento basal;
- ✓ Saliva de indivíduos saudáveis após prova de esforço.

3.1.4. Técnicas utilizadas

- ✓ Avaliação da percepção do esforço;
- ✓ Medição de parâmetros da HRV;
- ✓ Determinação do fluxo salivar;
- ✓ Determinação da concentração proteica;
- ✓ Determinação de atividades enzimáticas por métodos espetrofotométricos.

3.2 Esquema do procedimento experimental



3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Caracterização da amostra

A amostra deste estudo é composta por um total de 37 indivíduos do sexo feminino, 21 das quais com diagnóstico de fibromialgia, declarado por um especialista de reumatologia, sem lesões articulares graves incapacitantes para realização de atividade física e 16 indivíduos aparentemente saudáveis com idades compreendidas entre os 27 e os 71 anos. Não foram identificadas alterações significativas entre os indivíduos de ambos os grupos. A Tabela 1 mostra as características da amostra.

Tabela 1- Caracterização antropométrica das participantes do estudo.

Variável	Grupo de Fibromialgia	Grupo Controlo	
	Média (SD)	Média (SD)	p-value
Idade (anos)	51.14 (9.99)	42.25 (13.15)	0.023
Altura (cm)	158.95 (8.58)	163.81 (4.50)	0.062
Peso (kg)	80.34 (22.82)	61.32 (7.16)	0.006

No entanto, oito participantes do grupo fibromialgia não foram incluídas na análise da HRV devido a um problema no registo deste parâmetro. Nas variáveis bioquímicas foram identificados alguns *outliers* para cada variável, tendo sido removidos das análises.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsínquia (revisada no Brasil, 2013) e aprovadas pelo comité de ética em pesquisa da Universidade (GD/44902/2019). Prosseguiu-se com o estudo após as participantes assinarem o consentimento informado.

3.3.2. Prova de esforço

A prova de esforço foi realizada após um período de aquecimento geral de 3 min em bicicleta estática (Monark Exercise AB, Suécia), a 50-60 rpm sem resistência para evitar fadiga, seguindo-se o seguinte plano:

- ✓ Aquecimento específico de familiarização com o dinamômetro: 3 repetições de extensão e flexão do joelho da perna dominante sem resistência e velocidade livre com um Biodeix System 3 (Biodeix Corporation, Shirley, NY) a uma amplitude angular de 90°;

- ✓ Prova de esforço: 20 repetições flexão/extensão alternada do joelho a uma amplitude angular de 90º da flexão para a totalidade da extensão e uma velocidade angular de 180º/seg (Suárez et al., 2021; Tomas-Carus et al., 2015).

A HRV foi avaliada e as amostras de saliva colhidas imediatamente antes do aquecimento geral e imediatamente após a prova de esforço.

3.3.3. Parâmetros avaliados relativos à atividade física

3.3.3.1. Esforço percebido

O esforço percebido pelas participantes (RPE) foi classificado a partir da escala subjetiva de esforço de Borg (em anexo), que vai de 6 a 20, antes e imediatamente após a conclusão da prova de esforço. É uma escala de intensidade geral para a maioria das magnitudes subjetivas que pode ser usada para medir o esforço e a dor. Trata-se de uma ferramenta utilizada para estimar o esforço, a dor, falta de ar e fadiga durante o esforço físico (Borg, 1998).

3.3.3.2. Parâmetros associados à variabilidade da frequência cardíaca

De modo a avaliar a resposta do organismo à prova de esforço, procedeu-se à monitorização da HRV em todos os indivíduos envolvidos. Para tal, uma faixa torácica com conexão Ant⁺ ao *software* Golden Cheetah foi utilizada para avaliar a HRV antes e após a prova de esforço. Os dados foram exportados para o *software* Kubios (v. 3.3) (Tolvainen et al., 2014) que permitiu o pré-processamento e a extração das variáveis do domínio do tempo e da frequência bem como não lineares. Os artefactos foram filtrados por um filtro intermediário que permitiu identificar os intervalos RR menores/maiores que 0,25 segundos, em relação à média dos batimentos anteriores. Uma interpolação de *spline* cúbico foi usada para corrigir e substituir os artefactos.

Medidas no domínio do tempo e da frequência bem como as não lineares foram extraídas. No domínio do tempo extraíram-se variáveis como frequência cardíaca máxima (máxima HR), frequência cardíaca média (média HR), intervalos RR, contagem RR50 dividida pelo número total de todas as faixas RR (pNN50), o desvio padrão de todos os

intervalos RR (SDNN) e a raiz quadrada das diferenças entre intervalos RR adjacentes (RMSSD) (ver ponto 1.5.1.2.). No domínio da frequência, foram calculadas a frequência muito baixa (VLF, 0,0033 – 0,04 Hz), baixa frequência (LF, 0,04 – 0,15 Hz), alta frequência (HF, 0,15 – 0,4 Hz) e a razão (LF/HF). Em relação às medidas não lineares, a variabilidade RR do batimento cardíaco ao gráfico de Poincaré de curto prazo (largura) (SD1), a variabilidade do RR do batimento cardíaco ao gráfico de Poincaré de longo prazo (comprimento) (SD2) e a Entropia da Amostra (SampEn) foram extraídas. Além disso, foram calculados o índice de stress, o índice do sistema nervoso parassimpático (índice SNP) e o índice do sistema nervoso simpático (índice SNS). O índice SNP foi calculado com base no RR médio (ms), no RMSSD (ms) e no SD1 (%). O índice SNS foi calculado com base na HR média (bpm), no índice de stress e no SD2 (%).

3.3.4. Parâmetros salivares

Devido à sua riqueza na composição de biomarcadores, facilidade de colheita e acesso não invasivo, a saliva tem vindo a ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico nas últimas décadas, sendo particularmente útil para o estudo de patologias relacionadas com o stress. A partir da análise da saliva é possível inferir acerca da ativação adrenérgica e obter parcialmente a composição sanguínea, já que se trata de uma secreção aquosa transparente segregada pelas glândulas salivares diretamente na cavidade oral, sendo constituída por água (99%) e por proteínas (1%). Como tal, foi o fluido escolhido para se proceder às análises.

Foram mensurados os níveis de biomarcadores salivares relacionados com a ativação do sistema nervoso simpático, ativação adrenérgica, e com a capacidade antioxidante antes e após uma prova de esforço em dois grupos de indivíduos: um grupo de pacientes com fibromialgia e um grupo controlo de indivíduos saudáveis.

3.3.4.1. Equipamentos e reagentes

Equipamentos

- ✓ Centrífuga Hermle Z 323 K;
- ✓ Leitor de microplacas TriStar² S LB 942, Berthold.

Reagentes

Todos os reagentes, à exceção dos especificamente mencionados, foram adquiridos à firma Sigma Aldrich com grau de pureza Pa.

3.3.4.2. Colheita e processamento das Amostras

Efetuou-se a colheita de saliva sem jejum mas sem refeições na hora precedente, com anotação da hora da última refeição, e sem prática de atividade física, consumo de álcool ou de bebidas estimulantes nas 10 horas precedentes.

As amostras foram colhidas imediatamente antes do aquecimento geral e imediatamente após o protocolo de fadiga de acordo com o seguinte:

Pedi-se aos indivíduos para que lavassem os dentes apenas com água para remover detritos 40 minutos antes da recolha e para que enxaguassem a boca com água imediatamente antes da recolha. Foi colhida saliva produzida espontaneamente (sem indução da secreção) durante 3 minutos (cronometrados), para dentro de tubos de 50 mL devidamente identificados e previamente pesados.

Após a recolha, os tubos com as amostras foram pesados (para avaliação do fluxo salivar, em mL/min, considerando a densidade da saliva como sendo de 1,0 g/mL(Chicharro et al., 1998)), centrifugados a 1.500 g por 10 min, de modo a remover detritos alimentares e celulares. O sobrenadante foi armazenado a -20°C até análise laboratorial.

imediatamente antes das análises, as amostras de saliva foram descongeladas, em gelo, e centrifugadas a 13.000 g por 30 min a 4°C para remoção de mucinas (Lamy et al., 2015), proteínas que conferem viscosidade à saliva e que desempenham um papel significativo na lubrificação das estruturas intraorais e na formação de barreiras contra a invasão microbiana, mas que, quando presentes, dificultam a homogeneidade da amostra (Iorgulescu, 2009).

3.3.4.3. Determinação do Fluxo Salivar

Os tubos foram pesados antes e após a colheita da amostra. A taxa de fluxo salivar foi calculada através da divisão do peso da saliva (subtração do peso do tubo vazio ao peso do tubo contendo a amostra) pelo tempo da colheita, 3 minutos, obtendo-se o fluxo em mL/min.

Tendo em conta que a saliva é constituída por 98 a 99% de água, considerou-se uma densidade de 1 g/mL (Chicharro et al., 1998).

Este processo é essencial já que o fluxo salivar reflete a ativação do sistema nervoso simpático e, como tal, difere entre os grupos de indivíduos e antes e após a prova de esforço (Emmelin, 1987; Rohleider et al., 2006).

3.3.4.4. Quantificação da Proteína Total

A proteína total do sobrenadante foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) dadas as vantagens: sensível, rápido, estável, poucas interferências de outras substâncias, económico e compatível com agentes redutores. Este método baseia-se na ligação do corante azul de Coomassie brilhante G-250 (CBBG) às proteínas, sendo capaz de detetar concentrações de 1 µg/mL. Trata-se de um método colorimétrico no qual a coloração castanha do reagente altera para azul na presença de proteínas pelo que, a tonalidade depende da concentração proteica da amostra. Quanto mais intensa a coloração azul, mais rica em proteína é a amostra.

A quantificação de proteínas por este método consistiu na preparação de curvas padrão (cujo um exemplo se encontra no anexo) de albumina de soro bovino (BSA) utilizando soluções-padrão com diferentes concentrações (15,6 - 31,25 - 62,5 - 125 - 250 - 500 µg/mL) partindo da solução-mãe, preparada com 0,0020 g de BSA + 1 mL de TBS (tris HCL 25mM, pH7.6 NaCl 150mM).

.A fim de proceder à quantificação da proteína total pelo método de Bradford, cada amostra foi diluída em 2x, 4x e 8x com TBS e a análise feita em triplicado pelo que, em cada microplaca de 96 poços, se adicionaram 10 µL de TBS (branco) em três poços seguidos, 10 µL de cada uma das soluções-padrão para se obter a curva de calibração e 10 µL das amostras diluídas até preencher os restantes poços da placa. De seguida, adicionaram-se 200 µL do reagente de Bradford. Após uma ligeira agitação e incubação de 5 min, leu-se a absorvância num leitor de microplacas a 595 nm.

Por fim, construiu-se a curva padrão Abs/[BSA] e calculou-se a concentração de proteína presentes em cada amostra de saliva. O cálculo das concentrações das amostras foi feito através da reta obtida com as concentrações-padrão de BSA. A partir da equação da reta ($y = mx + b$), considerando o (y) como a absorvância e o (x) como a concentração proteica,

calculou-se a concentração proteica final para cada amostra de saliva. Subsequentemente multiplicou-se o valor obtido pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos em mg/L.

3.3.4.5. Determinação da α -amilase salivar

Para a determinação da atividade de hidrólise de amido da α -amilase salivar foi usado o ensaio de ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme descrito em (Rodrigues et al., 2015) minimizado para microplacas de 96 poços. Trata-se de um método colorimétrico que se baseia na utilização do reagente DNS para a quantificação de açúcares redutores (Miller, 1957). Na presença de DNS, com aquecimento de 100°C, dá-se a oxidação do grupo funcional aldeído da glicose a ácido carboxílico, como tal, este método testa a presença do grupo carbonilo encontrado em açúcares redutores. Em simultâneo, o DNS é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico sob condições alcalinas adquirindo uma coloração castanho-avermelhada que é detetada espetrofotometricamente a 530 nm de comprimento de onda.

A mistura de reação consistiu na adição de 30 μ L de solução de amido a 1% a 15 μ L de amostra de saliva (diluída para 10 μ g de proteína/mL de proteína em tampão fosfato 20 mM (pH 7,0). Após incubação a 37 ° C por 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 30 μ L do reagente DNS. As amostras foram aquecidas a 90°C, por 30 min. Posteriormente adicionaram-se 60 μ L da solução de tartarato de sódio e potássio (40%). Os valores de absorvância foram então convertidos em equivalente de glicose usando uma curva padrão (3-18 mM). Os resultados foram expressos em μ mol de glicose/min/mg de proteína salivar. Foram ainda incluídos na microplaca controlos sem enzima e sem substrato (substituindo o volume respetivo por tampão fosfato). Foi ainda preparada na mesma placa uma curva de calibração de glicose.

As soluções padrão de glicose para a construção da curva de calibração foram preparadas com concentrações de 6, 9, 12, 15 e 18 mM em tampão fosfato. Na microplaca, foram aplicados 30 μ L de cada uma das soluções padrão de glicose em triplicado, adicionou-se 15 μ L de tampão, e os volumes equivalentes aos descritos anteriormente de DNS e de tartarato.

Após a leitura de absorvância da microplaca a $\lambda = 530$ nm, é construída a curva de calibração onde são interpoladas as concentrações de glicose das amostras. A atividade

enzimática é expressa como a concentração de glicose produzida por ação enzimática, por min ($\mu\text{mol/L/min.}$) Pode ainda ser expressa por mg de proteína, pois é conhecida a concentração de proteína no ensaio enzimático.

3.3.4.6. Determinação da Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi determinada a partir do método de Aebi (Hugo Aebi 1984), que consiste na monitorização da decomposição do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a água (H_2O) e oxigénio molecular (O_2). Para tal, a absorvância é mensurada a cada 30 segundos, durante 6 min, a 240 nm de comprimento de onda num espectrofotómetro, tendo neste caso sido utilizado um leitor de microplacas.

A mistura reacional consistiu em amostras salivares diluídas em tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e H_2O_2 0,2%. A atividade enzimática foi expressa em μmol de H_2O_2 consumido por minuto por mg de proteína salivar.

A atividade enzimática foi obtida pela diferença da absorvância por unidade de tempo, sendo expressa em mmol de H_2O_2 consumido por minuto por mg de proteína, tendo a atividade enzimática sido expressa em μmol de H_2O_2 consumido por minuto por mg de proteína salivar.

3.3.4.7. Determinação da Atividade da GPx

A atividade da glutationo peroxidase foi determinada a partir do seguimento da oxidação do NADPH a 340 nm, usando *t*-butilhidroperóxido como substrato.

A mistura reacional consistiu em GSH 25 mM; azida de sódio (NaN_3) 5 mM, (Merck) EDTA 3 mM (Merck), NADPH 1 mM, glutationo redutase (Gr) em tampão fosfato 50 mM, pH7,2.

A atividade enzimática foi expressa em μmol de NADPH consumido por minuto por mg de proteína salivar (Fecondo & Augusteyn, 1983), tendo as medidas de absorvância realizadas a cada 30 segundos por 6 minutos.

3.4. Análise estatística

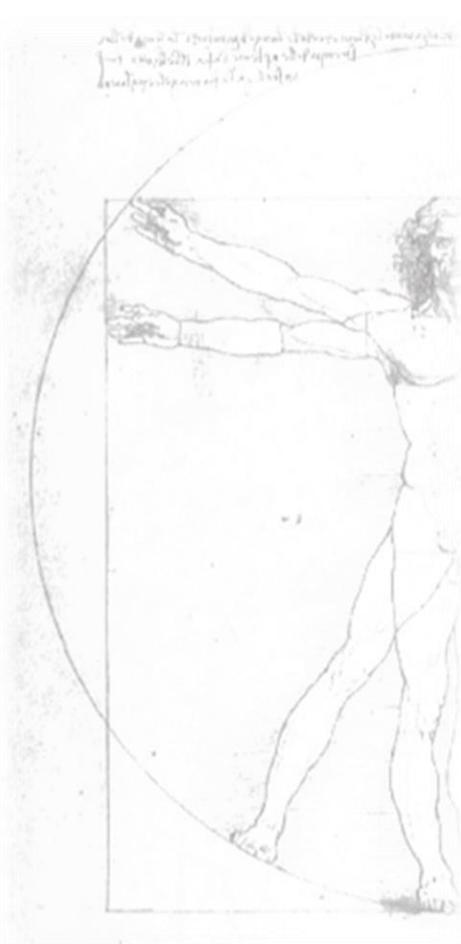
Para as análises estatísticas utilizou-se o *software* estatístico IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 25).

Uma vez que o número de participantes inferior a 50, recorreu-se ao teste Shapiro-Wilk para explorar a distribuição de dados (Yap & Sim, 2011). Considerando os resultados do Shapiro-Wilk e o pequeno tamanho da amostra, foram realizadas análises não paramétricas. Os dados pós-exercício foram normalizados tendo em conta os valores basais subtraindo o valor pós-exercício ao valor basal.

As diferenças entre os grupos foram exploradas usando o teste U de Mann-Whitney, que evidenciou diferenças significativas entre os grupos dos indivíduos saudáveis (controlo) e do de indivíduos com fibromialgia nas variáveis idade e índice de massa corporal (BMI). Assim, foi usada uma análise do co-variância (ANCOVA) para a análise das diferenças entre grupos, estabelecendo a idade e a BMI como co-variáveis.

As diferenças dentro de cada grupo (comparação entre os valores pré- e pós- prova de esforço) foram investigadas recorrendo ao teste de Wilcoxon. O tamanho do efeito, η^2 e r , foram calculados usando os testes ANCOVA e Wilcoxon, respetivamente. A dimensão dos efeitos foi classificada da seguinte forma: $> 0,5$ é um efeito grande; entre 0,5 e 0,3 um efeito médio e $< 0,3$ é considerado um efeito pequeno (Fritz et al., 2012).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS



4. Resultados

4.1. Perceção de esforço em mulheres saudáveis e fibromiálgicas

A Figura 9 ilustra as diferenças na percepção de esforço (RPE) entre o grupo da fibromialgia e o grupo controlo, de acordo com a escala de Borg (6-20).

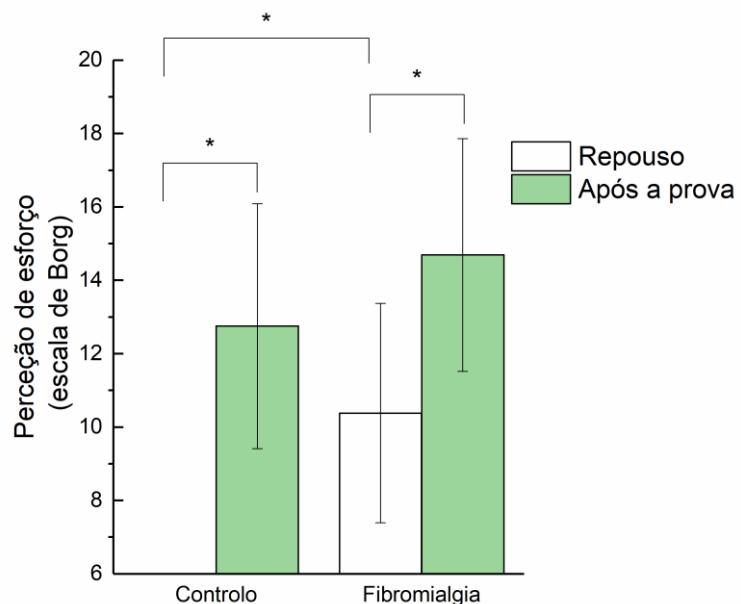


Figura 9 - Diferenças na RPE entre o grupo de mulheres saudáveis e o grupo de mulheres com fibromialgia antes (barras brancas) e após a prova de esforço (barras verdes). Existem diferenças significativas na RPE entre ambos os grupos, com valores mais elevados no grupo das fibromiálgicas. Em ambos os grupos se observou um aumento significativo da RPE após o exercício. Representam-se valores médios \pm Desvio Padrão. * p-value < 0,05. Análise estatística na Tabela 2 do Anexo.

A percepção do esforço no grupo das mulheres com fibromialgia é significativamente maior comparativamente com o grupo controlo em repouso ($p\text{-value} < 0,001$). No grupo da fibromialgia a percepção do esforço em repouso é de $10,38 \pm 2,99$ enquanto no grupo controlo é, em média, cerca de 1,7 vezes inferior.

Em ambos os grupos se verifica um aumento significativo da percepção do esforço após a prova de esforço, sendo a maior diferença entre o antes e o depois a prova no grupo controlo ($p\text{-value}$ no grupo das fibromiálgicas = 0,003; $p\text{-value}$ no grupo controlo < 0,001). No grupo da fibromialgia, a percepção do esforço depois a prova de esforço é de $14,69 \pm 3,17$ e no grupo controlo é de $12,75 \pm 3,34$. Após a prova de esforço não se verificam diferenças significativas entre os grupos ($p\text{-value} = 0,111$).

4.2. Alterações na variabilidade da frequência cardíaca entre mulheres saudáveis e fibromiálgicas antes e após a prova de esforço

A Figura 10 ilustra as diferenças existentes nos parâmetros da HRV analisados em ambos os grupos antes e após a prova de esforço, evidenciando diferenças significativas entre o repouso e após a prova de esforço em mulheres saudáveis nos seguintes parâmetros: máxima HR, média HR, RR, índice SNP, índice SNS, LF, HF, LF/HF e nas mulheres fibromiálgicas existem diferenças significativas entre o repouso e após a prova na máxima HR, média HR, RR, LF e entropia da amostra.

Entre grupos, observam-se diferenças significativas no índice de stress e na HF em repouso, sinónimo de uma hiper-reactividade do SNS nas mulheres fibromiálgicas.

Relativamente à frequência cardíaca máxima (Figura 10, A), não se registaram diferenças entre os dois grupos ($87,69 \pm 9,01$ e $82,29 \pm 12,08$ no grupo controlo e no grupo das doentes em repouso, respetivamente), nem no repouso nem após a prova de esforço. Em ambos os grupos se regista um aumento significativo na frequência cardíaca máxima com a prova de esforço, embora mais acentuado no grupo controlo (aumento de $\simeq 29$ e de $\simeq 5,33$ no grupo controlo e no grupo das doentes, respetivamente) (Figura 11).

No que respeita à frequência cardíaca média (Figura 10, B), as diferenças observadas são semelhantes às descritas para o parâmetro anterior ($76,81 \pm 7,88$ e $74,86 \pm 10,68$ em controlos e doentes em repouso, respetivamente) com a prova de esforço a induzir um aumento neste parâmetro superior em indivíduos saudáveis do que em doentes (aumento de 10,5 e de 0,91 em controlos e doentes, respetivamente) (Figura 11).

De forma semelhante, também o tempo que decorre entre duas ondas RR consecutivas (Figura 10, C) é equivalente entre grupos ($818,43 \pm 125,90$ e $788,94 \pm 81,10$ em doentes e controlos em repouso respetivamente). Contudo, neste caso, a prova de esforço induziu uma redução do tempo decorrente entre duas ondas RR consecutivas, o que ocorreu em ambos os grupos, sendo a diferença mais acentuada no grupo controlo (diminuição de $\simeq 92,32$ e de $\simeq 15,43$ em controlos e doentes, respetivamente).

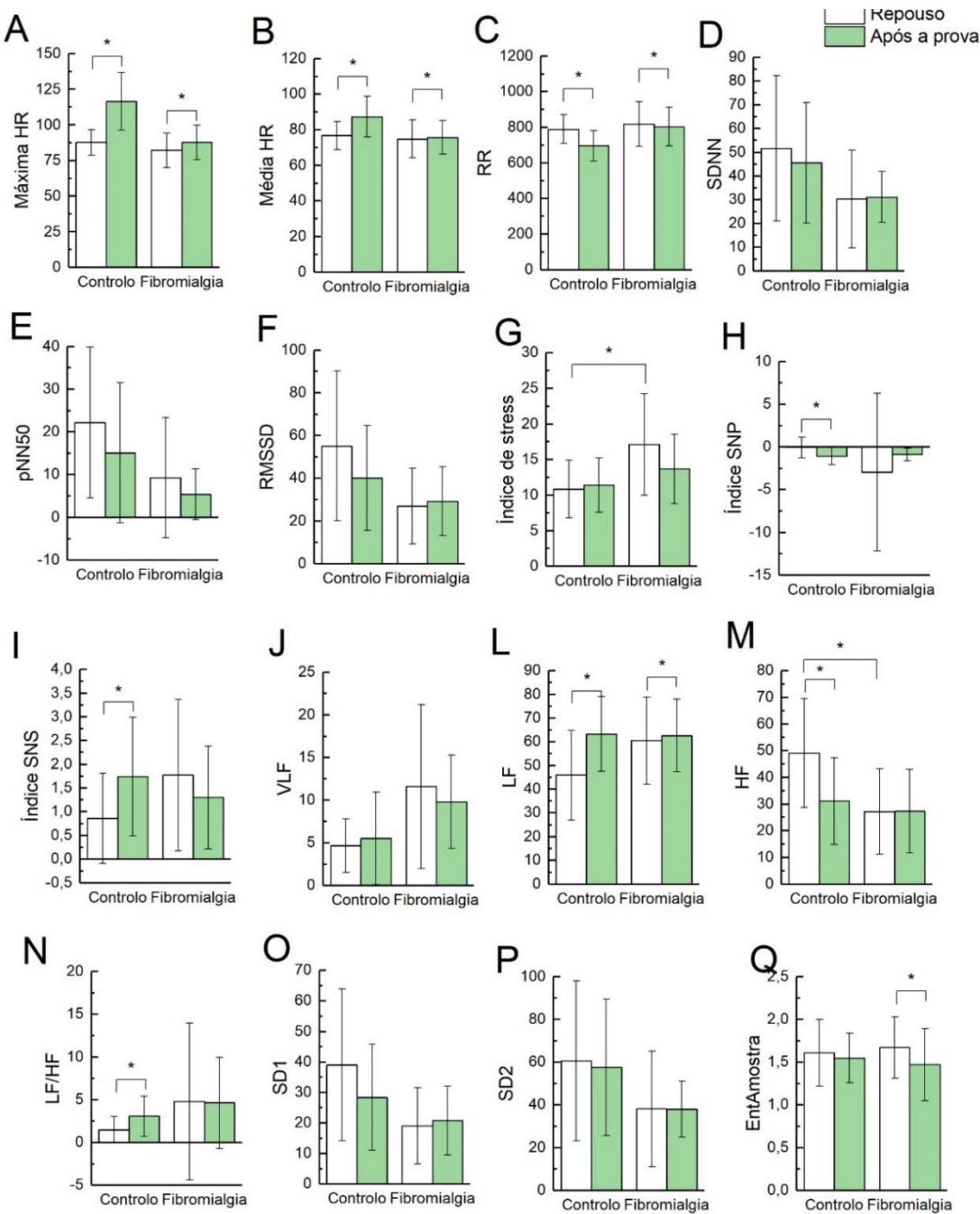


Figura 10 - Diferenças nos parâmetros da HRV entre o grupo de mulheres saudáveis e o grupo de mulheres com fibromialgia antes (barras brancas) e após a prova de esforço (barras verdes). A – Máxima HR (Heart Rate): ritmo cardíaco máximo; B – Média HR: ritmo cardíaco médio; C – RR: tempo entre os intervalos R-R; D – SDNN (Standard Deviation of NN intervals): desvio padrão de todos os intervalos RR normais; E – pNN50 (Percentage of intervals): percentagem de intervalos com >50 ms de diferença do intervalo anterior; F – RMSSD: raiz quadrada da media dos quadrados das diferenças consecutivas de um intervalo RR; G – índice de stress; H – índice SNP: índice de atividade do SNP; I – índice SNS: índice de atividade do SNS; J – VLF: (Very Low Frequency) frequência muito baixa; L – LF: (Low Frequency) baixa frequência; M – HF: (High Frequency) elevada frequência; N – LF/HF: razão das frequências (ms^{-2}); O – SD1: (Dispersion, Standard Deviation) desvio padrão da dispersão de pontos perpendiculares ao eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré; P – SD2: desvio padrão da dispersão de pontos ao longo do eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré; Q – EntAmostra: entropia da amostra. Representam-se valores médios ± Desvio Padrão. * p-value < 0,05. Análise estatística nas Tabelas nº 3, nº 4 e nº 5 do Anexo.

No que respeita ao desvio padrão de todos os intervalos RR normais (Figura 10, D), à percentagem de intervalos com mais de 50 ms de diferença do intervalo anterior (Figura 10, E) e à raíz quadrada da média dos quadrados das diferenças consecutivas de um intervalo RR (Figura 10, F), não se observam diferenças significativas nem entre grupos, quer no repouso, quer após a prova de esforço, nem por ação da prova de esforço dentro de cada um dos grupos.

O índice de stress (Figura 10, G), foi significativamente mais elevado no grupo da fibromialgia comparativamente com o grupo controlo ($17,11 \pm 7,13$ e $10,85 \pm 4,07$ em doentes e controlos respetivamente), no repouso. A prova de esforço não alterou significativamente o índice de stress em nenhum dos grupos.

Relativamente à atividade do SNP (Figura 10, H), o grupo controlo encontra-se em inatividade em repouso ($-0,06 \pm 1,22$). Já o grupo da fibromialgia apresenta um valor médio representativo de hipo-reactividade ($-2,93 \pm 9,22$), mas com uma enorme variabilidade, que não permite que se observem diferenças significativas entre os grupos no repouso. A prova de esforço induziu alterações na atividade do sistema nervoso parassimpático no grupo controlo que diminuiu significativamente para $-0,09 \pm 0,99$. No grupo da fibromialgia não são identificadas diferenças significativas com a prova de esforço, sendo de evidenciar que a atividade do sistema nervoso parassimpático apresentada por este grupo após a prova de esforço ($-0,81 \pm 0,73$) é semelhante, em média e em variabilidade, à observada no grupo controlo após a prova de esforço.

Relativamente à atividade do SNS (Figura 10, I) em repouso, não há diferença significativa entre o grupo da fibromialgia e o grupo controlo, apesar de, em média, o grupo com fibromialgia apresentar valores 2x mais elevados que o controlo ($0,86 \pm 0,95$ e $1,77 \pm 1,06$ em controlos e doentes respetivamente). A prova de esforço induziu um aumento significativo de $\simeq 0,88$ (Figura 11) na atividade do SNS no grupo controlo, mas no grupo da fibromialgia a diferença exercida pela prova não é significativa.

Passando à análise de frequências, nas frequências muito baixas (VLF) (Figura 10, J), não se observam alterações nem entre grupos, nem por ação da prova de esforço. Relativamente às frequências baixas (LF) (Figura 10, L), não há alterações significativas entre grupos, nem antes nem depois da prova de esforço, sendo que a prova de esforço induziu diferenças significativas em ambos os grupos, com um aumento de $\simeq 17,29$ e de $\simeq 2,12$ em controlos e doentes, respetivamente (Figura 11). Os valores da frequência elevada (Figura 10,

M) são significativamente diferentes entre grupos no repouso ($49,12 \pm 20,38$ e $27,21 \pm 15,93$ Hz em controlos e doentes respetivamente). A prova de esforço induziu uma diminuição significativa no grupo controlo ($\simeq 18,05$) (Figura 11), não havendo alterações a registar nas altas frequências no grupo da fibromialgia.

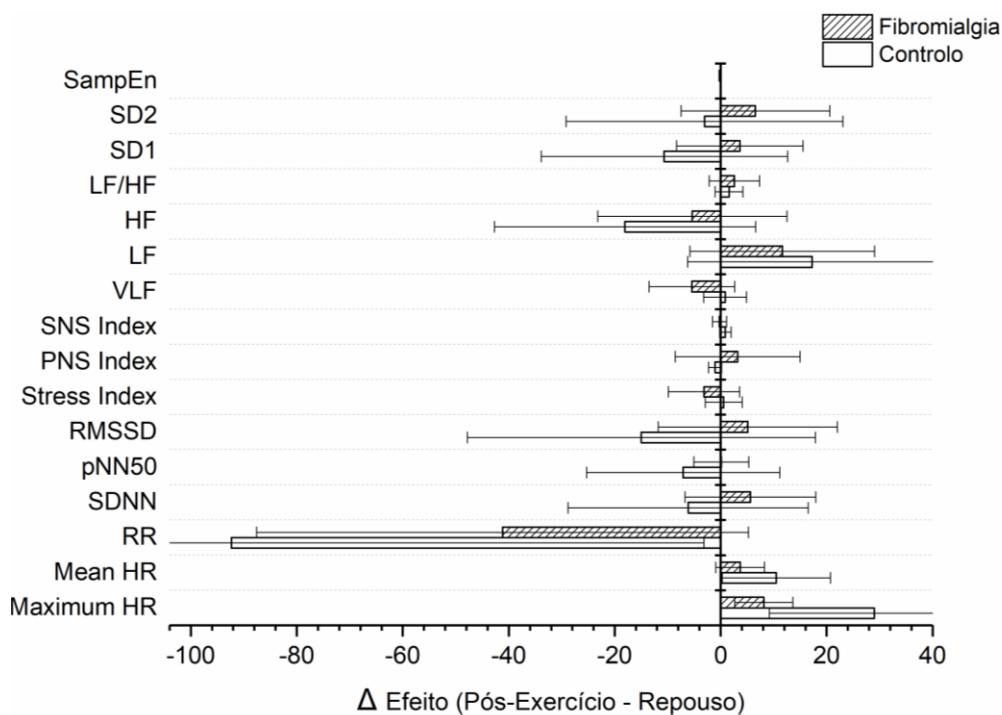


Figura 11 - Diferenças nos parâmetros da HRV entre o grupo de mulheres saudáveis (barras brancas lisas) e o grupo de mulheres com fibromialgia (barras listadas) antes e após a prova de esforço.

A razão das frequências LF/HF (Figura 10, N), apresenta um valor médio 3x superior no grupo com fibromialgia do que no grupo controlo ($1,49 \pm 1,54$ e $4,82 \pm 9,17$ em controlos e doentes respetivamente, em repouso), embora a enorme variabilidade deste parâmetro no grupo das doentes leve a que não seja possível observar diferenças significativas entre eles. A prova de esforço induziu um aumento significativo na razão LF/LF no grupo controlo ($3,07 \pm 2,34$) (Figura 11), mas não no grupo com fibromialgia.

Relativamente à análise dos desvios padrão da dispersão de pontos perpendiculares ao eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré (SD1) (Figura 10, O), e da dispersão de pontos ao longo do eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré (SD2) (Figura 10, P), estes parâmetros não foram significativamente diferentes nem entre grupos, nem foram afetados pela prova de esforço em nenhum dos grupos.

Relativamente à entropia da amostra (Figura 10, Q), não se observaram diferenças significativas entre os grupos, quer no repouso quer após a prova de esforço. A prova de esforço não afetou a entropia do grupo controlo, mas reduziu significativamente a entropia do grupo da fibromialgia, em 0,2 unidades (Figura 11).

4.3. Alterações nos parâmetros salivares entre mulheres saudáveis e fibromiálgicas antes e após a prova de esforço

A Figura 12 ilustra as diferenças existentes nos parâmetros salivares analisados em ambos os grupos antes e após a prova de esforço.

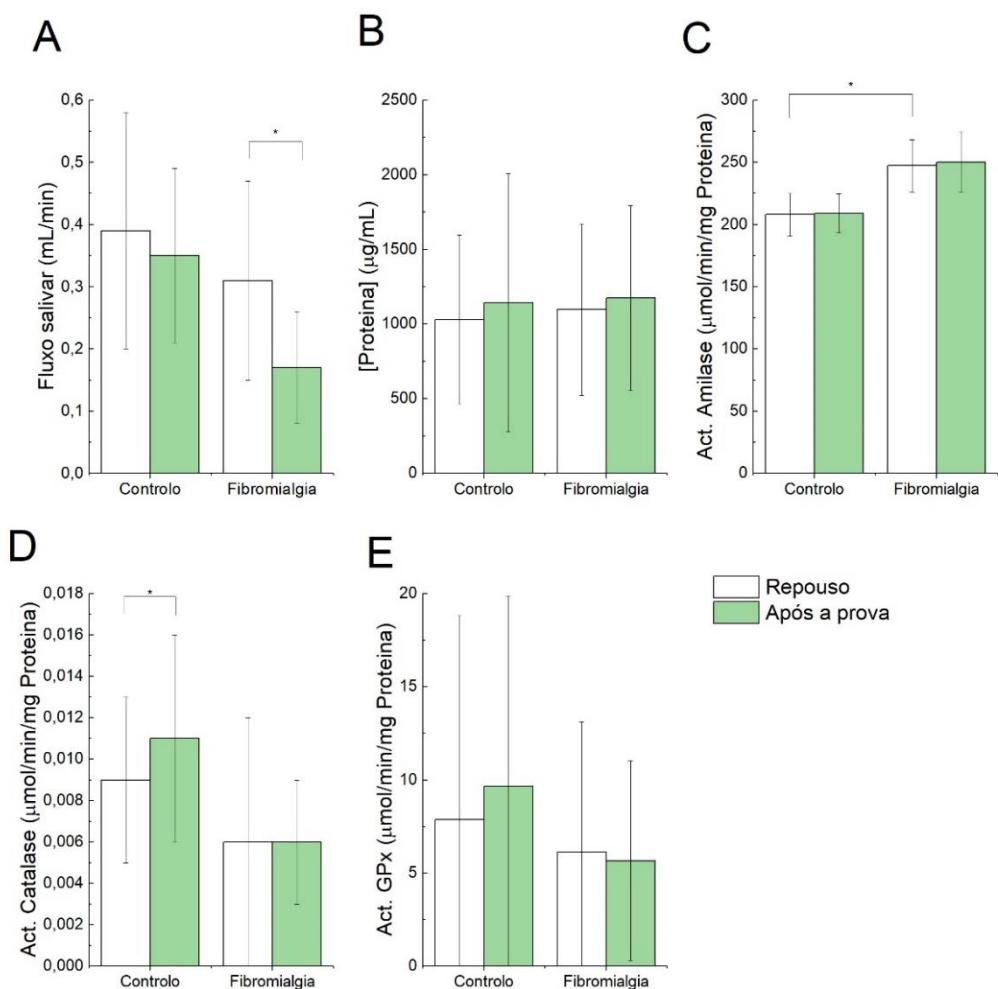


Figura 12 - Diferenças nos parâmetros salivares entre o grupo de mulheres saudáveis e o grupo de mulheres com fibromialgia antes (barras brancas) e após a prova de esforço (barras verdes). A – Fluxo salivar; B – Concentração proteica. C – Atividade da α -amilase salivar; D – Atividade da catalase; E – Atividade da glutathione peroxidase. Representam-se valores médios \pm Desvio Padrão. * p-value < 0,05. Análise estatística nas Tabelas nº 6, nº 7 e nº 8 do Anexo.

Relativamente ao fluxo salivar (Figura 12, A), não se observaram diferenças significativas entre grupos nem em repouso, nem após a prova de esforço. A prova de esforço induziu uma redução significativa do fluxo salivar (p -value = 0.001) no grupo da fibromialgia, com uma redução de $\simeq 0,14$ mL/min, como mostra a Figura 13.

A concentração proteica salivar (Figura 12, B) não foi diferente entre grupos, nem sofreu alteração com a prova de esforço, tendo um valor médio de 1111,17 μ g/mL.

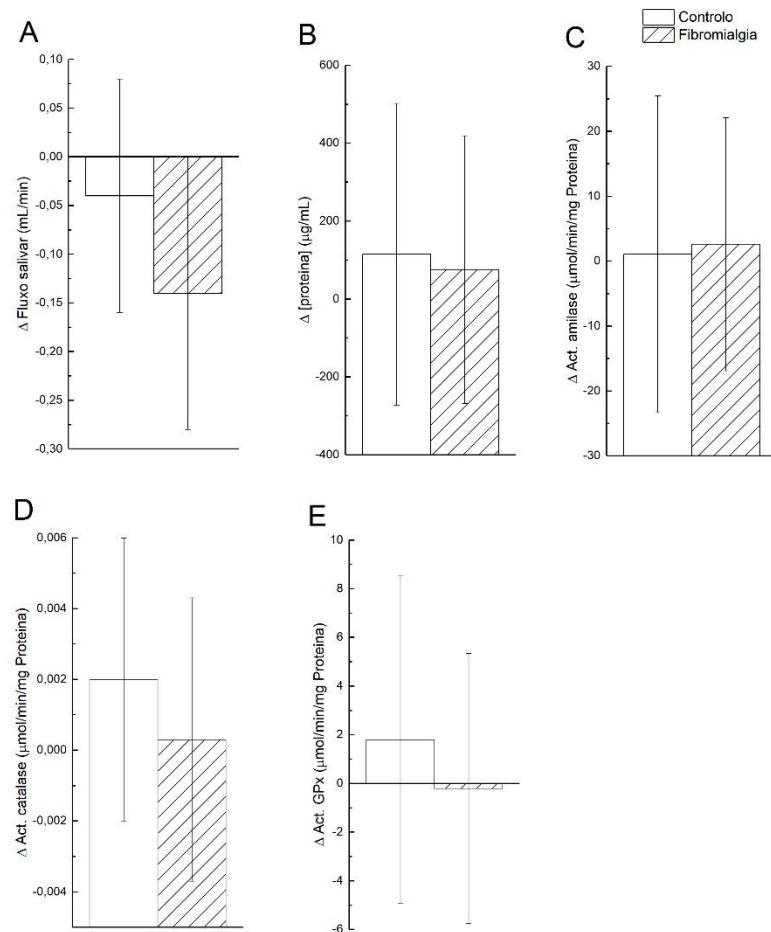


Figura 13 - Diferenças nos parâmetros salivares entre o grupo de mulheres saudáveis (barras brancas lisas) e o grupo de mulheres com fibromialgia (barras brancas listadas) antes e após a prova de esforço. A – fluxo salivar (mL/min); B – concentração proteica salivar (μ g/mL). C – atividade da α -amilase salivar (μ mol/min/mg de proteína); D – atividade da catalase (μ mol/min/mg de proteína); E – atividade da glutationo peroxidase (μ mol/min/mg de proteína).

A atividade enzimática α -amilase salivar (Figura 12, C) apresentou-se significativamente superior no grupo com fibromialgia relativamente aos controlos no repouso (207.98 ± 17.10 e de 247.41 ± 20.96 μ mol/min/mg de proteína em controlos e doentes

respetivamente). A prova de esforço não induziu alterações da atividade desta enzima, nem em saudáveis nem em doentes (Figura 13).

A atividade da catalase (Figura 12, D), embora apresentando valores médios superiores em controlos do que em fibromiálgicas ($0,009 \pm 0,004$ e $0,006 \pm 0,006$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína em controlos e doentes respetivamente, no repouso), não foi significativamente diferentes entre grupos nem no repouso, nem após a prova de esforço. A prova de esforço induziu um aumento significativo para $0,011 \pm 0,005$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ no grupo controlo e no grupo da fibromialgia não se observaram alterações na atividade da catalase com a prova de esforço (Figura 13).

Relativamente à atividade da glutationo peroxidase (Figura 12, E), a enorme variabilidade deste parâmetro não permitiu que fossem observadas diferenças quer entre grupos, quer com a prova de esforço, em qualquer dos grupos. A atividade média foi de $7,33$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.3.1. Relação entre a concentração proteica e o fluxo salivar

Como a concentração proteica total de saliva está dependente do volume de água da sua composição, fomos investigar se havia uma relação linear entre os parâmetros concentração proteica e fluxo salivar. A Figura 14 representa a avaliação da relação entre a concentração proteica e o fluxo salivar.

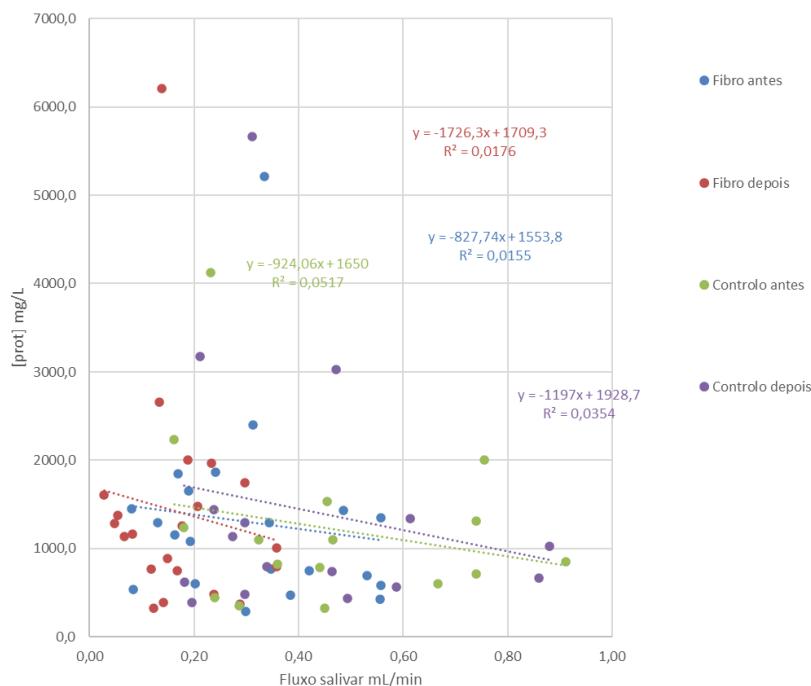


Figura 14 - Relação entre a concentração proteica e o fluxo salivar. Fibro antes e fibro depois representam os dados do grupo com fibromialgia, antes e depois da prova de esforço, respetivamente. Da mesma forma para o grupo controlo: controlo antes e controlo depois.

Pode observar-se que em nenhum dos grupos analisados separadamente (grupo controlo e grupo com fibromialgia, antes e depois da prova de esforço) há correlação linear entre a concentração proteica e o fluxo salivar. As relações tendem a ser de proporcionalidade inversa em todos os grupos, com um declive ligeiramente mais acentuado no grupo com fibromialgia, após a prova de esforço (Figura 14). Assim, a concentração proteica e o fluxo salivar não estão diretamente relacionados.

4.3.2. Relação entre a atividade da α -amilase salivar e a concentração proteica

Foi ainda avaliada a relação entre a atividade enzimática da α -amilase salivar (expressa em U/L) e a concentração proteica no conjunto das amostras estudado. A Figura 15 representa a avaliação da relação linear entre estas variáveis.

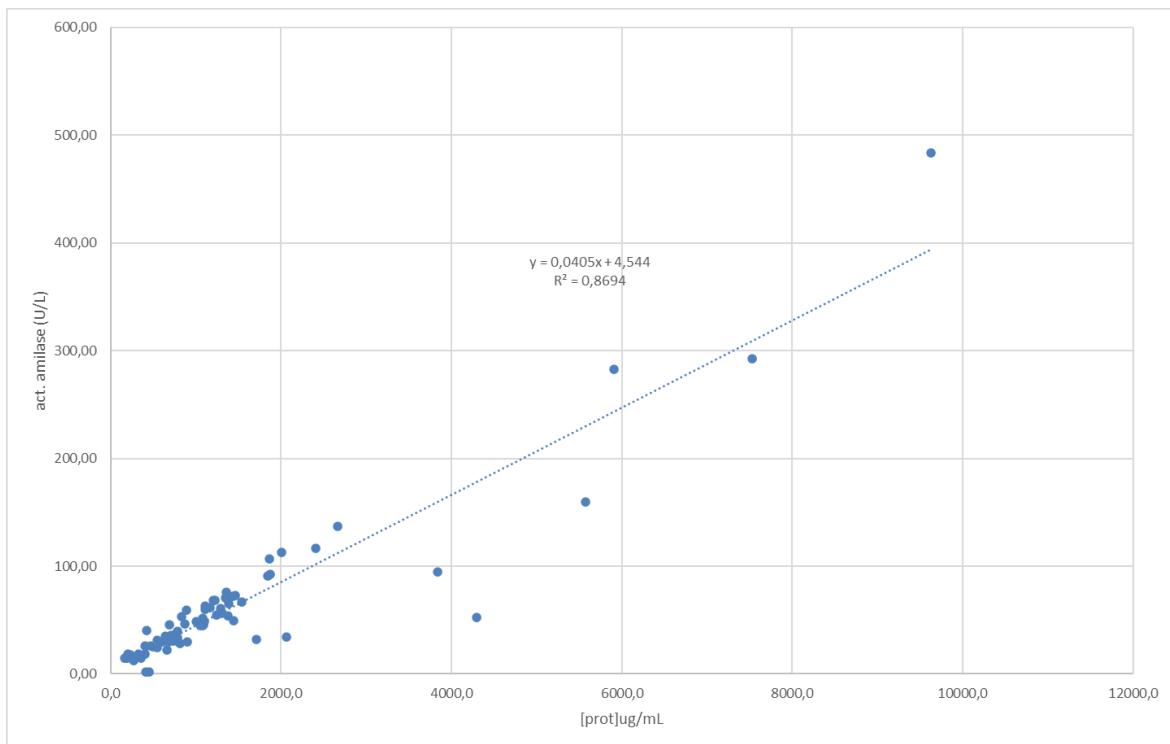


Figura 15 - Relação entre a atividade da α -amilase salivar e a concentração proteica. Estão representados conjuntamente todos os resultados, grupo controlo e grupo com fibromialgia, antes e depois da prova de esforço.

A partir da análise do gráfico da Figura 15 pode-se dizer que existe uma correlação linear forte entre as duas variáveis analisadas, pelo que, quanto maior a concentração proteica, maior será a atividade da α -amilase.

CAPÍTULO V: DISCUSSÃO



5. Discussão de Resultados

O objetivo do presente estudo foi investigar as diferenças entre doentes com fibromialgia e indivíduos saudáveis na variabilidade da frequência cardíaca (HRV) e em parâmetros salivares (como fluxo, concentração proteica, atividades enzimáticas da α -amilase, catalase e glutationo peroxidase) em dois momentos: em repouso e após uma prova de esforço. dada a complexa interação entre o sistema nervoso autónomo (SNA) e o sistema cardiovascular durante a prática de exercício. A avaliação de parâmetros que refletem a atividade do SNA nestes dois momentos pode fornecer informações prognósticas significativas (Freeman et al., 2006), bem como contribuir para a identificação de marcadores de diagnóstico, tão necessários em fibromialgia.

Quanto à percepção de esforço relativamente à prova de esforço aplicada, foram detetadas diferenças significativas entre indivíduos com fibromialgia e indivíduos saudáveis. O grupo das doentes com fibromialgia apresentou uma percepção do esforço significativamente mais elevada comparativamente com o grupo controlo, até mesmo em repouso, o que significa que as doentes, até sem se encontrarem a realizar atividade física, se sentem em esforço (Miller et al., 1996). O grupo controlo apresentou o valor mínimo na escala de percepção do esforço de Borg em repouso, o que era esperável (Eston et al., 1987).

Verificaram-se também diferenças significativas entre o antes e após a prova de esforço em ambos os grupos, indicando que a prova de esforço realizada foi suficientemente intensa para provocar um aumento do esforço percebido em ambos os grupos. No grupo da fibromialgia o aumento da percepção do esforço não foi tão elevado como no grupo controlo provavelmente por estas doentes se sentirem em esforço ainda antes da realização da prova.

Mas terão estas diferenças de percepção de esforço uma estreita ligação com as alterações fisiopatológicas inerentes à fibromialgia? Procurámos abordar esta questão avaliando variáveis sensíveis a modulação autónoma, como a variabilidade da frequência cardíaca e parâmetros salivares como o fluxo, a concentração proteica e a atividade α -amilase, e ainda a marcadores salivares de capacidade antioxidante (catalase e GPx).

Os resultados obtidos revelaram que, no repouso, as doentes com fibromialgia apresentam valores mais elevados de Índice de Stress e LF bem como valores mais baixos de HF comparativamente com o grupo controlo. Valores mais elevados nestes índices parecem

estar relacionados com a modulação simpática e valores mais baixos de HF com uma atenuação do sistema nervoso parassimpático (Soares-Miranda et al., 2014). Além disso, a atividade da α -amilase salivar é mais elevada no grupo da fibromialgia do que no grupo controlo. Esta enzima é uma das proteínas mais abundantes na saliva, desempenhando um papel importante na digestão do amido. É segregada pelas células acinares das glândulas salivares em resposta a estímulos do sistema nervoso autónomo, principalmente do ramo simpático, e o aumento da atividade desta enzima na saliva é considerado um biomarcador de ativação adrenérgica (Bosch et al., 2011; Nater & Rohleder, 2009; Speirs et al., 1974). Diversos artigos relataram uma maior atividade da α -amilase em doentes com fibromialgia comparativamente com indivíduos saudáveis (Bazzichi et al., 2009; Fernández-de-las-Peñas et al., 2014; Fischer et al., 2016; Pintor et al., 2014; Sánchez et al., 2014), revelando uma hiper-reactividade simpática, pelo que, os resultados obtidos corroboram os descritos anteriormente.

A catalase é uma enzima antioxidante que desempenha o importante papel ao degradar o H_2O_2 a H_2O , contribuindo para a manutenção de um ambiente oxidativo adequado aos organismos vivos. Esta enzima não é segregada pelas glândulas salivares pelo que a concentração na saliva reflete a sua concentração plasmática (Bosch, 2014). Estudos anteriores revelaram uma atividade da catalase inferior no sangue de doentes com fibromialgia comparativamente com indivíduos saudáveis (Sarifakioğlu et al., 2014; Shukla et al., 2020; Soliman et al., 2016), o que poderá indicar que doentes com fibromialgia são mais suscetíveis aos efeitos nefastos das ROS. No entanto, no presente estudo, não foram detetadas diferenças significativas entre os grupos na atividade da catalase, provavelmente pelo facto de as concentrações salivares, no repouso, serem relativamente baixas.

Após a prova de esforço, observou-se um aumento significativo na HR máxima e média, índice SNS, LF e HF/LF e uma redução de RR, índice SNP e HF no grupo controlo. No grupo da fibromialgia registaram-se alterações na HR máxima e média, intervalos RR e LF, no entanto, a variação neste grupo foi atenuada em relação ao grupo controlo, principalmente a HR máxima, que varia 6% no grupo da fibromialgia e 25% no grupo controlo. No entanto, os resultados do esforço percebido tinham revelado que ambos os grupos aumentaram significativamente a percepção do esforço. Os resultados obtidos podem ser explicados pela disautonomia que os doentes com fibromialgia apresentam. A disautonomia consiste na hiper-reactividade do sistema nervoso autónomo em repouso e hipo-reactividade perante situações

de stress (Furlan et al., 2005) No mesmo sentido, estudos anteriores revelaram disautonomia em doentes com fibromialgia. A fibromialgia pode levar à incompetência cronotrópica e à incapacidade em aumentar a frequência cardíaca com o aumento da intensidade do exercício (da Cunha Ribeiro et al., 2011; Villafaina et al., 2022).

Quanto aos parâmetros salivares, a prova de esforço causou um aumento significativo na atividade da catalase no grupo controlo. Parâmetros salivares como o fluxo, a concentração proteica total e atividade da α -amilase, dependentes de estímulos do SNA nas glândulas salivares (Proctor & Carpenter, 2007), não apresentaram alterações significativas com a prova de esforço no grupo controlo. De facto, as alterações nos parâmetros bioquímicos salivares parecem estar dependentes do tipo e intensidade do exercício físico (Leaf et al., 1997; Miočević et al., 2017; Souza et al., 2019). Por exemplo, a concentração proteica total e a atividade da α -amilase, parâmetros que estão correlacionados, como mostrámos neste trabalho, tendem a aumentar imediatamente após o exercício muito intenso (Bortolini et al., 2009; Li & Gleeson, 2004; Ligtenberg et al., 2015; Souza et al., 2019; Walsh et al., 1999), mas não após exercício moderado (Ligtenberg et al., 2015). Neste trabalho, a taxa de percepção de esforço (RPE) após a prova de esforço foi de 12.75 ± 3.34 e 14.69 ± 3.17 no grupo controlo e grupo com fibromialgia, respetivamente, o que corresponde a um esforço ligeiro a forte (Borg, 1998). Também os resultados observados na variabilidade da frequência cardíaca mostram que o plano de exercício aplicado implicou esforço, embora a ativação adrenérgica associada não tivesse sido elevada o suficiente para induzir alterações na secreção salivar. O aumento da atividade catalase observada no grupo controlo deve refletir o esperável aumento desta variável no sangue após atividade física (Soliman et al., 2016).

Comparando as variações dos parâmetros salivares após a prova de esforço no grupo da fibromialgia com as verificadas no grupo controlo, a alteração mais significativa ocorreu no fluxo salivar, que reduziu 45,16% no grupo da fibromialgia não tendo apresentado variações significativas no grupo controlo. Assim, pode-se deduzir que a prova de esforço induziu uma inibição mais forte do sistema nervoso parassimpático em indivíduos com fibromialgia do que em indivíduos saudáveis. Como os valores dos parâmetros da HRV também corroboram, há evidências de que o sistema nervoso simpático já está mais ativo do que o sistema nervoso parassimpático em doentes com fibromialgia comparativamente com indivíduos saudáveis, mesmo em repouso (Martínez-Lavín et al., 1997; Staud, 2008). No entanto, em doentes com fibromialgia, a atividade da catalase não se alterou após a prova de

esforço como observado no grupo controlo. Talvez a redução do fluxo salivar, que ocorre por inibição do sistema nervoso parassimpático (Altindag & Celik, 2006; Schamne et al., 2021; Souza et al., 2019), não tenha promovido a transferência de enzimas do sangue para a saliva, justificando atividade semelhante da catalase salivar antes e após a prova de esforço em pessoas com fibromialgia. De facto, Soliman, El-Olemy, Hassan, Shaker e Abdullah demonstraram uma maior atividade da catalase plasmática após o exercício em doentes com fibromialgia (Soliman et al., 2016).

No que respeita à glutationo peroxidase (GPx), uma enzima antioxidante que faz parte do metabolismo do glutationo, responsável por neutralizar o H_2O_2 a H_2O com a oxidação concomitante do glutationo reduzido (GSH) a dissulfeto de glutationo (GSSG), não foram encontradas diferenças significativas entre ou dentro dos grupos. A baixa concentração em compostos ricos em tiol (incluindo glutationo) foi descrita em amostras de sangue provenientes de doentes com fibromialgia (Sarıkakioğlu et al., 2014; Soliman et al., 2016). Além disso, encontrou-se uma reduzida atividade da GPx em glóbulos vermelhos de doentes com fibromialgia (Soliman et al., 2016), resultados que corroboram uma capacidade antioxidante inferior em doentes com esta patologia (Altindag & Celik, 2006; Bagis et al., 2005; Neyal et al., 2013; Sarıkakioğlu et al., 2014; Shukla et al., 2020; Soliman et al., 2016). Contudo, a atividade da GPx salivar não se mostrou um bom marcador desta característica, provavelmente devido a uma reduzida atividade salivar desta enzima.

Limitações do estudo

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser reconhecidas.

Em primeiro lugar, foram detetadas diferenças na idade e no índice de massa corporal entre os grupos no início do estudo. Embora estas variáveis tenham sido incluídas na análise através da ANCOVA, há sempre um potencial erro associado que pode permanecer. No entanto, o estudo seguiu a linha de um estudo anterior que analisou a resposta ao exercício de doentes com fibromialgia e de controlos saudáveis (RPT et al., 2017).

Em segundo lugar, o plano de exercício proposto no presente estudo focou-se na fadiga muscular. São necessários estudos futuros que tenham como objetivo avaliar se os resultados se repetem ao usar um protocolo geral de fadiga, como um teste de caminhada, por exemplo.

Há ainda a ter em conta que foram apenas avaliadas mulheres neste estudo.

CAPÍTULO VI: CONCLUSÕES



6. Conclusões

Os resultados apresentados nesta dissertação evidenciam que, mesmo em repouso, há parâmetros associados à variabilidade da frequência cardíaca, como o índice de stress e as frequências altas e baixas (HF, LF), que estão modificadas em doentes com fibromialgia. Também a atividade da α -amilase salivar, associada a estimulação adrenérgica, surge aumentada em doentes com fibromialgia relativamente a indivíduos saudáveis.

Este trabalho permitiu ainda evidenciar que em doentes com fibromialgia há uma incapacidade de resposta a indutores de stress, demonstrada pela alteração de parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca com a aplicação de uma prova de esforço.

É de salientar também a fraca alteração que a prova de esforço induziu nos parâmetros associados à atividade do ramo simpático do SNA no grupo das doentes com fibromialgia. Pelo contrário, no grupo controlo, a prova de esforço induziu alterações significativas nestes parâmetros, o que comprova a incapacidade de adaptação do organismo dos doentes com fibromialgia a indutores de stress.

No seu conjunto, os resultados deste trabalho permitem-nos apontar como potenciais marcadores de diagnóstico de fibromialgia uma atividade da α -amilase salivar mais elevada, no repouso, associados a uma redução do fluxo salivar e da atividade da catalase, após a aplicação de uma prova de esforço muscular, por comparação com valores de indivíduos saudáveis.

Mais estudos deverão ser realizados no futuro para avaliar a hipótese formulada no presente trabalho, a fim de encontrar biomarcadores de diagnóstico para a fibromialgia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Referências Bibliográficas

- Adığuzel, K. T., Köröḡlu, Ö., Yaşar, E., Tan, A. K., & Samur, G. (2022). *The relationship between dietary total antioxidant capacity, clinical parameters, and oxidative stress in fibromyalgia syndrome: A novel point of view*. 68(2), 262–270. <https://doi.org/10.5606/tfrd.2022.9741>
- Ahn, J. (2020). Heart Rate Variability Assessment using the Poincare Plot Parameters during Sleep. *International Journal of Engineering Research and Technology*, 13, 1921. <https://doi.org/10.37624/IJERT/13.8.2020.1921-1926>
- Alentorn-Geli, E., Padilla, J., Moras, G., Lázaro Haro, C., & Fernández-Solà, J. (2008). Six weeks of whole-body vibration exercise improves pain and fatigue in women with fibromyalgia. *Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)*, 14(8), 975–981. <https://doi.org/10.1089/acm.2008.0050>
- Altindag, O., & Celik, H. (2006). Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 11(3), 131–135. <https://doi.org/10.1179/135100006X116628>
- Arhakis, A., Karagiannis, V., & Kalfas, S. (2013). Salivary alpha-amylase activity and salivary flow rate in young adults. *The Open Dentistry Journal*, 7, 7–15. <https://doi.org/10.2174/1874210601307010007>
- Ashton, T., Rowlands, C. C., Jones, E., Young, I. S., Jackson, S. K., Davies, B., & Peters, J. R. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 77(6), 498–502. <https://doi.org/10.1007/s004210050366>
- Bagis, S., Tamer, L., Sahin, G., Bilgin, R., Guler, H., Ercan, B., & Erdogan, C. (2005). Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatology International*, 25(3), 188–190. <https://doi.org/10.1007/s00296-003-0427-8>
- Bajpai, A., Verma, A. K., Srivastava, M., & Srivastava, R. (2014). Oxidative stress and major depression. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(12), CC04-7. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/10258.5292>
- Barreto, D., & Madeiro, J. (2018). *COMPARAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DO COMPLEXO QRS DO SINAL ELETROCARDIOGRAMA*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24658.25284>
- Bazzichi, L., Ciregia, F., Giusti, L., Baldini, C., Giannaccini, G., Giacomelli, C., Sernissi, F., Bombardieri, S., & Lucacchini, A. (2009). Detection of potential markers of primary fibromyalgia syndrome in human saliva. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 3(11), 1296–1304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prca.200900076>
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 87(4), 1620–1624.
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1620>
- Bengtsson, A. (2002). The muscle in fibromyalgia. *Rheumatology*, 41(7), 721–724.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/41.7.721>
- Bengtsson, A., Henriksson, K. G., & Larsson, J. (1986). Muscle biopsy in primary fibromyalgia. Light-microscopical and histochemical findings. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 15(1), 1–6. <https://doi.org/10.3109/03009748609092661>
- Bilici, M., Efe, H., Körögöl, M. A., Uydu, H. A., Bekaroğlu, M., & Değer, O. (2001). Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders*, 64(1), 43–51.
[https://doi.org/10.1016/s0165-0327\(00\)00199-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0327(00)00199-3)
- Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. (2001). *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95.
<https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Bishop, N. C., Blannin, A. K., Armstrong, E., Rickman, M., & Gleeson, M. (2000). Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(12), 2046–2051.
<https://doi.org/10.1097/00005768-200012000-00013>
- Borchers, A. T., & Gershwin, M. E. (2015). Fibromyalgia: A Critical and Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 49(2), 100–151.
<https://doi.org/10.1007/s12016-015-8509-4>
- Borg, G. (1998). Borg's perceived exertion and pain scales. In *Borg's perceived exertion and pain scales*. Human Kinetics.
- Bortolini, M. J. S., De Agostini, G. G., Reis, I. T., Lamounier, R. P. M. S., Blumberg, J. B., & Espindola, F. S. (2009). Total protein of whole saliva as a biomarker of anaerobic threshold. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, 80(3), 604–610.
<https://doi.org/10.1080/02701367.2009.10599599>
- Bosch, J. A. (2014). The Use of Saliva Markers in Psychobiology: Mechanisms and Methods. In *Monographs in Oral Science* (Vol. 24, pp. 99–108).
<https://doi.org/10.1159/000358864>
- Bosch, J. A., Veerman, E. C. I., de Geus, E. J., & Proctor, G. B. (2011). α -Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet! *Psychoneuroendocrinology*, 36(4), 449–453.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.12.019>
- Boughton-Smith, N. K., Evans, S. M., & Whittle, B. J. R. (1994). Characterisation of nitric oxide synthase activity in the rat colonic mucosa and muscle after endotoxin and in a model of colitis. *Agents and Actions*, 41(2), C223–C225.
<https://doi.org/10.1007/BF01987646>
- Bradley, L. A. (2009). Pathophysiology of fibromyalgia. *The American Journal of Medicine*, 122(12 Suppl), S22-30. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.09.008>

- Brennan, M., Palaniswami, M., & Kamen, P. (2001). Do existing measures of Poincaré plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 48(11), 1342–1347. <https://doi.org/10.1109/10.959330>
- Britt, S. G., Chiu, V. W., Redpath, G. T., & VandenBerg, S. R. (1992). Elimination of ascorbic acid-induced membrane lipid peroxidation and serotonin receptor loss by Trolox-C, a water soluble analogue of vitamin E. *Journal of Receptor Research*, 12(2), 181–200. <https://doi.org/10.3109/10799899209074791>
- Buckelew, S. P., Conway, R., Parker, J., Deuser, W. E., Read, J., Witty, T. E., Hewett, J. E., Minor, M., Johnson, J. C., Van Male, L., McIntosh, M. J., Nigh, M., & Kay, D. R. (1998). Biofeedback/relaxation training and exercise interventions for fibromyalgia: a prospective trial. *Arthritis Care and Research : The Official Journal of the Arthritis Health Professions Association*, 11(3), 196–209. <https://doi.org/10.1002/art.1790110307>
- Burton, D. A., Stokes, K., & Hall, G. M. (2004). Physiological effects of exercise. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 4(6), 185–188. [https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkh050](https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkh050)
- Busch, A. J., Webber, S. C., Brachaniec, M., Bidonde, J., Bello-Haas, V. D., Danyliw, A. D., Overend, T. J., Richards, R. S., Sawant, A., & Schachter, C. L. (2011). Exercise therapy for fibromyalgia. *Current Pain and Headache Reports*, 15(5), 358–367. <https://doi.org/10.1007/s11916-011-0214-2>
- Busch, L., Sterin-Borda, L., & Borda, E. (2002). Differences in the regulatory mechanism of amylase release by rat parotid and submandibular glands. *Archives of Oral Biology*, 47(10), 717–722. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(02\)00057-2](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(02)00057-2)
- Cesare, P., & McNaughton, P. (1997). Peripheral pain mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(4), 493–499. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80028-1](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80028-1)
- Chicharro, J. L., Lucía, A., Pérez, M., Vaquero, A. F., & Ureña, R. (1998). Saliva composition and exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 26(1), 17–27. <https://doi.org/10.2165/00007256-199826010-00002>
- Cipryian, L. (2018). The effect of fitness level on cardiac autonomic regulation, IL-6, total antioxidant capacity, and muscle damage responses to a single bout of high-intensity interval training. *Journal of Sport and Health Science*, 7(3), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2016.11.001>
- Ciregia, F., Giacomelli, C., Giusti, L., Boldrini, C., Piga, I., Pepe, P., Consensi, A., Gori, S., Lucacchini, A., Mazzoni, M. R., & Bazzichi, L. (2019). Putative salivary biomarkers useful to differentiate patients with fibromyalgia. *Journal of Proteomics*, 190, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.012>
- Clauw, D. J., D'Arcy, Y., Gebke, K., Semel, D., Pauer, L., & Jones, K. D. (2018). Normalizing fibromyalgia as a chronic illness. *Postgraduate Medicine*, 130(1), 9–18. <https://doi.org/10.1080/00325481.2018.1411743>
- Cohen, H., Neumann, L., Shore, M., Amir, M., Cassuto, Y., & Buskila, D. (2000). Autonomic dysfunction in patients with fibromyalgia: application of power spectral

- analysis of heart rate variability. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 29(4), 217–227. [https://doi.org/10.1016/s0049-0172\(00\)80010-4](https://doi.org/10.1016/s0049-0172(00)80010-4)
- Cordero, M. D., de Miguel, M., Carmona-López, I., Bonal, P., Campa, F., & Moreno-Fernández, A. M. (2010). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in fibromyalgia. *Neuro Endocrinology Letters*, 31(2), 169–173.
- Cordero, M. D., Moreno-Fernández, A. M., deMiguel, M., Bonal, P., Campa, F., Jiménez-Jiménez, L. M., Ruiz-Losada, A., Sánchez-Domínguez, B., Sánchez Alcázar, J. A., Salviati, L., & Navas, P. (2009). Coenzyme Q10 distribution in blood is altered in patients with fibromyalgia. *Clinical Biochemistry*, 42(7–8), 732–735. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.12.010>
- Culp, D. J., Graham, L. A., Latchney, L. R., & Hand, A. R. (1991). Rat sublingual gland as a model to study glandular mucous cell secretion. *The American Journal of Physiology*, 260(6 Pt 1), C1233-44. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.260.6.C1233>
- da Cunha Ribeiro, R. P., Roschel, H., Artioli, G. G., Dassouki, T., Perandini, L. A., Calich, A. L., de Sá Pinto, A. L., Lima, F. R., Bonfá, E., & Gualano, B. (2011). Cardiac autonomic impairment and chronotropic incompetence in fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*, 13(6), R190. <https://doi.org/10.1186/ar3519>
- Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61, 1–31. <https://doi.org/10.1042/bss0610001>
- De Vito, G., Galloway, S. D. R., Nimmo, M. A., Maas, P., & McMurray, J. J. V. (2002). Effects of central sympathetic inhibition on heart rate variability during steady-state exercise in healthy humans. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 22(1), 32–38. <https://doi.org/10.1046/j.1475-097x.2002.00395.x>
- Dinler, M., Diracoglu, D., Kasikcioglu, E., Sayli, O., Akin, A., Aksoy, C., Oncel, A., & Berker, E. (2009). Effect of aerobic exercise training on oxygen uptake and kinetics in patients with fibromyalgia. *Rheumatology International*, 30(2), 281–284. <https://doi.org/10.1007/s00296-009-1126-x>
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186, 421–431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-i](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-i)
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Earnest, C. P., Lavie, C. J., Blair, S. N., & Church, T. S. (2008). Heart rate variability characteristics in sedentary postmenopausal women following six months of exercise training: the DREW study. *PloS One*, 3(6), e2288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002288>
- Edgar, W. M. (1990). Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *British Dental Journal*, 169(3–4), 96–98. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4807284>
- Emmelin, N. (1987). Nerve Interactions in Salivary Glands. *Journal of Dental Research*,

- 66(2), 509–517. <https://doi.org/10.1177/00220345870660022101>
- Eston, R. G., Davies, B. L., & Williams, J. G. (1987). Use of perceived effort ratings to control exercise intensity in young healthy adults. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 56(2), 222–224.
<https://doi.org/10.1007/BF00640648>
- Evans, P. H. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin*, 49(3), 577–587. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072632>
- Fatima, G., Das, S. K., & Mahdi, A. A. (2017). Some oxidative and antioxidative parameters and their relationship with clinical symptoms in women with fibromyalgia syndrome. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 20(1), 39–45.
<https://doi.org/10.1111/1756-185X.12550>
- Fecondo, J. V., & Augusteyn, R. C. (1983). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens. *Experimental Eye Research*, 36(1), 15–23.
[https://doi.org/10.1016/0014-4835\(83\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0014-4835(83)90085-4)
- Fernández-de-las-Peñas, C., Peñacoba-Puente, C., Cigarrán-Méndez, M., Díaz-Rodríguez, L., Rubio-Ruiz, B., & Arroyo-Morales, M. (2014). Has catechol-O-methyltransferase genotype (Val158Met) an influence on endocrine, sympathetic nervous and humoral immune systems in women with fibromyalgia syndrome? *The Clinical Journal of Pain*, 30(3), 199–204. <https://doi.org/10.1097/AJP.0b013e3182928da0>
- Figueroa, A., Kingsley, J. D., McMillan, V., & Panton, L. B. (2008). Resistance exercise training improves heart rate variability in women with fibromyalgia. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 28(1), 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.2007.00776.x>
- Fischer, S., Doerr, J. M., Strahler, J., Mewes, R., Thieme, K., & Nater, U. M. (2016). Stress exacerbates pain in the everyday lives of women with fibromyalgia syndrome—The role of cortisol and alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology*, 63, 68–77.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.09.018>
- Fisher-Wellman, K., & Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine : DM*, 8, 1. <https://doi.org/10.1186/1476-5918-8-1>
- Fitzcharles, M.-A., Ste-Marie, P. A., Goldenberg, D. L., Pereira, J. X., Abbey, S., Choinière, M., Ko, G., Moulin, D. E., Panopalis, P., Proulx, J., & Shir, Y. (2013). 2012 Canadian Guidelines for the diagnosis and management of fibromyalgia syndrome: executive summary. *Pain Research & Management*, 18(3), 119–126.
<https://doi.org/10.1155/2013/918216>
- Freeman, J. V., Dewey, F. E., Hadley, D. M., Myers, J., & Froelicher, V. F. (2006). Autonomic nervous system interaction with the cardiovascular system during exercise. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 48(5), 342–362.
<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2005.11.003>
- Fritz, C. O., Morris, P. E., & Richler, J. J. (2012). Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. *Journal of Experimental Psychology. General*, 141(1), 2–18. <https://doi.org/10.1037/a0024338>

- Fuller-Thomson, E., Nimigon-Young, J., & Brennenstuhl, S. (2012). Individuals with fibromyalgia and depression: findings from a nationally representative Canadian survey. *Rheumatology International*, 32(4), 853–862. <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1713-x>
- Furlan, R., Colombo, S., Perego, F., Atzeni, F., Diana, A., Barbic, F., Porta, A., Pace, F., Malliani, A., & Sarzi-Puttini, P. (2005). Abnormalities of cardiovascular neural control and reduced orthostatic tolerance in patients with primary fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 32(9), 1787–1793.
- Gleeson, M., Lancaster, G. I., & Bishop, N. C. (2001). Nutritional strategies to minimise exercise-induced immunosuppression in athletes. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne de Physiologie Appliquée*, 26 Suppl, S23-35. <https://doi.org/10.1139/h2001-039>
- Goldenberg, D. L., Burckhardt, C., & Crofford, L. (2004). Management of Fibromyalgia Syndrome. *JAMA*, 292(19), 2388–2395. <https://doi.org/10.1001/jama.292.19.2388>
- Gomez-Cabrera, M. C., Salvador-Pascual, A., Cabo, H., Ferrando, B., & Viña, J. (2015). Redox modulation of mitochondrial biogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? *Free Radical Biology & Medicine*, 86, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.006>
- Gomez-Cabrera, M. C., Viña, J., & Ji, L. L. (2016). Role of Redox Signaling and Inflammation in Skeletal Muscle Adaptations to Training. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/antiox5040048>
- González, D., Marquina, R., Rondón, N., Rodriguez-Malaver, A. J., & Reyes, R. (2008). Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. *Research in Sports Medicine (Print)*, 16(2), 128–137. <https://doi.org/10.1080/15438620802103700>
- Gorr, S.-U., Venkatesh, S. G., & Darling, D. S. (2005). Parotid secretory granules: crossroads of secretory pathways and protein storage. *Journal of Dental Research*, 84(6), 500–509. <https://doi.org/10.1177/154405910508400604>
- Gowans, S. E., deHueck, A., Voss, S., Silaj, A., Abbey, S. E., & Reynolds, W. J. (2001). Effect of a randomized, controlled trial of exercise on mood and physical function in individuals with fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, 45(6), 519–529. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200112\)45:6<519::aid-art377>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200112)45:6<519::aid-art377>3.0.co;2-3)
- Gracely, R. H., Ceko, M., & Bushnell, M. C. (2012). Fibromyalgia and depression. *Pain Research and Treatment*, 2012, 486590. <https://doi.org/10.1155/2012/486590>
- Hackshaw, K. V. (2021). The Search for Biomarkers in Fibromyalgia. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020156>
- Häkkinen, A., Häkkinen, K., Hannonen, P., & Alen, M. (2001). Strength training induced adaptations in neuromuscular function of premenopausal women with fibromyalgia: comparison with healthy women. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60(1), 21–26. <https://doi.org/10.1136/ard.60.1.21>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*.

<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

- Han, C.-L., Sheng, Y.-C., Wang, S.-Y., Chen, Y.-H., & Kang, J.-H. (2021). Author Correction: Serum proteome profiles revealed dysregulated proteins and mechanisms associated with fibromyalgia syndrome in women. In *Scientific reports* (Vol. 11, Issue 1, p. 8478). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88212-9>
- Hargreaves, M., & Spriet, L. L. (2020). Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature Metabolism*, 2(9), 817–828. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4>
- Häuser, W., Klose, P., Langhorst, J., Moradi, B., Steinbach, M., Schiltenwolf, M., & Busch, A. (2010). Efficacy of different types of aerobic exercise in fibromyalgia syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Arthritis Research & Therapy*, 12(3), R79. <https://doi.org/10.1186/ar3002>
- Heath, G. W., Ford, E. S., Craven, T. E., Macera, C. A., Jackson, K. L., & Pate, R. R. (1991). Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 23(2), 152–157.
- Hendrix, J., Nijs, J., Ickmans, K., Godderis, L., Ghosh, M., & Polli, A. (2020). The Interplay between Oxidative Stress, Exercise, and Pain in Health and Disease: Potential Role of Autonomic Regulation and Epigenetic Mechanisms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/antiox9111166>
- Hoshi, R. A., Pastre, C. M., Vanderlei, L. C. M., & Godoy, M. F. (2013). Poincaré plot indexes of heart rate variability: relationships with other nonlinear variables. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 177(2), 271–274. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.05.004>
- Howley, E. T. (2001). Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33(6 Suppl), S364-9; discussion S419-20. <https://doi.org/10.1097/00005768-200106001-00005>
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>
- Ilhan, N., Kamanli, A., Ozmerdivenli, R., & Ilhan, N. (2004). Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Archives of Medical Research*, 35(4), 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2004.03.006>
- Illescas-Montes, R., Costela-Ruiz, V. J., Melguizo-Rodríguez, L., De Luna-Bertos, E., Ruiz, C., & Ramos-Torrecillas, J. (2021). Application of Salivary Biomarkers in the Diagnosis of Fibromyalgia. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010063>
- Inanıcı, F., Ozdemir, O., Aydoğ, T., Sendil, A., Kutsal, Y. G., & Hasçelik, Z. (2011). The frequency of fibromyalgia in sport professionals. In *Rheumatology international* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1121–1122). <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1567-2>
- Iorgulescu, G. (2009). Saliva between normal and pathological. Important factors in determining systemic and oral health. *Journal of Medicine and Life*, 2(3), 303–307.

- Jackson, M. J., Edwards, R. H., & Symons, M. C. (1985). Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 847(2), 185–190. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(85\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0167-4889(85)90019-9)
- Ji, L. L., Leeuwenburgh, C., Leichtweis, S., Gore, M., Fiebig, R., Hollander, J., & Bejma, J. (1998). Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 102–117. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09896.x>
- Jones, C. J., Rutledge, D. N., & Aquino, J. (2010). Predictors of physical performance and functional ability in people 50+ with and without fibromyalgia. *Journal of Aging and Physical Activity*, 18(3), 353–368. <https://doi.org/10.1123/japa.18.3.353>
- Karmakar, C. K., Gubbi, J., Khandoker, A. H., & Palaniswami, M. (2010). Analyzing temporal variability of standard descriptors of Poincaré plots. *Journal of Electrocardiology*, 43(6), 719–724. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2010.09.001>
- Kavanagh, D. A., O'Mullane, D. M., & Smeeton, N. (1998). Variation of salivary flow rate in adolescents. *Archives of Oral Biology*, 43(5), 347–352. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(98\)00020-x](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(98)00020-x)
- Kingsley, J. D., McMillan, V., & Figueroa, A. (2010). The effects of 12 weeks of resistance exercise training on disease severity and autonomic modulation at rest and after acute leg resistance exercise in women with fibromyalgia. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 91(10), 1551–1557. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2010.07.003>
- Kleiger, R. E., Stein, P. K., & Bigger, J. T. J. (2005). Heart rate variability: measurement and clinical utility. *Annals of Noninvasive Electrocardiology : The Official Journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc*, 10(1), 88–101. <https://doi.org/10.1111/j.1542-474X.2005.10101.x>
- Kulshreshtha, P., & Deepak, K. K. (2013). Autonomic nervous system profile in fibromyalgia patients and its modulation by exercise: a mini review. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 33(2), 83–91. <https://doi.org/10.1111/cpf.12000>
- Kumar, C. T., Reddy, V. K., Prasad, M., Thyagaraju, K., & Reddanna, P. (1992). Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 111(1–2), 109–115. <https://doi.org/10.1007/BF00229581>
- Lamy, E., Simões, C., Rodrigues, L., Costa, A. R., Vitorino, R., Amado, F., Antunes, C., & do Carmo, I. (2015). Changes in the salivary protein profile of morbidly obese women either previously subjected to bariatric surgery or not. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71(4), 691–702. <https://doi.org/10.1007/s13105-015-0434-8>
- Leaf, D. A., Kleinman, M. T., Hamilton, M., & Barstow, T. J. (1997). The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 29(8), 1036–1039. <https://doi.org/10.1097/00005768-199708000-00008>
- Li, T.-L., & Gleeson, M. (2004). The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling and circadian variation on saliva flow rate, immunoglobulin A and alpha-amylase responses. *Journal of Sports Sciences*, 22(11–12), 1015–1024.

<https://doi.org/10.1080/02640410410001716733>

- Ligtenberg, A. J. M., Brand, H. S., van den Keijbus, P. A. M., & Veerman, E. C. I. (2015). The effect of physical exercise on salivary secretion of MUC5B, amylase and lysozyme. *Archives of Oral Biology*, 60(11), 1639–1644.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.07.012>
- Lindh, M., Johansson, G., Hedberg, M., Henning, G. B., & Grimby, G. (1995). Muscle fiber characteristics, capillaries and enzymes in patients with fibromyalgia and controls. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 24(1), 34–37.
<https://doi.org/10.3109/03009749509095152>
- Lindman, R., Hagberg, M., Bengtsson, A., Henriksson, K. G., & Thornell, L.-E. (1995). Capillary Structure and Mitochondrial Volume Density in the Trapezius Muscle of Chronic Trapezius Myalgia, Fibromyalgia and Healthy Subjects. *Journal of Musculoskeletal Pain*, 3(3), 5–22. https://doi.org/10.1300/J094v03n03_02
- Ljungberg, G., Ericson, T., Ekblom, B., & Birkhed, D. (1997). Saliva and marathon running. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 7(4), 214–219.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.1997.tb00142.x>
- Lombardi, F., Malliani, A., Pagani, M., & Cerutti, S. (1996). Heart rate variability and its sympatho-vagal modulation. *Cardiovascular Research*, 32(2), 208–216.
[https://doi.org/10.1016/0008-6363\(96\)00116-2](https://doi.org/10.1016/0008-6363(96)00116-2)
- Loo, J. A., Yan, W., Ramachandran, P., & Wong, D. T. (2010). Comparative human salivary and plasma proteomes. *Journal of Dental Research*, 89(10), 1016–1023.
<https://doi.org/10.1177/0022034510380414>
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., & Belcastro, A. N. (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 56(3), 313–316.
<https://doi.org/10.1007/BF00690898>
- Lund, E., Kendall, S. A., Janerot-Sjøberg, B., & Bengtsson, A. (2003). Muscle metabolism in fibromyalgia studied by P-31 magnetic resonance spectroscopy during aerobic and anaerobic exercise. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 32(3), 138–145.
<https://doi.org/10.1080/03009740310002461>
- Lund, N., Bengtsson, A., & Thorborg, P. (1986). Muscle tissue oxygen pressure in primary fibromyalgia. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 15(2), 165–173.
<https://doi.org/10.3109/03009748609102084>
- Mannerkorpi, K., Burckhardt, C. S., & Bjelle, A. (1994). Physical performance characteristics of women with fibromyalgia. *Arthritis Care and Research : The Official Journal of the Arthritis Health Professions Association*, 7(3), 123–129.
<https://doi.org/10.1002/art.1790070305>
- Martin, L., Nutting, A., MacIntosh, B. R., Edworthy, S. M., Butterwick, D., & Cook, J. (1996). An exercise program in the treatment of fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 23(6), 1050–1053.
- Martinez-Lavin, M. (2004). Fibromyalgia as a sympathetically maintained pain syndrome.

Current Pain and Headache Reports, 8(5), 385–389. <https://doi.org/10.1007/s11916-996-0012-4>

Martínez-Lavín, M., Hermosillo, A. G., Mendoza, C., Ortiz, R., Cajigas, J. C., Pineda, C., Nava, A., & Vallejo, M. (1997). Orthostatic sympathetic derangement in subjects with fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 24(4), 714–718.

Martínez-Lavín, M., Hermosillo, A. G., Rosas, M., & Soto, M. E. (1998). Circadian studies of autonomic nervous balance in patients with fibromyalgia: a heart rate variability analysis. *Arthritis and Rheumatism*, 41(11), 1966–1971. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199811\)41:11<1966::AID-ART11>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199811)41:11<1966::AID-ART11>3.0.CO;2-O)

Matata, B. M., & Galiñanes, M. (2002). Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 2330–2335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106393200>

Matos-Gomes, N., Katsurayama, M., Makimoto, F. H., Santana, L. L. O., Paredes-Garcia, E., Becker, M. A. d'Avila, & Dos-Santos, M. C. (2010). Psychological stress and its influence on salivary flow rate, total protein concentration and IgA, IgG and IgM titers. *Neuroimmunomodulation*, 17(6), 396–404. <https://doi.org/10.1159/000292064>

McArdle, A., Vasilaki, A., & Jackson, M. (2002). Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews*, 1(1), 79–93. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(01\)00368-2](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00368-2)

McCain, G. A., Bell, D. A., Mai, F. M., & Halliday, P. D. (1988). A controlled study of the effects of a supervised cardiovascular fitness training program on the manifestations of primary fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, 31(9), 1135–1141. <https://doi.org/10.1002/art.1780310908>

McLoughlin, M. J., Stegner, A. J., & Cook, D. B. (2011). The relationship between physical activity and brain responses to pain in fibromyalgia. *The Journal of Pain*, 12(6), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.12.004>

Mease, P. (2005). Fibromyalgia syndrome: review of clinical presentation, pathogenesis, outcome measures, and treatment. *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 75, 6–21.

Meeus, M., Goubert, D., De Backer, F., Struyf, F., Hermans, L., Coppieters, I., De Wandele, I., Da Silva, H., & Calders, P. (2013). Heart rate variability in patients with fibromyalgia and patients with chronic fatigue syndrome: a systematic review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 43(2), 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2013.03.004>

Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., & Sharma, P. L. (2013). Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, 698(1–3), 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>

Mengshoel, A. M., Komnaes, H. B., & Førre, O. (1992). The effects of 20 weeks of physical fitness training in female patients with fibromyalgia. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 10(4), 345–349.

- Mengshoel, A. M., Vøllestad, N. K., & Førre, O. (1995). Pain and fatigue induced by exercise in fibromyalgia patients and sedentary healthy subjects. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 13(4), 477–482.
- Miller, T. A., Allen, G. M., & Gandevia, S. C. (1996). Muscle force, perceived effort, and voluntary activation of the elbow flexors assessed with sensitive twitch interpolation in fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 23(9), 1621–1627.
<http://europepmc.org/abstract/MED/8877935>
- Miočević, O., Cole, C. R., Laughlin, M. J., Buck, R. L., Slowey, P. D., & Shirtcliff, E. A. (2017). Quantitative Lateral Flow Assays for Salivary Biomarker Assessment: A Review. *Frontiers in Public Health*, 5(June). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00133>
- Nater, U. M., & Rohleder, N. (2009). Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4), 486–496.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.014>
- Neumamm, L., Santos, E., & Giannella-Neto, A. (2011). *ESTUDO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM EXERCÍCIO PROGRESSIVO MÁXIMO*.
- Neyal, M., Yimenicioglu, F., Aydeniz, A., Taskin, A., Saglam, S., Cekmen, M., Neyal, A., Gursoy, S., Erel, O., & Balat, A. (2013). Plasma nitrite levels, total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with tension-type headache and fibromyalgia. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 115(6), 736–740.
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.08.028>
- Nørregaard, J., Bülow, P. M., Mehlsen, J., & Danneskiold-Samsøe, B. (1994). Biochemical changes in relation to a maximal exercise test in patients with fibromyalgia. *Clinical Physiology (Oxford, England)*, 14(2), 159–167. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097x.1994.tb00502.x>
- Novas, A. M. P., Rowbottom, D. G., & Jenkins, D. G. (2003). Tennis, incidence of URTI and salivary IgA. *International Journal of Sports Medicine*, 24(3), 223–229.
<https://doi.org/10.1055/s-2003-39096>
- Ozgocmen, S., Ozyurt, H., Sogut, S., & Akyol, O. (2006). Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide. *Rheumatology International*, 26(7), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s00296-005-0078-z>
- Panton, L. B., Figueroa, A., Kingsley, J. D., Hornbuckle, L., Wilson, J., St John, N., Abood, D., Mathis, R., VanTassel, J., & McMillan, V. (2009). Effects of resistance training and chiropractic treatment in women with fibromyalgia. *Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)*, 15(3), 321–328.
<https://doi.org/10.1089/acm.2008.0132>
- Peake, J., Nosaka, K., & Suzuki, K. (2005). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exercise Immunology Review*, 11, 64–85.
- Peres, A., Da Silva, I. M., Santos, M., Beretta, Â., Andrade, V. M., Romão, P. R. T., & Dorneles, G. P. (2021). DNA damage in mononuclear cells following maximal exercise in sedentary and physically active lean and obese men. *European Journal of Sport*

Science, 21(7), 1073–1082. <https://doi.org/10.1080/17461391.2020.1801850>

- Peters, E. M., & Bateman, E. D. (1983). Ultramarathon running and upper respiratory tract infections. An epidemiological survey. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, 64(15), 582–584.
- Pintor, F.-M., Fusté, A., Ruiz Rodríguez, J., Ardid, J., & Gourlot, A. (2014). Niveles de α -amilasa seriada salival en mujeres con fibromialgia. *Cuadernos de Medicina Psicosomática y Psiquiatría de Enlace*; ISSN: 1695-4238, 110, 18–24.
- Préville, X., Salvemini, F., Giraud, S., Chaufour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M. V., & Arrigo, A.-P. (1999). Mammalian Small Stress Proteins Protect against Oxidative Stress through Their Ability to Increase Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity and by Maintaining Optimal Cellular Detoxifying Machinery. *Experimental Cell Research*, 247(1), 61–78. [https://doi.org/https://doi.org/10.1006/excr.1998.4347](https://doi.org/10.1006/excr.1998.4347)
- Proctor, G. B., & Carpenter, G. H. (2007). Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, 133(1), 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.10.006>
- Radak, Z., Zhao, Z., Kolai, E., Ohno, H., & Atalay, M. (2013). Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(10), 1208–1246. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4498>
- Raj, S. R., Brouillard, D., Simpson, C. S., Hopman, W. M., & Abdollah, H. (2000). Dysautonomia among patients with fibromyalgia: a noninvasive assessment. *The Journal of Rheumatology*, 27(11), 2660–2665.
- Rodrigues, L., Mouta, R., Costa, A. R., Pereira, A., Capela e Silva, F., Amado, F., Antunes, C. M., & Lamy, E. (2015). Effects of high-fat diet on salivary α -amylase, serum parameters and food consumption in rats. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 854–862. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.02.015>
- Rohleder, N., Wolf, J. M., Maldonado, E. F., & Kirschbaum, C. (2006). The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiology*, 43(6), 645–652. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2006.00457.x>
- Rooks, D. S., Silverman, C. B., & Kantrowitz, F. G. (2002). The effects of progressive strength training and aerobic exercise on muscle strength and cardiovascular fitness in women with fibromyalgia: a pilot study. *Arthritis and Rheumatism*, 47(1), 22–28. <https://doi.org/10.1002/art.1.10180>
- RPT, E., Mannerkorpi, K., Cider, A., Archer, T., & Wentz, K. (2017). Physiological Adaptation in Women Presenting Fibromyalgia: Comparison with Healthy Controls. *Clinical and Experimental Psychology*, 03. <https://doi.org/10.4172/2471-2701.1000147>
- Sánchez-Domínguez, B., Bullón, P., Román-Malo, L., Marín-Aguilar, F., Alcocer-Gómez, E., Carrión, A. M., Sánchez-Alcazar, J. A., & Cordero, M. D. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and, inflammation common events in skin of patients with Fibromyalgia. *Mitochondrion*, 21, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.01.010>
- Sánchez, P., Sánchez Tormo, J., de Lamo Muñoz, M., & Peiró, G. (2014).

PSICOBIOQUIMICA (ESTRÉS, ANSIEDAD Y DEPRESIÓN) EN FIBROMIALGIA.
Cuadernos Monográficos de Psicobioquímica, 3, 55–68.

- Sarifakioğlu, B., Güzelant, A. Y., Güzel, E. C., Güzel, S., & Kızıler, A. R. (2014). Effects of 12-week combined exercise therapy on oxidative stress in female fibromyalgia patients. *Rheumatology International, 34*(10), 1361–1367.
<https://doi.org/10.1007/s00296-014-2978-2>
- Schamne, J. C., Ressetti, J. C., Lima-Silva, A. E., & Okuno, N. M. (2021). Impaired Cardiac Autonomic Control in Women With Fibromyalgia Is Independent of Their Physical Fitness. *Journal of Clinical Rheumatology : Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases, 27*(6S), S278–S283.
<https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000001518>
- Schenone, N. M. L., Secco, A., Durigan, V., Scarafia, S., Romanini, F. E., & Mamani, M. (2017). THU0479 The prevalence of xerostomia in patients with fibromyalgia. *Annals of the Rheumatic Diseases, 76*(Suppl 2), 387–388.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-eular.2074>
- Shi, M., Wang, X., Yamanaka, T., Ogita, F., Nakatani, K., & Takeuchi, T. (2007). Effects of anaerobic exercise and aerobic exercise on biomarkers of oxidative stress. *Environmental Health and Preventive Medicine, 12*(5), 202–208.
<https://doi.org/10.1265/ehpm.12.202>
- Ship, J. A., Decarli, C., Friedland, R. P., & Baum, B. J. (1990). Diminished Submandibular Salivary Flow in Dementia of the Alzheimer Type. *Journal of Gerontology, 45*(2), M61–M66. <https://doi.org/10.1093/geronj/45.2.M61>
- Shukla, V., Kumar, D. S., Ali, M. A., Agarwal, S., & Khandpur, S. (2020). Nitric oxide, lipid peroxidation products, and antioxidants in primary fibromyalgia and correlation with disease severity. *Journal of Medical Biochemistry, 39*(2), 165–170.
<https://doi.org/10.2478/jomb-2019-0033>
- Simms, R. W., Roy, S. H., Hrovat, M., Anderson, J. J., Skrinar, G., LePoole, S. R., Zerbini, C. A., de Luca, C., & Jolesz, F. (1994). Lack of association between fibromyalgia syndrome and abnormalities in muscle energy metabolism. *Arthritis and Rheumatism, 37*(6), 794–800. <https://doi.org/10.1002/art.1780370603>
- Soares-Miranda, L., Sattelmair, J., Chaves, P., Duncan, G. E., Siscovick, D. S., Stein, P. K., & Mozaffarian, D. (2014). Physical activity and heart rate variability in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation, 129*(21), 2100–2110.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005361>
- Soliman, A. F., El-Olemy, G. G., Hassan, W. A., Shaker, R. H. M., & Abdullah, O. A. (2016). Impact of an intensive dynamic exercise program on oxidative stress and on the outcome in patients with fibromyalgia. *Egyptian Rheumatology and Rehabilitation, 43*(3), 117–123. <https://doi.org/10.4103/1110-161x.189642>
- Souza, A. V., Giolo, J. S., Teixeira, R. R., Vilela, D. D., Peixoto, L. G., Justino, A. B., Caixeta, D. C., Puga, G. M., & Espindola, F. S. (2019). Salivary and Plasmatic Antioxidant Profile following Continuous, Resistance, and High-Intensity Interval Exercise: Preliminary Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019*,

5425021. <https://doi.org/10.1155/2019/5425021>

Speirs, R. L., Herring, J., Cooper, W. D., Hardy, C. C., & Hind, C. R. (1974). The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland. *Archives of Oral Biology*, 19(9), 747–752. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(74\)90161-7](https://doi.org/10.1016/0003-9969(74)90161-7)

Staud, R. (2008). Heart rate variability as a biomarker of fibromyalgia syndrome. *Future Rheumatology*, 3(5), 475–483. <https://doi.org/10.2217/17460816.3.5.475>

Staud, R., & Rodriguez, M. E. (2006). Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 2(2), 90–98. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0091>

Steerenberg, P. A., van Asperen, I. A., van Nieuw Amerongen, A., Biewenga, A., Mol, D., & Medema, G. J. (1997). Salivary levels of immunoglobulin A in triathletes. *European Journal of Oral Sciences*, 105(4), 305–309. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1997.tb00245.x>

Strobel, E. S., Krapf, M., Suckfüll, M., Brückle, W., Fleckenstein, W., & Müller, W. (1997). Tissue oxygen measurement and 31P magnetic resonance spectroscopy in patients with muscle tension and fibromyalgia. *Rheumatology International*, 16(5), 175–180. <https://doi.org/10.1007/BF01330292>

Suárez, V. J. C.-, Parraca, J. A., Silva, V. L., Costa, A. R., & Tomas, P. (2021). DIFFERENCES IN PERIPHERAL VASCULAR RESPONSE OF A FIBROMYALGIA. 8868(11), 1–10. <https://doi.org/10.25242/8868114020212466>

Szabo, M. E., Droy-Lefaix, M. T., Doly, M., & Braquet, P. (1991). Free Radical-Mediated Effects in Reperfusion Injury: A Histologic Study with Superoxide Dismutase and EGB 761 in Rat Retina. *Ophthalmic Research*, 23(4), 225–234. <https://doi.org/10.1159/000267107>

Tarvainen, M. P., Niskanen, J.-P., Lipponen, J. A., Ranta-Aho, P. O., & Karjalainen, P. A. (2014). Kubios HRV--heart rate variability analysis software. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 113(1), 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2013.07.024>

Taylor, J. A., Carr, D. L., Myers, C. W., & Eckberg, D. L. (1998). Mechanisms underlying very-low-frequency RR-interval oscillations in humans. *Circulation*, 98(6), 547–555. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.6.547>

Tomas-Carus, P., Ortega-Alonso, A., Pietiläinen, K. H., Santos, V., Gonçalves, G., H, H., Ramos, J., & Raimundo, A. (2015). A randomized controlled trial on the effects of combined aerobic-resistance exercise on muscle strength and fatigue, glycemic control and health-related quality of life of type 2 diabetes patients. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*.

Tulppo, M. P., Mäkikallio, T. H., Takala, T. E., Seppänen, T., & Huikuri, H. V. (1996). Quantitative beat-to-beat analysis of heart rate dynamics during exercise. *The American Journal of Physiology*, 271(1 Pt 2), H244-52. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.1.H244>

- Ulas, U. H., Unlu, E., Hamamcioglu, K., Odabasi, Z., Cakci, A., & Vural, O. (2006). Dysautonomia in fibromyalgia syndrome: sympathetic skin responses and RR interval analysis. *Rheumatology International*, 26(5), 383–387. <https://doi.org/10.1007/s00296-005-0007-1>
- Valim, V., Oliveira, L., Suda, A., Silva, L., de Assis, M., Barros Neto, T., Feldman, D., & Natour, J. (2003). Aerobic fitness effects in fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 30(5), 1060–1069.
- Valkeinen, H., Häkkinen, A., Hannonen, P., Häkkinen, K., & Alén, M. (2006). Acute heavy-resistance exercise-induced pain and neuromuscular fatigue in elderly women with fibromyalgia and in healthy controls: effects of strength training. *Arthritis and Rheumatism*, 54(4), 1334–1339. <https://doi.org/10.1002/art.21751>
- van Stegeren, A., Rohleder, N., Everaerd, W., & Wolf, O. T. (2006). Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology*, 31(1), 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.05.012>
- Villafaina, S., Biehl-Printes, C., Parraca, J. A., de Oliveira Brauner, F., & Tomas-Carus, P. (2022). What Mathematical Models Are Accurate for Prescribing Aerobic Exercise in Women with Fibromyalgia? *Biology*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biology11050704>
- Walsh, N. P., Blannin, A. K., Clark, A. M., Cook, L., Robson, P. J., & Gleeson, M. (1999). The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. *Journal of Sports Sciences*, 17(2), 129–134. <https://doi.org/10.1080/026404199366226>
- Wang, J.-S., & Huang, Y.-H. (2005). Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *European Journal of Applied Physiology*, 95(4), 290–297. <https://doi.org/10.1007/s00421-005-0005-8>
- Wang, Z.-Q., Porreca, F., Cuzzocrea, S., Galen, K., Lightfoot, R., Masini, E., Muscoli, C., Mollace, V., Ndengele, M., Ischiropoulos, H., & Salvemini, D. (2004). A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(3), 869–878. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.064154>
- Wigers, S. H., Stiles, T. C., & Vogel, P. A. (1996). Effects of aerobic exercise versus stress management treatment in fibromyalgia. A 4.5 year prospective study. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 25(2), 77–86. <https://doi.org/10.3109/03009749609069212>
- Wilmarth, P. A., Riviere, M. A., Rustvold, D. L., Lauten, J. D., Madden, T. E., & David, L. L. (2004). Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *Journal of Proteome Research*, 3(5), 1017–1023. <https://doi.org/10.1021/pr049911o>
- Wolfe, F., Clauw, D. J., Fitzcharles, M.-A., Goldenberg, D. L., Häuser, W., Katz, R. S., Mease, P., Russell, A. S., Russell, I. J., & Winfield, J. B. (2011). Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 38(6), 1113–1122. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100594>
- Wolfe, F., Ross, K., Anderson, J., Russell, I. J., & Hebert, L. (1995). The prevalence and

characteristics of fibromyalgia in the general population. *Arthritis and Rheumatism*, 38(1), 19–28. <https://doi.org/10.1002/art.1780380104>

Wolfe, F., Smythe, H. A., Yunus, M. B., Bennett, R. M., Bombardier, C., Goldenberg, D. L., Tugwell, P., Campbell, S. M., Abeles, M., & Clark, P. (1990). The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis and Rheumatism*, 33(2), 160–172. <https://doi.org/10.1002/art.1780330203>

Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., & Basir, R. (2018). General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082164>

Yap, B. W., & Sim, C. H. (2011). Comparisons of various types of normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 81(12), 2141–2155. <https://doi.org/10.1080/00949655.2010.520163>

Zhang, C.-Z., Cheng, X.-Q., Li, J.-Y., Zhang, P., Yi, P., Xu, X., & Zhou, X.-D. (2016). Saliva in the diagnosis of diseases. *International Journal of Oral Science*, 8(3), 133–137. <https://doi.org/10.1038/ijos.2016.38>

ANEXOS



Anexos

Escala de Esforço de Borg



Figura 16 - Exemplo de escala subjetiva de percepção do esforço de Borg. Adaptado do sítio <https://portal-chsj.minsaude.pt/pages/1021>

Exemplo de Curva de Calibração (concentração proteica)

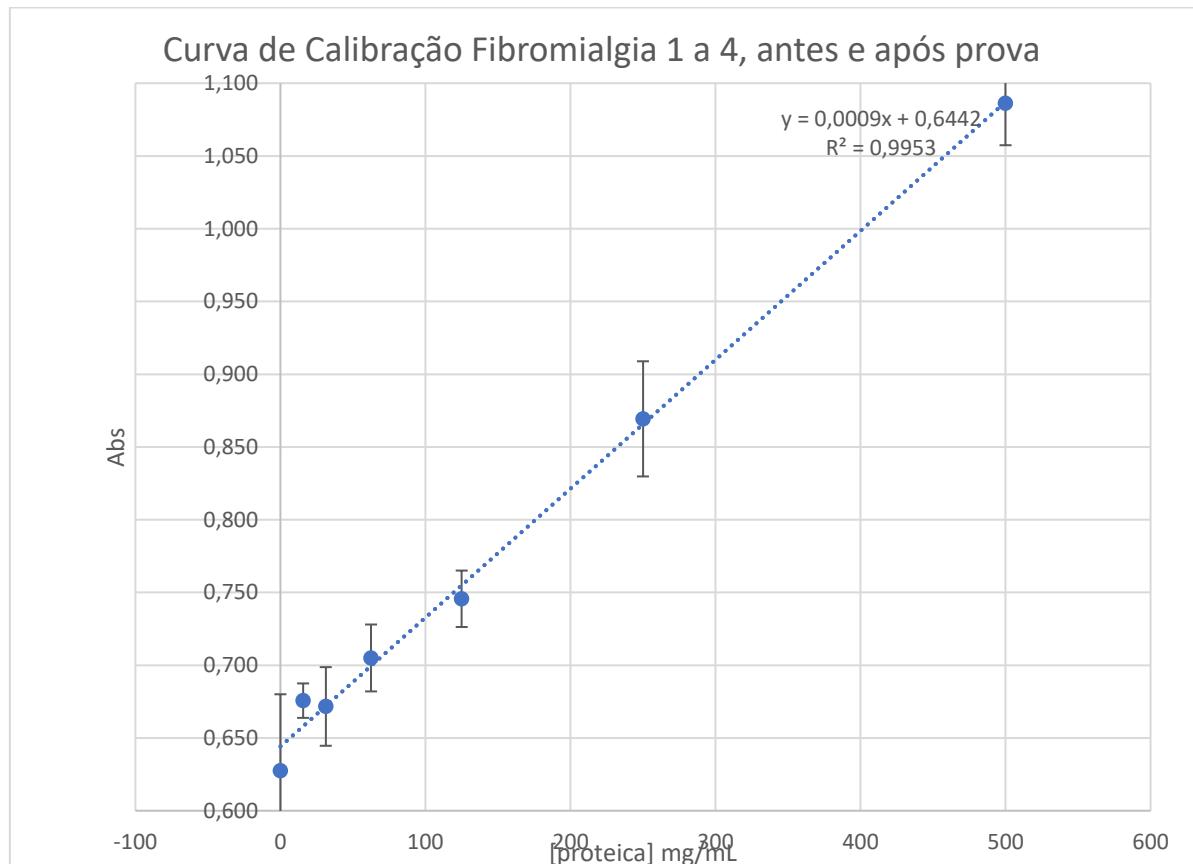


Figura 17 .- Curva de calibração para a determinação da concentração proteica.

Tabelas Estatísticas

- **Perceção do esforço em mulheres fibromiálgicas e mulheres saudáveis**

Tabela 2 - Diferenças entre mulheres fibromiálgicas e mulheres saudáveis na escala de Borg em repouso e após a prova de esforço.

	Repouso Borg (6-20)	Pós prova de esforço Borg (6-20)	Comparação intra-grupo
	Média (DP)	Média (DP)	p-value
Fibromialgia	10,38 (2,99)	14,69 (3,17)	0,003
Controlo	6 (00)	12,75 (3,34)	<0,001
Comparação entre-grupos (p-value)	<0,001	0,371	

- **Variabilidade da frequência cardíaca em mulheres fibromiálgicas e em mulheres saudáveis em repouso**

Tabela 3 - Variações da variabilidade da frequência cardíaca em mulheres fibromiálgicas e mulheres saudáveis em repouso.

• Variável	Fibromialgia Média (DP)	Controlo Média (DP)	p-value	Z	Dimensão do efeito
Máxima HR	82,29 (12,08)	87,69 (9,01)	0,615	0,257	0,008
Média HR	74,86 (10,68)	76,81 (7,88)	0,950	0,004	<0,001
RR	818,43 (125,90)	788,94 (81,10)	0,831	0,046	0,001
DNN	30,35 (20,63)	51,67 (30,61)	0,158	2,088	0,060
pNN50	9,25 (14,07)	22,18 (17,68)	0,248	1,383	0,040
RMSSD	26,93 (17,64)	55,12 (35,09)	0,059	3,832	0,104
Índice de stress	17,11 (7,13)	10,85 (4,07)	0,014	6,782	0,170
Índice SNP	-2,93 (9,22)	-0,06 (1,22)	0,473	0,528	0,016
Índice SNS	1,77 (1,60)	0,86 (0,95)	0,065	3,642	0,099
VLF	11,59 (9,59)	4,68 (3,15)	0,234	1,473	0,043
LF	60,56 (18,44)	45,98 (18,98)	0,047	4,274	0,115
HF	27,21 (15,93)	49,12 (20,38)	0,010	7,375	0,183
LF/HF	4,82 (9,17)	1,49 (1,54)	0,181	1,869	0,054
SD1	19,08 (12,52)	39,06 (24,86)	0,059	3,837	0,104
SD2	38,08 (27,03)	60,65 (37,46)	0,250	1,373	0,040
EnAmostra	1,67 (0,36)	1,61 (0,39)	0,737	0,115	0,003

Máxima HR (Heart Rate): ritmo cardíaco máximo; Média HR: ritmo cardíaco médio; RR: tempo entre os intervalos R-R; SDNN (Standard Deviation of NN intervals): desvio padrão de todos os intervalos RR normais; pNN50 (Percentage of intervals): percentagem de intervalos com >50 ms de diferença do intervalo anterior; RMSSD: raiz quadrada da media dos quadrados das diferenças consecutivas de um intervalo RR; índice de stress; índice SNP: índice de atividade do SNP; índice SNS: índice de atividade do SNS; VLF: (Very Low Frequency) frequência muito baixa; LF: (Low Frequency) baixa frequência; HF: (High Frequency) elevada frequência; LF/HF: razão das frequências (ms⁻²); SD1: (Dispersion, Standard Deviation) desvio padrão da dispersão de pontos perpendiculares ao eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré; SD2: desvio padrão da dispersão de pontos ao longo do eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré; EnAmostra: entropia da amostra.

- **Efeitos da prova de esforço na variabilidade da frequência cardíaca em mulheres saudáveis e fibromiálgicas**

Tabela 4 - Variações da variabilidade da frequência cardíaca em mulheres saudáveis antes e após a prova de esforço.

• Variável	Reposo Média (DP)	Após a prova Média (DP)	p-value	Z	Dimensão do efeito
Máxima HR	87,69 (9,01)	116,69 (20,25)	0,001	-3,408	0,852
Média HR	76,81 (7,88)	87,31 (11,38)	0,003	-3,004	0,751
RR	788,94 (81,10)	696,62 (85,06)	0,002	-3,051	0,763
SDNN	51,67 (30,61)	45,56 (25,42)	0,352	-0,931	0,233
pNN50	22,18 (17,68)	15,11 (16,41)	0,352	-0,931	0,233
RMSSD	55,12 (35,09)	40,16 (24,54)	0,109	-1,603	0,401
Índice de stress	10,85 (4,07)	11,42 (3,82)	0,485	-0,698	0,175
Índice SNP	-0,06 (1,22)	-1,09 (0,99)	0,004	-2,844	0,711
Índice SNS	0,86 (0,95)	1,74 (1,25)	0,010	-2,585	0,646
VLF	4,68 (3,15)	5,52 (5,42)	0,485	-0,698	0,175
LF	45,98 (18,98)	63,27 (15,81)	0,020	-2,327	0,582
HF	49,12 (20,38)	31,07 (16,15)	0,026	-2,223	0,556
LF/HF	1,49 (1,54)	3,07 (2,34)	0,038	-2,068	0,517
SD1	39,06 (24,86)	28,42 (17,38)	0,109	-1,603	0,401
SD2	60,65 (37,46)	57,61 (31,91)	0,717	-0,362	0,091
EnAmostra	1,61 (0,39)	1,55 (0,29)	0,408	-0,827	0,207

Máxima HR (Heart Rate): ritmo cardíaco máximo; Média HR: ritmo cardíaco médio; RR: tempo entre os intervalos R-R; SDNN (Standard Deviation of NN intervals): desvio padrão de todos os intervalos RR normais; pNN50 (Percentage of intervals): percentagem de intervalos com >50 ms de diferença do intervalo anterior; RMSSD: raiz quadrada da media dos quadrados das diferenças consecutivas de um intervalo RR; índice de stress; índice SNP: índice de atividade do SNP; índice SNS: índice de atividade do SNS; VLF: (Very Low Frequency) frequência muito baixa; LF: (Low Frequency) baixa frequência; HF: (High Frequency) elevada frequência; LF/HF: razão das frequências (ms^{-2}); SD1: (Dispersion, Standard Deviation) desvio padrão da dispersão de pontos perpendiculares ao eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré; SD2: desvio padrão da dispersão de pontos ao longo do eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré; EnAmostra: entropia da amostra.

Tabela 5 - Variações da variabilidade da frequência cardíaca em mulheres fibromiálgicas antes e após a prova de esforço.

Variável	Reposo Média (DP)	Após a prova Média (DP)	p-value	Z	Dimensão do Efeito
Máxima HR	82,29 (12,08)	87,62 (12,18)	0,002	-3,114	0,864
Média HR	74,86 (10,68)	75,77 (9,47)	0,009	-2,609	0,724
RR	818,43 (125,90)	803 (108,45)	0,006	-2,726	0,756
SDNN	30,35 (20,63)	31,15 (10,74)	0,196	-1,293	0,359
pNN50	9,25 (14,07)	5,41 (5,94)	0,944	-0,070	0,019
RMSSD	26,93 (17,64)	29,31 (16,03)	0,421	-0,804	0,223
Índice de stress	17,11 (7,13)	13,68 (4,87)	0,108	-1,609	0,446
Índice PNS	-2,93 (9,22)	-0,87 (0,73)	0,944	-0,070	0,019
Índice SNS	1,77 (1,60)	1,30 (1,08)	0,753	-0,315	0,087
VLF	11,59 (9,59)	9,82 (5,46)	0,055	-1,922	0,533
LF	60,56 (18,44)	62,68 (15,32)	0,028	-2,201	0,610
HF	27,21 (15,93)	27,34 (15,70)	0,249	-1,153	0,320
LF/HF	4,82 (9,17)	4,64 (5,33)	0,075	-1,782	0,494
SD1	19,08 (12,52)	20,75 (11,33)	0,421	-0,804	0,223
SD2	38,08 (27,03)	38,02 (13,13)	0,184	-1,328	0,368
EnAmostra	1,67 (0,36)	1,47 (0,42)	0,006	-2,760	0,765

Máxima HR (Heart Rate): ritmo cardíaco máximo; Média HR: ritmo cardíaco médio; RR: tempo entre os intervalos R-R; SDNN (Standard Deviation of NN intervals): desvio padrão de todos os intervalos RR normais; pNN50 (Percentage of intervals): percentagem de intervalos com >50 ms de diferença do intervalo anterior; RMSSD: raiz quadrada da media dos quadrados das diferenças consecutivas de um intervalo RR; índice de stress; índice SNP: índice de atividade do SNP; índice SNS: índice de atividade do SNS; VLF: (Very Low Frequency) frequência muito baixa; LF: (Low Frequency) baixa frequência; HF: (High Frequency) elevada frequência; LF/HF: razão das frequências (ms²); SD1: (Dispersion, Standard Deviation) desvio padrão da dispersão de pontos perpendiculares ao eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré; SD2: desvio padrão da dispersão de pontos ao longo do eixo da linha de identidade no gráfico de Poincaré; EnAmostra: entropia da amostra.

- Alterações nos parâmetros salivares entre mulheres fibromiálgicas e mulheres saudáveis em repouso**

Tabela 6 - Diferenças encontradas nos parâmetros salivares entre mulheres fibromiálgicas e mulheres saudáveis em repouso.

Variável	Fibromialgia Média (DP)	Controlo Média (DP)	p-value	Z	Dimensão do efeito
Fluxo salivar (mL/min)	0,31 (0,16)	0,39 (0,19)	0,314	0,928	0,085
[proteica] (μg/mL)	1098,39 (573,87)	1028,72 (566,55)	0,113	2,664	0,079
α-amilase (μmol/min/mg)	247,41 (20,96)	207,98 (17,10)	0,001	15,388	0,372
Catalase (μmol/min/mg)	0,006 (0,006)	0,009 (0,004)	0,190	1,804	0,059
Glutationo Peroxidase (μmol/min/mg)	6,13 (6,99)	7,87 (10,97)	0,415	0,684	0,022

- **Alterações nos parâmetros salivares no grupo controlo antes e após a prova de esforço**

Tabela 7 - Diferenças encontradas nos parâmetros salivares no grupo controlo antes e após a prova de esforço.

Variável	Repouso Média (DP)	Após-prova Média (DP)	p-value	Z	Dimensão do efeito
Fluxo salivar (mL/min)	0,39 (0,19)	0,35 (0,14)	0,249	-1,153	0,320
[proteica] (μg/mL)	1028,72 (566,55)	1143,72 (864,01)	0,427	-0,795	0,205
α-amilase (μmol/min/mg)	207,98 (17,10)	209,04 (15,66)	0,878	-0,153	0,048
Catalase (μmol/min/mg)	0,009 (0,004)	0,011 (0,005)	0,047	-1,988	0,513
Glutationo Peroxidase (μmol/min/mg)	7,87 (10,97)	9,67 (10,21)	0,256	-1,136	0,293

- **Alterações nos parâmetros salivares no grupo das fibromiálgicas antes e após a prova de esforço**

Tabela 8 - Diferenças encontradas nos parâmetros salivares no grupo das fibromiálgicas antes e após a prova de esforço.

Variável	Repouso Média (DP)	Após-prova Média (DP)	p-value	Z	Dimensão do efeito
Fluxo salivar (mL/min)	0,31 (0,16)	0,17 (0,09)	0,001	-3,250	0,709
[proteica] (μg/mL)	1098,39 (573,87)	1173,84 (618,99)	0,332	-0,971	0,217
α-amilase (μmol/min/mg)	247,41 (20,96)	250,18 (24,47)	0,587	-0,543	0,125
Catalase (μmol/min/mg)	0,006 (0,006)	0,006 (0,003)	0,492	-0,686	0,166
Glutationo Peroxidase (μmol/min/mg)	6,13 (6,99)	5,65 (5,3)	0,868	-0,166	0,040

Produção Científica

Artigo

*Costa, A.R.; Freire, A.; Parraca, J.A.; Silva, V.; Tomas-Carus, P.; Villafaina, S. Heart Rate Variability and Salivary Biomarkers Differences between Fibromyalgia and Healthy Participants after an Exercise Fatigue Protocol: An Experimental Study. *Diagnostics* **2022**, *12*, 2220. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092220>*



Article

Heart Rate Variability and Salivary Biomarkers Differences between Fibromyalgia and Healthy Participants after an Exercise Fatigue Protocol: An Experimental Study

Ana Rodrigues Costa ¹, Ana Freire ¹, Jose A. Parraca ^{2,3,*}, Vanda Silva ⁴, Pablo Tomas-Carus ^{2,3} and Santos Villafaina ^{2,5}

- ¹ Departamento de Ciências Médicas e da Saúde, Escola de Saúde e Desenvolvimento Humano, Universidade de Évora, 7004-516 Évora, Portugal
² Departamento de Desporto e Saúde, Escola de Saúde e Desenvolvimento Humano, Universidade de Évora, 7004-516 Évora, Portugal
³ Comprehensive Health Research Centre (CHRC), University of Évora, 7004-516 Évora, Portugal
⁴ Family Health Unit—Lusitania, Rua do Ferragial do Poço Novo, S/N, 7000-727 Évora, Portugal
⁵ Universidad de Extremadura, Facultad de Ciencias del Deporte, 10003 Cáceres, Spain
* Correspondence: jparraca@uevora.pt



Congresso

