

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

ANA CAROLINA GARCIA DE LAS BALLONAS CAMPOLINA

**IMPACTO DE DIETAS COM RESTRIÇÃO DE
ALIMENTOS FONTE DE GLÚTEN EM PACIENTES COM
FIBROMIALGIA**

**Belo Horizonte
2017**

ANA CAROLINA GARCIA DE LAS BALLONAS CAMPOLINA

**IMPACTO DE DIETAS COM RESTRIÇÃO DE
ALIMENTOS FONTE DE GLÚTEN EM PACIENTES COM
FIBROMIALGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

Co-orientadora: Prof. Dra. Denise Carmona Cara Machado

**Belo Horizonte
2017**

*Dedico este trabalho a todos meus
pacientes que sentem, como se refere
um deles, “a dor que dói na alma”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, e sempre, a Aquele que é a causa inicial de tudo, a luz que direciona nossos caminhos: Deus. Essência do amor, que sempre me deu muito mais que mereço, como acréscimo de alegria, em sua infinita misericórdia.

Agradeço em segundo lugar a meus pais, base de tudo que tenho e sou hoje. Esta conquista é uma homenagem a todo amor que me dedicaram e tudo que me ajudaram a construir.

Agradeço aos meus irmãos, meus amigos-irmãos e a meu noivo, pelo apoio e por entenderem que não pude estar ao lado deles neste período como sempre tentei estar antes, e que compreenderam que era um sacrifício necessário por uma causa maior. Em especial ao Gê, pois ficou do meu lado, como um bom companheiro, mesmo nos momentos em que nem eu me aguentava.

Agora adentrando os agradecimentos a UFMG. Gostaria de comentar um pouco sobre mestres...

Um mestre não esquece seus alunos e está sempre de coração aberto, quando este retorna pedindo ajuda. E assim, foi a Prof Juliana, ao me receber 8 anos após eu ser sua monitora de Imunologia.

Um mestre reflete em seus olhos e seu sorriso o amor de guiar, de estimular o aluno a sempre querer ir além, de o fazer acreditar que ele é capaz. Assim foi com a Prof Denise, que de uma dúvida de uma pessoa curiosa fez brotar uma semente adormecida, a paixão pela pesquisa e quando vi, já estava no mestrado.

Um mestre mesmo quando vê todas as dificuldades de um aluno, suas chances de fracassar, seu bom coração não o deixar desistir do aluno, ele oferece uma das coisas mais preciosas que o aluno precisa: acredita nele, lhe dá a oportunidade de tentar e o guia. Aqui entra por último, por sequência dos acontecimentos, mas com um agradecimento em especial, a minha orientadora Jacque, que cuida de todos nós como se fossemos sua família. Pensei que ela fosse desistir de mim, mas ela me acolheu em seu laboratório e me guiou, e é uma das maiores responsáveis por este trabalho concluído.

A estas 3 mestres, meu especial agradecimento, pois vocês são a prova que quando se ensina com amor, você enriquece a alma do aprendiz.

A toda “Grande Família Labin” – Bacha, Bruna, Cris, Dani, Ed, Elândia, Hirla, Julinha, Karine, Lana, Luana, Melissa, Paola, Penélope, Raquel Horta, Victor, Wesley - por todo ensinamento, apoio, ajuda no experimento e momentos inesquecíveis de risadas.

Às minhas colaboradoras deste projeto Melissa Tainan, Paola Lacerda, Luana Fonseca e Karine Andrade pela dedicação e ajuda. Em especial a minha colega, colaboradora e amiga, Cristina Maria Mendes Resende, que teve um papel essencial no desenvolvimento do meu trabalho. Obrigada por toda paciência com minha “leve” teimosia, pela dedicação tanto como colaboradora quanto na amizade. Você se tornou, numa velocidade relâmpago, uma grande amiga e confidente.

Agradeço em especial também aos colaboradores, Professor Dr. Aloísio Joaquim F. Ribeiro, pela colaboração na estatística do trabalho e pelos relevantes ensinamentos; sempre muito atencioso e disponível mesmo em períodos de greve. E ao Professor Dr. Luis Rodrigo Saez pelas orientações, sempre cordial e atencioso.

À Prof. Dra. Ana Maria Caetano pelos preciosos ensinamentos e por me mostrar a área que eu realmente amo, imunologia das mucosas. Uma professora que tenho grande admiração.

A todos os colegas de Mateus Leme que contribuíram de alguma forma com este trabalho, em especial a minha equipe querida no Centro de Especialidades de Mateus Leme e a secretária de saúde Vanda.

A todos os colegas da minha turma de Bases pelo companheirismo, pela ajuda na matéria (em especial aos Brunos) e pelos momentos de diversão também.

Ao farmacêutico Estephen Fernandes por nos acolher em seu laboratório com tanta presteza e carinho.

Ao Laboratório de Farmacologia da UFMG por disponibilizarem o laboratório e equipamentos.

À empresa VeganWay e seu representante Gustavo Orlandi Valério pela amostra doada de proteína isolada de arroz.

Ao Orlando, na secretária do nosso departamento, pela atenção sempre que precisei.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho, minha sincera gratidão!

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana".

Carl Jung

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE SIGLAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Fibromialgia.....	17
2.2 Definição e estrutura do glúten.....	22
2.3 Transtornos relacionados ao glúten.....	24
2.3.1 Doença Celíaca.....	25
2.3.2 Alergia ao trigo.....	26
2.3.3 Sensibilidade ao glúten não celíaca.....	27
2.4 Implicações nutricionais da retirada de alimentos fonte de glúten da dieta	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Seleção do grupo.....	33
4.2 Delineamento do Estudo.....	34
4.3 Questionários.....	36
4.3.1 Questionário de Sintomas de Sensibilidade ao Glúten (QSSG).....	36
4.3.2 Questionário sobre o impacto da fibromialgia (QIF).....	36
4.3.3 Escala de Gravidade de Sintomas (EGS).....	37
4.3.4 Registro Alimentar.....	37
4.3.5 Questionário de Frequência Alimentar (QFA).....	37
4.4 Avaliação antropométrica.....	38
4.5 Coleta de sangue.....	39
4.5.1 Dosagem de IgA anti-transglutaminase.....	39
4.5.2 Dosagem de citocinas séricas.....	40

4.6 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Fase 1.....	43
5.2 Fase 2.....	46
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICES.....	62
APÊNDICE A - Registro alimentar de 72 horas.....	62
APÊNDICE B - Questionário de frequência alimentar.....	63
APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	64
APÊNDICE D - Questionário de sintomas da fibromialgia.....	66
APÊNDICE E - Anamnese clínica padronizada.....	67
APÊNDICE F - Orientação quanto ao uso de medicamentos e a pesquisa.....	68
APÊNDICE G - Material complementar.....	69
ANEXOS.....	73
ANEXO A - Parecer 1.269.563 do Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (COEP).....	73
ANEXO B - Questionário sobre o impacto da fibromialgia.....	74
ANEXO C - Questionário de sintomas de sensibilidade ao glúten.....	75
ANEXO D - Índice de dor difusa.....	76
ANEXO E - Escala de gravidade de sintomas.....	77
ANEXO F - Critério diagnóstico da fibromialgia do American College of Rheumatology de 2010.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação dos dados antropométricos de pacientes com Fibromialgia no início (T0) e após 8 semanas (T8) em dietas isentas de fonte de glúten atendidos no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 1).....	43
Tabela 2 -	Comparação de calorias e macronutrientes da dietas rotineiras e após a retirada de alimentos fonte de glúten em indivíduos com fibromialgia atendidos no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 1).....	43
Tabela 3 -	Variações nas concentrações séricas de IL-1 β , IL-6 e IL-10 no início e no final de 8 semanas sem glúten em mulheres com fibromialgia atendidas no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 1).....	45
Tabela 4 -	Percentual de pacientes com fibromialgia identificados como possíveis portadores de sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) de acordo que o Questionário de Sintomas de Sensibilidade ao Glúten (QSSG) avaliado nas sete primeiras semanas sem glúten atendidos no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 1).....	45
Tabela 5 -	Comparação dos dados antropométricos após sete dias recebendo cápsulas contendo 8 gramas de proteína de arroz (Placebo-T8) ou 8 gramas de glúten (T10), em pacientes com fibromialgia atendidos no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 2).....	46
Tabela 6 -	Variações nas concentrações séricas de IL-1 β , IL-6 e IL-10 entre os períodos de desafio com placebo (T8) e desafio com glúten (T10), em mulheres com fibromialgia atendidas no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 2).....	47
Tabela 7 -	Percentual de pacientes com fibromialgia identificados como possíveis portadores de sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) de acordo que o Questionário de Sintomas de Sensibilidade ao Glúten (QSSG) comparando sintomas durante a fase de suplementação com cápsulas placebo ou de glúten, em mulheres com fibromialgia atendidas no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 2) placebo ou de glúten – fase 2.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Rotas do processamento da dor implicados na dor crônica e na fibromialgia.....	19
Figura 2 -	Mapa de motivos peptídicos não digeridos da α gliadina.....	23
Figura 3 -	Classificação das doenças relacionadas ao glúten.....	25
Figura 4 -	Modelo experimental.....	35
Figura 5 -	Fluxograma dos indivíduos que participaram do ensaio clínico simples cego.....	42
Figura 6 -	Comparação da evolução clínica de pacientes com fibromialgia na Fase 1, seguindo os Questionários sobre o Impacto da Fibromialgia, Questionário de Sintomas da Fibromialgia; Escala de Gravidade dos Sintomas; Índice de Dor Difusa, no início (T0) e após oito semanas (T8) em dietas isentas de fonte de glúten.....	44
Figura 7-	Comparação da evolução clínica de pacientes com fibromialgia, seguindo os Questionários sobre o Impacto da Fibromialgia, Questionário de Sintomas da Fibromialgia; Escala de Gravidade dos Sintomas; Índice de Dor Difusa (D), entre os períodos de desafio com placebo (T8) e desafio com glúten (T10), em mulheres com fibromialgia. (Fase 2).....	47

LISTA DE SIGLAS

ATIs	Inibidores de amilase-tripsina
CA	Circunferência abdominal
CD14	Grupamento de diferenciação 14
DC	Doença celíaca
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DIG	Dieta isenta de glúten
EGS	Escala de Gravidade dos Sintomas
FABP2	Proteína ligadora de ácidos graxos 2
FcεRI	Receptor de alta afinidade para imunoglobulina E
FODMAPs	Oligo,di, monossacarídeos e polióis fermentáveis
FOXP3	Forkhead box P3
FM	Fibromialgia
fMRI	Imagem de ressonância magnética funcional
HLA	Antígeno leucocitário humano
G	Gramma
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL1-RA	Antagonista do receptor de interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal
INF	Interferon
Kcal	Calorias
Kg	Quilograma
LIEs	Linfócitos intra-epiteliais
MD2	Antígeno linfocitário 96
PG	Prostaglandina
QFA	Questionário de frequência alimentar
QIF	Questionário sobre o Impacto da Fibromialgia
QSFM	Questionário de sintomas da fibromialgia
QSSG	Questionário de Sensibilidade ao Glúten
SII	Síndrome do intestino irritável
SGNC	Sensibilidade ao glúten não celíaca

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR2	Receptor do tipo Toll 2
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TRG	Transtornos relacionados ao glúten

RESUMO

A Fibromialgia (FM) é uma condição de dor crônica e generalizada, geralmente acompanhada por vários sintomas associados, como fadiga, distúrbio do sono, cefaléia, síndrome do intestino irritável e distúrbios do humor. Estudos recentes apontam a possibilidade da proteína do glúten ter um papel no desenvolvimento dos sintomas em um subgrupo de pacientes com esta síndrome. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de dietas isentas de fonte de glúten nos sintomas e marcadores inflamatórios da fibromialgia, assim como identificar a presença de sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) nos indivíduos com diagnóstico prévio de fibromialgia. Para tal fim, quatorze pacientes com diagnóstico de fibromialgia foram mantidas em dieta com restrição de alimentos fonte de glúten por um período de oito semanas. Após esse tempo elas receberam cápsulas de proteína isolada de arroz (placebo) por 7 dias, seguido de um *wash-out* de 3 dias e novo desafio com cápsulas contendo 6,3 g/dia de proteína do glúten, por mais 7 dias. No período antes da retirada do glúten, após oito semanas sem glúten e após desafio com glúten, foram avaliados marcadores inflamatórios no sangue e realizados questionários de avaliação da quantidade e gravidade dos sintomas relacionados à fibromialgia e sobre o impacto da fibromialgia no dia a dia. Foi aplicado semanalmente, baseado no protocolo de Salerno, questionário para avaliar presença de sensibilidade ao glúten não celíaca nas pacientes estudadas. Os resultados mostram redução sobre o impacto da fibromialgia no dia a dia, do número de sintomas e de regiões dolorosas no corpo após oito semanas de dieta isenta de glúten, entretanto com o desafio com 6,3 gramas do glúten não houve piora dos resultados. Quanto aos marcadores inflamatórios não houve alteração em nenhuma das fases estudadas. Por fim, nenhuma paciente apresentou diagnóstico para sensibilidade ao glúten não celíaca. Com estes resultados podemos concluir que a retirada de alimentos fontes de glúten da dieta resultou em melhora da fibromialgia. Porém, a reintrodução do glúten não teve impacto sobre os parâmetros avaliados, sugerindo não ser o glúten o fator responsável pela melhora no período sem ingestão de glúten. Nenhuma paciente estudada teve diagnóstico de SGNC.

Palavras-chave: fibromialgia; glúten; sensibilidade ao glúten não celíaca; marcadores inflamatórios

ABSTRACT

Fibromyalgia (FM) is a chronic and widespread pain condition, usually accompanied by several associated symptoms such as fatigue, sleep disorder, headache, irritable bowel syndrome and mood disorders. Recent studies point to the possibility of gluten protein having a role in the development of FM symptoms in a subgroup of patients. Our aim was to evaluate the impact of gluten-free diets on symptoms and inflammatory markers of FM, as well as to identify the presence of non-celiac gluten sensitivity (NCGS) in individuals with previous diagnosis of FM. For that, fourteen patients with FM diagnosis were kept on a diet restrict in gluten-free foods for a period 8 weeks. In the last weeks, they received rice protein isolate capsules (placebo) for 7 days, followed by a 3-day wash-out and a new challenge with capsules containing 6,3 g/day of gluten protein for another 7 days. In the initial period and in 8th week without gluten sources and after challenge with gluten, inflammatory markers were evaluated and questionnaires were carried out to evaluate the quantity and severity of FM symptoms and the impact of FM on daily routine. In addition, a questionnaire based on Salerno protocol was applied to evaluate the presence of NCGS. The results showed a reduction in the impact of FM in daily routine, number of FM symptoms and in the painful regions after 8 weeks of gluten-free diet. Nonetheless, gluten reintroduction was not associated with worsening of these results. There were no differences in the inflammatory markers in any experimental time. Consequently, the NCGS diagnosis was not confirmed in none patient. We concluded that the withdrawal of food sources of gluten from diet resulted in improvement of fibromyalgia. However, the reintroduction of gluten isolated caused no impact in the evaluated parameters, suggesting that gluten was not the factor responsible for the improvement of FM symptoms in the gluten-free period.

Keywords: fibromyalgia; gluten; non-celiac gluten sensitivity; inflammatory markers

1 INTRODUÇÃO

Fibromialgia (FM) é uma doença reumatológica cuja característica principal é a dor musculoesquelética difusa crônica. Sua etiologia não é ainda bem elucidada, todavia, é proposto que haja um distúrbio no processamento da dor associado a outras características secundárias (1-3). Além do quadro doloroso, os pacientes costumam queixar-se de fadiga, distúrbios do sono, rigidez matinal, parestesias nas extremidades, sensação subjetiva de edema e distúrbios cognitivos (1). É também frequente a associação a outras comorbidades, que contribuem com o sofrimento e a piora da qualidade de vida, nas quais podem-se citar depressão, ansiedade, síndrome da fadiga crônica, síndrome miofascial, disfunção temporomandibular (DTM), síndrome do cólon irritável e a síndrome uretral inespecífica (1, 3, 4). É considerada uma das doenças reumatológicas mais frequentes e com importante custo de saúde para seu tratamento, especialmente quando o diagnóstico correto demora a ser realizado, frequentemente ocorrendo após a realização de exames desnecessários e medicação ineficaz (1).

Em uma revisão sistemática com meta-análise realizada por Üçeyler et al (5), os autores mostraram que pacientes com FM possuem maiores níveis no soro de IL-1 RA, IL-6 e IL-8, comparado aos grupos controles. Outro estudo encontrou níveis mais baixos de IL-4 e IL-10 em pacientes com FM e comparação aos controles (6). Em um estudo mais recente com 63 mulheres foi encontrado uma concentração menor no plasma de IL4, IL-5 e IL-13 (citocinas produzidas por linfócitos Th2) em relação a outros estudos na literatura (7).

A Sensibilidade ao glúten não celíaco (SGNC) é um transtorno relacionado à ingestão da proteína do glúten em pessoas em que a doença celíaca e a alergia ao trigo foram excluídas (8-10). Os sinais e sintomas mais característicos são os intestinais como dor abdominal, distensão abdominal, diarreia e constipação intestinal; e os extra-intestinais como astenia, cefaleia, dores articulares e musculares, mente nebulosa, anemia, parestesias nos pés e mãos e ânimo depressivo (8, 11, 12).

Estudo realizado por Sapone et al. (13) observou, por análise de biópsia de mucosa duodenal de pacientes com SGNC, aumento de linfócitos intra-epiteliais (IELs), da expressão de TLR2 em células epiteliais e redução de FOXP3, e sem

alteração na expressão de genes relacionados ao sistema imune adaptativo. Esse estudo sugere a presença de uma resposta imune inata em pacientes com SGNC. Outro estudo realizado por Brottveit et al (14) demonstrou aumento nos níveis de IFN-gama e no número de LIEs na mucosa duodenal após o desafio com glúten, in vivo, em pacientes com SGNC. Por sua vez, Uhde e colegas (15) observaram em pacientes com autodiagnóstico de SGNC níveis aumentados no soro de CD14 solúvel, proteína ligadora de lipopolissacarídeo, e anticorpos reativos a antígenos microbianos, indicando uma ativação sistêmica do sistema imune. Entretanto, Sabatino et al (16), não observaram anormalidades na resposta imune das mucosas de pacientes com autodiagnóstico de SGNC, pela análise de citocinas relacionadas ao sistema imune inato e adaptativo em biópsias duodenais cultivadas ex-vivo.

Alguns estudos publicados recentemente têm apontado a melhora de sintomas em pacientes com fibromialgia com a retirada de alimentos fonte de glúten e sugerem um possível papel do glúten na fisiopatologia da FM (17-19). Isasi et al (17) baseado nos resultados de seu estudo, levantaram a hipótese da SGNC ser uma possível causa tratável da FM.

A eliminação do glúten da dieta de pacientes com FM está se tornando uma intervenção dietética potencial para a melhora clínica. Entretanto, estudos avaliando a retirada do glúten em pacientes com FM são escassos na literatura e, no nosso conhecimento, não há até o momento um estudo clínico, do tipo cego e controlado, que avalie o impacto em marcadores inflamatórios e evolução clínica com a retirada de alimentos fontes de glúten da dieta e após desafio alimentar com glúten.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fibromialgia

FM é uma síndrome reumatológica cuja característica principal é a dor musculoesquelética difusa crônica, na qual nenhuma causa alternativa que justifique este quadro tenha sido encontrada (1, 20). Além do quadro doloroso, estes pacientes costumam queixar-se de sintomas que tipicamente podem acompanhar esta síndrome, como fadiga, distúrbios do sono, rigidez matinal, parestesias de extremidades, sensação subjetiva de edema, sono não reparador, distúrbios cognitivos e distúrbios do humor. Tais sintomas exercem grande influência na qualidade de vida dos pacientes com fibromialgia e evidenciam que se trata de uma condição complexa e heterogênea (1, 20, 21).

É a segunda doença reumatológica mais comum depois da osteoartrite, com uma prevalência na população geral de 2,7% e no Brasil de 2,5%. É mais prevalente em pacientes acima de 50 anos, especialmente mulheres, mas pode se desenvolver em qualquer idade, inclusive na infância. Sua frequência é relativamente igual em diferentes países, cultura e grupos étnicos (22-24).

Sugere-se que se trata de uma condição heterogênea que provavelmente possui várias etiologias. Estudos mostram que os fatores relacionados a etiologia da FM podem ser tanto de origem genética como vindos de fatores ambientais (4, 25). Entre os fatores ambientais que podem ser gatilho no desenvolvimento da FM e condições relacionadas podem-se citar alguns tipos de infecções (hepatite C, Vírus Epstein Barr, entre outros), trauma físico e estresse emocional (4). Estudos demonstraram forte associação de componentes genéticos (polimorfismos genéticos) e FM, sugerindo um risco maior de desenvolvimento da FM entre membros da família (4, 26). Alguns dos polimorfismos relacionados com FM foram identificados no gene que codifica o receptor 2A da 5-hidroxitriptamina (HTR2A), na região regulatória do transportador de serotonina (5-HTTLPR) e de repetição do exon III do receptor de dopamina D4. Esses polimorfismos podem interferir o transporte ou metabolismo de monoaminas ou de catecolaminas, podendo influenciar nos sintomas da FM. Esse é o caso da possível relação entre o

polimorfismo na região regulatória do gene do transportador da serotonina e níveis maiores de ansiedade e depressão em pacientes com FM (4, 27-30).

Existe uma forte evidência de que na maioria dos pacientes com FM o sistema nervoso central esteja envolvido na dor e nos sintomas associados ao quadro clínico (25). Estudos funcionais e com técnicas de imagens no cérebro tem permitido a identificação de mecanismo da dor crônica. Alguns destes estudos confirmaram alteração no processamento neuronal central em rotas nociceptivas. Um dos métodos de imagem mais utilizados em estudos de dor é a imagem de ressonância magnética funcional (fMRI). Este método mede indiretamente a atividade do cérebro ao detectar mudanças na corrente sanguínea (31). Estudo utilizando o método fMRI foi realizado por Jensen et al (32) e comparou a conectividade funcional do sistema inibitório descendente da dor em pacientes com FM em relação a controles saudáveis. Os resultados indicaram que pacientes com FM estudados apresentaram uma conectividade funcional menor entre áreas envolvidas na inibição da dor comparados ao controle durante a administração intermitente de pressões (estímulos dolorosos) com intensidades diferentes. Os autores sugerem disfunção no sistema descendente de modulação da dor, modulador homeostático essencial para dor, tenha um papel importante na manutenção da dor em pacientes com FM.

Sluka et al (25) sugerem, baseados nos estudos com neuroimagem, que em pacientes com fibromialgia haja um aumento no processamento de área envolvidas no campo sensorial e processamento afetivo da dor, aumento nas conexões do estado de repouso com a insula que está envolvida no processamento do estímulo nociceptivo, e redução na conectividade em regiões antinociceptivas.

Alguns mecanismos fisiopatológicos propostos na literatura para a FM estão explicados na Figura 1.

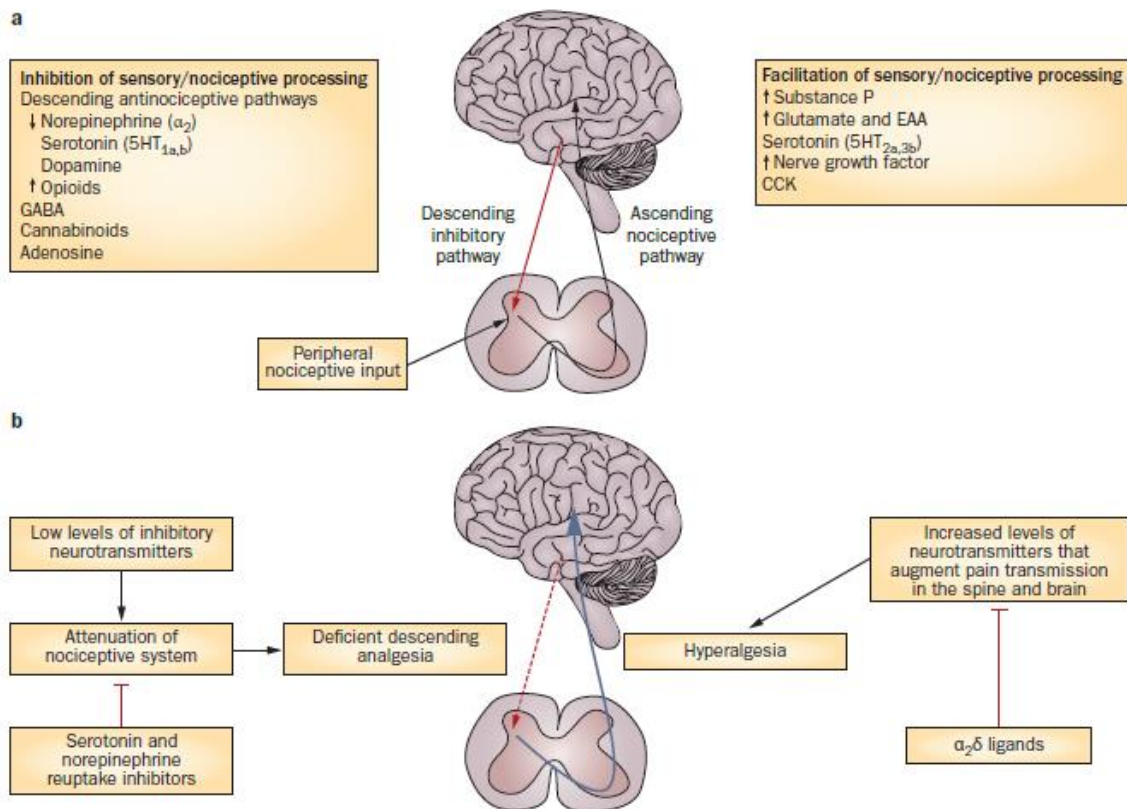


Figura 1. Rotas do processamento da dor implicados na dor crônica e na fm. a | neurotransmissores do SNC que são conhecidos como facilitadores ou inibidores da transmissão do sensorial/dor são mostrados. Como indicado pelas flechas, o nível de muitos destes neurotransmissores está tanto diminuído ou aumentado em pacientes com FM. b | aumento no processamento da dor na FM é atribuído a um desequilíbrio de alguns neurotransmissores que determinam o “volume de controle” do processamento da dor. Baixos níveis de neurotransmissores inibitórios poderiam levar para um sistema antinociceptivo atenuado, enquanto inibidores da recepção de serotonina- norepinefrina poderia levar a um aumento na atividade antinociceptiva. Níveis de neurotransmissores que aumentam a transmissão da dor, como a substância P, glutamato/AAE e fator de crescimento neuronal, estão aumentados na fibromialgia, e provavelmente contribuem para o aumento da atividade nas rotas de transmissão de dor ascendentes. Ligantes de $\alpha_2\delta$ podem ter ação de reduzir a liberação de neurotransmissores excitatórios. Abreviações: 5-HT, 5-hidroxitriptamina; CCK, colecistoquinina; FM, fibromialgia; SNC, sistema nervoso central; DNIC, controle inibitório nocivo difuso; AAE, aminoácidos excitatórios; GABA, ácido Y-aminobutírico. Adaptado, com permissão, de Schmidt-Wilcke, T. & Clauw, D. J. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 518–527 (2011).

Outro possível mecanismo, sugerido na literatura, na patologia da FM é a presença de inflamação (7). Em uma revisão sistemática com meta-análise realizada por Üçeyler et al (5) os autores mostraram que pacientes com FM nos estudos analisados, possuem maiores níveis no soro de IL-1 RA, IL-6 e IL-8 comparado aos grupos controles. Quanto às dosagens circulantes de IL-10 e IL-1 β não houve diferença entre pacientes com FM e o grupo controle. Entretanto, um estudo encontrou níveis mais baixos de IL-4 e IL-10 em pacientes com FM em comparação ao controle (6). E um estudo mais recente com 63 mulheres foi encontrado uma

dosagem no plasma menor de IL4, IL-5 e IL-13 em relação a outros estudos na literatura (7). É sugerida a hipótese de que pacientes com FM possuam um desequilíbrio inato ou adquirido na produção ou secreção de algumas citocinas, como IL1RA, IL6 e IL8 (pró-inflamatórias) que poderiam ter efeitos de algelsia e estarem associadas com a dor na FM (5).

Um estudo observou aumento nos níveis da IL-6 em pacientes com FM após a aplicação de pressão em seus pontos dolorosos, e sugerem que na população estudada o estímulo doloroso levaria ao aumento na IL-6 circulante. A hipótese seria que a IL-6 derivada do músculo levaria a sensibilização de nociceptores pela indução da síntese de prostanglandina (PG) E2. Os nociceptores do músculo sensibilizados liberam o neuropeptídeo substância P, o qual tem sido demonstrado sua capacidade in vitro de aumentar os níveis circulantes de IL-6 por se ligar a um receptor de substância P não-neuroquinina em monócitos (33-35).

Outro estudo encontrou níveis mais baixos de IL-4 e IL-10 em pacientes com FM e comparação ao controle. Os autores sugerem que os baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias podem indicar tanto um papel na fisiopatologia de dores crônicas difusas como também uma consequência da dor ou do tratamento medicamentoso (6).

As recomendações para o tratamento da FM abrangem tanto tratamentos farmacológicos como não-farmacológicos. Entre os medicamentos recomendados com bom nível de evidência, no tratamento farmacológico, estão a amitriptilina (baixas doses), duloxetina ou milnacipram, tramadol, pregabalina e ciclobenzaprina. Já com referência a recomendação para o tratamento não-farmacológico, encontra bom nível de evidência o exercício aeróbico e de fortalecimento, terapias comportamentais cognitivas, acupuntura, hidroterapia, terapias com movimentos meditativos (yoga, tai chi), redução do estresse baseado em técnicas de *mindfulness* e terapias combinadas (21).

Outro tratamento não-medicamentoso o qual vem surgindo estudos promissores, é o tratamento dietoterápico na FM. A retirada de certos alimentos ou aditivos da alimentação, como o glutamato, a carne e o glúten, vem sendo estudado como um possível aliado na melhora dos sintomas (17, 18, 36-38). Dentre estes estudos, a relação do glúten com os sintomas da FM, recentemente, começou a ser estudada embora os estudos ainda sejam escassos.

Em um estudo realizado na Espanha, os autores acompanharam 20 pacientes com fibromialgia e linfocitose duodenal mantidos em dieta isenta de glúten por cerca de 16 meses (17). Em 15 deles ocorreu desaparecimento da dor crônica generalizada, o que levou a hipótese de que a SGNC poderia ser uma das possíveis causas da FM. Além disso, houve retorno dos sintomas da FM em 7 pacientes quando fontes de glúten foram reintroduzidas na dieta (17). Tal hipótese é também levantada por Garcia-Leíva et al., 2014 (19) baseado em seus estudos comparando a similaridade dos sintomas intestinais e extra-intestinais entre pacientes com SGNC e fibromialgia. Outro estudo de relevância foi o realizado por Rodrigo et al., 2014 (18) no qual foi observado a resposta a uma dieta isenta de glúten em pacientes com FM associada a síndrome do intestino irritável (SII). Foram comparados pacientes com linfocitose duodenal com aqueles sem linfocitose duodenal (Controles). A efetividade da dieta foi avaliada por questionários como o de Impacto da Fibromialgia (QIF), de Qualidade de Vida, dos pontos dolorosos. Após um ano de acompanhamento, houve melhora significativa na maioria dos parâmetros avaliados em pacientes com linfocitose duodenal e uma discreta e variável melhora naqueles sem linfocitose. Os autores concluem que uma dieta isenta de glúten não seria apropriada para paciente com FM sem linfocitose duodenal.

Por sua vez, estudo de Slim e colaboradores (39) acompanharam pacientes com fibromialgia recebendo dieta hipocalórica (até 1500 kcal/dia) ou dieta na qual a única restrição eram alimentos fonte de glúten. Nas duas intervenções houve uma melhora dos sintomas de sensibilidade ao glúten, dos sintomas da FM e do impacto da fibromialgia na rotina diária, comparando-se o antes e após a intervenção. Entretanto não houve diferença entre os grupos quanto aos parâmetros analisados. Os autores concluem que, embora tenha havido uma melhora nos sintomas, essa não está relacionada à retirada do glúten em específico e que outros fatores podem estar associados aos resultados.

2.2 Definição e estrutura do glúten

O glúten pode ser definido como um complexo de proteínas insolúveis em água, e que está presente em cereais como trigo, cevada e centeio. Entre as proteínas depositadas na parte do endosperma do grão em desenvolvimento, as proteínas do glúten correspondem à maior quantidade armazenada. As proteínas do glúten podem variar devido a diferenças no genótipo, condições de crescimento e processos tecnológicos. Podem ser divididos em duas frações de acordo com a solubilidade: as frações polipeptídicas solúveis em álcool são chamadas prolaminas e as que são insolúveis de glutenina. Algumas prolaminas mostram papel imunogênico na DC como as do centeio (secalina), da cevada (hordeínas) e especialmente do trigo (gliadina). As prolaminas do milho (zeinas) não possuem efeito negativo em celíacos. A avenina da aveia também tem se mostrado não ser imunogênica para a maioria dos pacientes com DC. Em contato com água o glúten do trigo forma uma massa com propriedades visco-elásticas, muito utilizada em produtos de panificação. A gliadina hidratada contribui principalmente com a viscosidade e extensibilidade da massa, e as gluteninas hidratadas por sua vez, são responsáveis pela força e elasticidade (40-42)

A gliadina é composta de aminoácidos com alta quantidade de glutamina (30-40%) e prolina (20%), e baixas quantidades de aminoácidos com grupos laterais carregados. A gliadina tem papel de gatilho para o desencadeamento de respostas imunes celulares e humorais em indivíduos susceptíveis, promovendo inflamação intestinal nestes indivíduos. É proposto que haja pelo menos 50 epítomos que podem exercer atividade citotóxica, imunomodulatória e de alteração da permeabilidade intestinal, entres os peptídeos do glúten, sendo o peptídeo da gliadina 33-mer o mais imunogênico (40, 41). O mapeamento dos motivos-peptídicos específicos da α gliadina que exercem as atividades acima mencionadas podem ser vistos na figura 2.

2.3 Transtornos relacionados ao glúten

Diante da falta de definições em comum quanto aos transtornos relacionados ao glúten, em 2013 foi realizado em Oslo, na Noruega, uma reunião de especialistas na área para discussão e definição de um consenso para estas definições que eles chamaram de “definições de Oslo”, e assim nortear profissionais da saúde e pesquisadores. O termo “intolerância ao glúten”, muito utilizado anteriormente, era designado tanto para mencionar doença celíaca como os demais transtornos relacionados à ingestão de glúten, entretanto, o consenso de Oslo desencorajou o uso deste termo justificando não ser específico e por ser contraditório. Ficou assim determinado neste consenso, entre outras coisas, que o termo mais adequado para indicar todas as condições relacionadas à ingestão do glúten seria Transtornos Relacionados ao Glúten (TRG) (42).

Publicações recentes ampliaram o leque dos transtornos relacionadas ao glúten, que podem ser classificadas conforme sua patogênese, a citar (Figura 3): autoimune (doença celíaca, ataxia do glúten e dermatite herpetiforme), alérgica (alergia ao trigo-alergia respiratória, alergia alimentar, anafilaxia induzida pelo exercício dependente de trigo, urticária de contato), sem ser autoimunes ou alérgicas (sensibilidade ao glúten não celíaca) (43, 44). A seguir será feita uma breve revisão sobre os principais transtornos relacionados ao glúten.

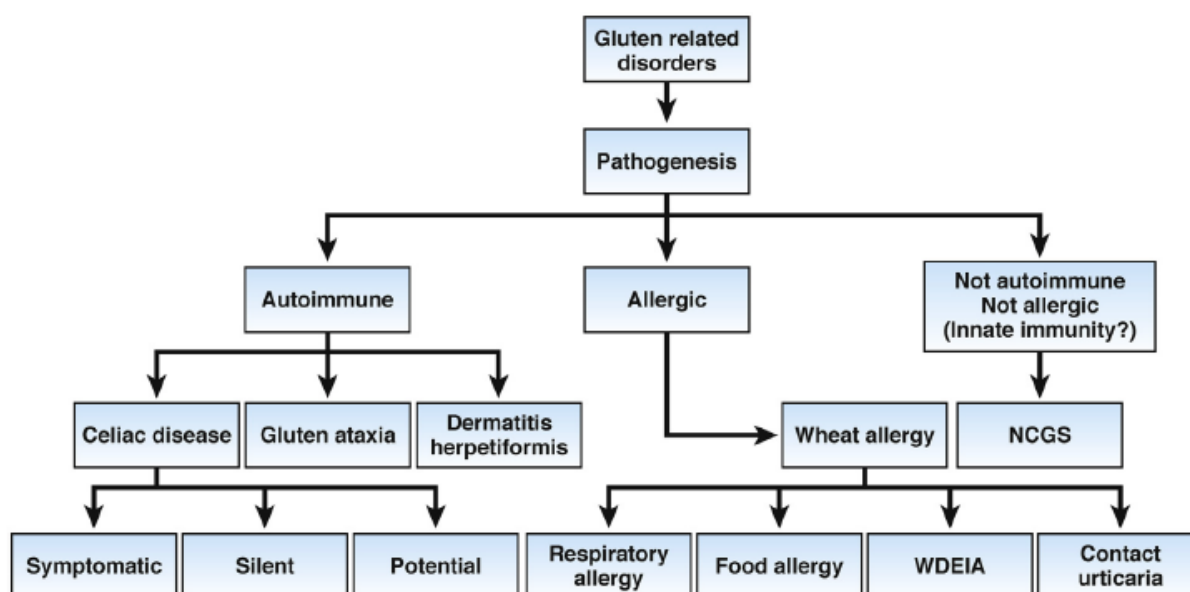


Figura 3. Classificação dos transtornos relacionados ao glúten. Abreviações: WDEIA, anafilaxia induzida pelo exercício dependente de trigo. Adaptado, com permissão, de Fasano, A. *Gastroenterology* 2015; 148: 1195-1204.

2.3.1 Doença Celíaca

É uma doença crônica sistêmica e imuno-mediada no intestino curto, cujo gatilho é a ingestão de glúten dietético e prolaminas relacionadas presentes no trigo, centeio e cevada. A DC ocorre em indivíduos geneticamente susceptíveis que possuem o antígeno leucocitário humano (HLA) DQ2 e/ou DQ8. É caracterizada como uma enteropatia inflamatória com grau variado de dano intestinal, o amplo espectro de sintomas gastrointestinal e/ou sistêmicos e a presença de autoanticorpos para DC específicos (42, 45, 46).

O diagnóstico de doença celíaca é feito por sorologia e biópsia de intestino, sendo essencial que o paciente esteja ingerindo glúten. Embora a sorologia seja importante, o padrão ouro de diagnóstico continua sendo a biópsia, na qual atrofia de vilosidades deve ser visto para se definir o diagnóstico de DC. Entre os testes sorológicos utilizados para avaliar a sorologia da DC pode-se citar anticorpos IgA e IgG contra gliadina, peptídeos de gliadina deaminada, transglutaminase tecidual e endomisio. Entretanto guidelines atuais sugerem o uso do teste IgA anti-transglutaminase como custo-eficácia melhor e o consideram um teste confiável para investigar casos de DC, sendo a IgG anti-transglutaminase útil nos casos em que o paciente tenha deficiência de IgA (45-47). Quanto à biópsia, especialistas

sugerem que há um consenso que de 4 a 6 biópsias, incluindo do bulbo duodenal e parte mais distal do duodeno, são necessárias para o diagnóstico (42, 46).

Quanto a fisiopatologia é proposto que em indivíduos susceptíveis, peptídeos de gliadina são modificados pela transglutaminase tecidual 2, por um processo de desaminação do resíduo de glutamina, resultando em ácido glutâmico. Com este processo se tem a introdução de cargas negativas no peptídeo da gliadina, que passa a ter muito maior afinidade para se ligar as moléculas de HLA-DQ2 e HLA-DQ8. As células T glúten-específica na lamina própria reconhecem os peptídeos de gliadina apresentados por estas moléculas HLA-DQ2 e DQ8 e são ativados (46, 48).

O tratamento da DC é pela exclusão de alimentos fonte de glúten: trigo, centeio, cevada, cereais híbridos como triticale e aveia contaminada (46).

2.3.2 Alergia ao trigo

Trata-se de uma reação de hipersensibilidade a proteínas do trigo imuno-mediada e com presença de mastócitos ativados. A resposta imune pode ser dependente de IgE características dos quadros de alergia alimentar (ex. urticária, angiodema, anafilaxia, anafilaxia induzida pelo exercício dependente de trigo), alergia respiratória (ex. asma e rinite do padeiro) e dermatite atópica. A resposta imune pode ser também independente de IgE (esofagite eosinofílica, gastrite eosinofílica) ou mistas que é uma combinação de ambos (45, 49).

As manifestações clínica nas reações clássicas mediadas por IgE são imediatas e resultado da liberação de mediadores como histamina, leucotrienos e ativador de plaquetas por mastócitos e basófilos. Para ativação dos mastócitos e basófilos é necessário que um alérgeno específico se ligue a dois anticorpos IgE específicos ligados por sua vez aos seus receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI), o que leva a indução de reação cruzada entre os FcεRI e ativação destes. É proposto que a quebra da tolerância oral a um determinado alérgeno levaria a uma desregulação das respostas Th2 e indução de sensibilização e de células B na produção de IgE específico para este alérgeno (49).

Para identificar a sensibilização as proteínas do trigo são realizados testes sorológicos que avaliam a presença de anticorpo IgE contra estas proteínas e testes cutâneos (teste de contato e teste puntura). O teste de contato é tido por certos

autores como útil na identificação reações alimentares independentes de IgE (reações tardias) e de gatilhos alimentares no desencadeamento de esofagite eosinofílica e dermatite. Entretanto, quando não se tem uma história clínica clara de reação IgE dependente para o trigo, mesmo se a sorologia for positiva, é proposto que seja necessário um desafio alimentar oral supervisionado de perto com profissionais treinados para atendimento a casos de anafilaxia e equipamentos adequados, especialmente em casos mais severos (45, 49).

O tratamento é feito com a exclusão total de alimento contendo trigo (49).

2.3.3 Sensibilidade ao glúten não celíaca

É uma síndrome caracterizada por sintomas intestinais e extra-intestinais, após a ingestão de alimentos fontes de glúten, em indivíduos em que a DC e alergia ao trigo foram descartadas, e que a adoção de uma dieta isenta de glúten leva a uma rápida remissão dos sintomas e piora entre horas a alguns dias após a reintrodução (12, 44, 45, 50). Os sintomas clínicos podem se sobrepor aos vistos na DC e alergia ao trigo, com um espectro variável entre os pacientes, a citar entre os sintomas intestinais mais comuns: gases, dores abdominais, diarreia, dor epigástrica, náusea, aerofagia, hábitos intestinais alternados, constipação, estomatite aftosa. Já entre os sintomas extra-intestinais mais comuns pode-se citar: falta de bem-estar, cansaço, dor de cabeça, ansiedade, mente nebulosa, fraqueza de membros, dores nos músculos e nas articulações, dermatites e erupções cutâneas (43, 50).

Estudo realizado por Volta et al (51) encontrou uma prevalência de IgG anti-gliadina detectada nestes pacientes em torno de 56,4%, sendo mais baixa que a encontrada em celíacos mas acima do visto em pacientes saudáveis. Por sua vez, a prevalência de IgA anti-gliadina foi de 7,7% sendo considerada muito baixa (51). Quanto aos genótipos HLA DQ2 e HLA DQ8, uma prevalência de 50% foi vista em pacientes com SGNC, sendo inferior ao encontrado na DC (95%) e pouco maior que o encontrado na população saudável de 30% a 40% (12, 45).

Há ainda uma ausência de biomarcadores específicos para diagnóstico da SGNC. Diante disto, em 2014, ocorreu em Salerno na Itália, o terceiro encontro internacional de especialistas em TRG, em que foi proposto um protocolo para o

diagnóstico de SGNC para ser usado tanto na prática clínica como em pesquisas em pacientes com suspeita de SGNC que estejam ingerindo habitualmente alimentos fonte de glúten. O protocolo consta de duas fases, a primeira em que avalia a resposta clínica à retirada de alimentos fontes de glúten da dieta e a segunda em que é avaliado o efeito com a reintrodução do glúten. Os critérios utilizados para avaliar as alterações nos sintomas foram de certa forma arbitrários e ainda necessitam de validação científica (50).

A prevalência na população geral ainda não foi determinada devido ao frequente autodiagnóstico em que pessoas retiram alimentos fontes de glúten sem indicação médica ou nutricional (12). Caio e colegas (43) mencionam em seu trabalho que evidências informais, baseada em estudos heterogêneos e com definições inconsistentes da doença, indicam uma prevalência que varia entre 0,5 a 6%.

Estudo realizado por Sapone et al (13) demonstrou por análise de biópsia de mucosa duodenal de pacientes com SGNC, o aumento do número de linfócitos intraepiteliais (IELs), o aumento da expressão de TLR2 em células epiteliais e redução de FOXP3. Este estudo sugere a presença de uma resposta imune inata em pacientes com SGNC. Outro estudo realizado por Uhde e colegas (15) observaram em pacientes com auto-relato de SGNC níveis aumentados no soro de CD14 solúvel e proteína ligadora de lipopolissacarídeo, marcadores de ativação de sistema imune inato (43). Por sua vez, Brottveit et al (14) demonstrou aumento nos níveis de IFN- gama e no número de LIEs na mucosa duodenal após o desafio com glúten, in vivo, em pacientes com SGNC. Tal resultado foi apontado como indicativo da participação também do sistema imune adaptativo (43). Entretanto, Sabatino et al (16), não observaram anormalidades na resposta imune das mucosas de pacientes que com autodiagnóstico de SGNC, pela análise de citocinas relacionadas ao sistema imune inato e adaptativo em biópsias duodenais cultivadas ex-vivo.

Embora estudos indiquem o glúten como o principal gatilho na SGNC, outros constituintes do trigo, centeio e cevada contêm componentes que podem induzir sintomas, como os inibidores de amilase-tripsina (ATIs) e os oligo,di, monossacarídeos e polióis fermentáveis (FODMAPs) e poderiam também ser gatilhos no desencadeamento dos sintomas da SGNC (43, 44, 50, 52, 53). Estudo realizado por Junker et al (53) demonstrou que ATIs do trigo podem ativar o sistema imune inato via o complexo TLR4-MD2-CD14 com liberação de citocinas pró-

inflamatórias tanto *in vitro* como *in vivo* após desafio. Já os FODMAPS são carboidratos de cadeia curta, presentes em grande quantidade no trigo (frutano), que possuem uma pobre absorção no intestino, e com isto são rapidamente fermentados pela microbiota intestinal, levando ao aumento de gases e sintomas relacionados a SII em indivíduos susceptíveis (54). Alguns estudos têm mostrado a melhora de sintomas gastrointestinais relacionados à restrição de FODMAPs (52, 55). Assim, diante das evidências de que outros componentes do trigo, que não o glúten, podem estar associados aos sintomas da SGNC, alguns autores propõem que o termo que seria mais adequado para esta condição seria “sensibilidade ao trigo não celíaca”, desde que não se esqueça que outros grãos que contêm glúten como o centeio e a cevada também podem ser gatilhos nesta doença (43, 44, 50).

Ainda não há consenso entre os especialistas quanto a presença de alteração na permeabilidade intestinal na SGNC, com estudos escassos e com resultados controversos (13, 56). Estudo recente sugere comprometimento da barreira epitelial intestinal, devido a aumento no soro de proteína ligadora de ácidos graxos 2 (FABP2), considerada um marcador de danos nas células epiteliais intestinais (15).

Molina-Infant e colegas (57) realizaram uma revisão sistemática que avaliou 10 ensaios clínicos com desafio com glúten, duplo-cego e placebo-controlado, com um total de 1312 adultos. No desafio alimentar, a quantidade de glúten administrada variou de 2 a 52g/ dia, o tempo de 1 dia a 6 semanas e o período de *wash-out* nos estudos com troca cruzada variou entre 3 dias a no mínimo 2 semanas. Um dos estudos utilizou o trigo ao invés do glúten no desafio. A revisão mostrou que 80% dos pacientes que foram responsivos a uma DIG e considerados como portadores de SGNC, ao passarem para a fase de desafio com glúten, duplo-cego, placebo-controlado, conforme recomendado na literatura atual como padrão ouro para diagnóstico, não tiveram o diagnóstico formal de SGNC confirmado. Uma outra observação importante, foi que 40% dos pacientes com SGNC apresentaram uma resposta nocebo. Os autores sugerem a possibilidade de o glúten não ser o fator causal dos sintomas na grande maioria de pacientes com auto-relato de SGNC.

2.4 Implicações nutricionais da retirada de alimentos fonte de glúten da dieta

Muitos estudos têm relatado que dietas isentas de glúten (DIG) estão associadas com um aporte menor de fibras, minerais (zinco, magnésio, cálcio e ferro), vitaminas (niacina, riboflavina, vitamina B12, vitamina D e ácido fólico) e o aumento no consumo de açúcares, calorias, sal e gorduras saturadas (58-60).

A menor ingestão de fibra tem sido associada à baixa quantidade de fibras em grande parte dos produtos industrializados sem glúten. Estes produtos geralmente são feitos de amidos ou farinha que passaram por refinamento no qual a camada externa rica em fibras é removida, ficando a parte com amido do grão. A redução de grãos contendo glúten ricos em fibra é um outro fator que pode contribuir para a menor quantidade de fibras da DIG (58, 59). O consumo adequado de fibras está relacionado a benefícios a saúde como na prevenção de doenças crônicas como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (58, 61).

Os alimentos industrializados isentos de glúten mencionados também são apontados como uma das possíveis causas da baixa ingestão de vitaminas e minerais e maior ingestão de calorias, açúcares, sal e gordura saturada. O surgimento no mercado de produtos fortificado com vitaminas e minerais, contribui para a melhora na qualidade nutricional destes produtos (58, 59). Um maior consumo de sal, açúcares e gorduras saturadas tem sido mostrado em estudos como potenciais riscos no desenvolvimento de doenças crônicas.

Buscando solucionar estas possíveis inadequações nutricionais na DIG e se obter uma dieta balanceada, autores sugerem o consumo de pelo menos 5 porções dia de frutas e vegetais por serem ricos em vitaminas e minerais e preferir alimentos naturalmente livres de glúten a produtos processados, mas caso se escolha estes últimos prestar atenção na composição nutricional nos rótulos. Uma alternativa nutricionalmente interessante é a introdução dos chamados pseudo-cerais (amaranto, quinoa, trigo sarraceno) por serem fonte de proteínas, fibras, ferro, ácido fólico, gorduras poli-insaturadas e polifenóis (58, 60).

É importante ressaltar que o glúten é uma proteína de baixo valor biológico e, assim sendo, sua restrição alimentar não traz nenhuma consequência ao aporte proteico da dieta (62). Além disso, grande parte do glúten ingerido está nas farinhas refinadas (pobres em fibras e minerais) ou na adição de glúten como espessante

alimentar em produtos ultra processados, baixos em nutrientes, como sopas, caldos, temperos artificiais, dentro outros. Assim, embora as indicações de uma dieta isenta de glúten sejam restritas aos TRG, a restrição de alimentos fontes de glúten, quando feita dentro de uma dieta equilibrada e orientada por profissionais competentes, pode ser feita por longos períodos, sem maiores riscos ao estado nutricional do indivíduo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do atual estudo é avaliar o impacto da restrição dietética do glúten do trigo, centeio e da cevada na fibromialgia, com base nos sinais e sintomas e em marcadores inflamatórios.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o consumo alimentar da população a ser estudada, antes e após a retirada do glúten
- Análise dos pacientes com dieta isenta de glúten por 8 semanas e após 7 dias de desafio alimentar com glúten e placebo, nos seguintes parâmetros:
 - Dados antropométricos: peso, altura, IMC, circunferência abdominal
 - Impacto da fibromialgia na qualidade de vida
 - Parâmetros inflamatórios (citocinas IL6, IL10, IL1 beta)
 - Sintomas relatados

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção do grupo

Trata-se de um estudo simples-cego e controlado, cuja amostra foi determinada por conveniência. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), parecer 1.269.563 (Anexo A).

A divulgação da pesquisa foi feita entre maio de 2015 e julho de 2016, pela rádio local de Mateus Leme, site oficial do município, afixação de cartazes nos postos de saúde do município e por profissionais da área de saúde. Os critérios de inclusão foram mulheres acima de 18 anos com diagnóstico clínico prévio de FM, de acordo com os critérios do American College of Rheumatology de 2010 (20). Foram excluídas mulheres grávidas ou lactantes, com sorologia positiva para doença celíaca ou alergia ao trigo, portadores de doenças auto-imunes e de doenças que não façam parte das comorbidades associadas à FM e que poderiam influenciar nos resultados do estudo.

Quatorze mulheres preencheram os critérios acima e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2 Delineamento do Estudo

O experimento foi dividido em duas fases;

- Na Fase 1 (8 semanas) foi observado o efeito da retirada de fontes de glúten na evolução dos sintomas e sinais da fibromialgia e na qualidade de vida de 14 voluntárias.

- Na Fase 2 (2-3 semanas) o objetivo foi observar se a reintrodução do glúten (na forma de cápsulas, 6,3 g/dia) alteraria o quadro de sintomas e sinais da FM comparado à ingestão do placebo (proteína de arroz).

No início do experimento foi feita uma consulta individual para avaliação clínica do estado nutricional (peso, estatura, IMC, circunferência abdominal), hábito alimentar (por registro alimentar de 72 horas) e de exames de sangue recentes. Foram também aplicados os questionários sobre o Impacto da Fibromialgia (QIF); Escala de Gravidade dos Sintomas (EGS), de sintomas da sensibilidade ao glúten (QSSG) e de frequência alimentar (QFA). Foram ainda dadas orientações por nutricionista habilitada, para adoção da dieta isenta de glúten e cuidados sobre leitura de rótulos.

Após o início da dieta isenta de glúten (Fase 1, T0), as voluntárias foram entrevistadas semanalmente por telefone, para aplicação do QFA e do Questionário de sintomas de sensibilidade ao glúten. Na quarta semana sem glúten (Fase 1, T4), foram aplicados o Questionário sobre o Impacto da Fibromialgia (QIF) e a Escala de Gravidade dos Sintomas (EGS). Na oitava semana (Fase -1 T8) após o início da dieta isenta de glúten foram realizadas novas avaliações do estado nutricional, aplicação dos questionários QFA, QIF, EGS, QSSG e coleta do registro de 72 horas. Amostras de sangue foram coletadas no T0 para avaliação de sorologia para doença celíaca, alergia ao trigo e para a dosagem de citocinas no soro, sendo esta última também realizada no tempo 8 e no tempo 10 (Figura 4).

Na sétima semana de dieta sem glúten, as 7 voluntárias que participaram da segunda fase do estudo iniciaram o consumo do placebo (6,4g proteína isolada de arroz, divididos em 12 cápsulas/dia) durante 7 dias. Após período de *wash-out* de 3 dias, as cápsulas de placebo foram substituídas por cápsulas com glúten de trigo (Granotec®), contendo ao todo 8,4g/dia de isolado de glúten (equivalente a 6,3g/dia de proteína do glúten) (Figura 4). As cápsulas contendo glúten ou placebo eram

indistinguíveis, somente os envolvidos na pesquisa tinham conhecimento de quais cápsulas estavam sendo administradas. Todas as voluntárias foram mantidas na dieta isenta de fontes de glúten durante toda Fase 2.

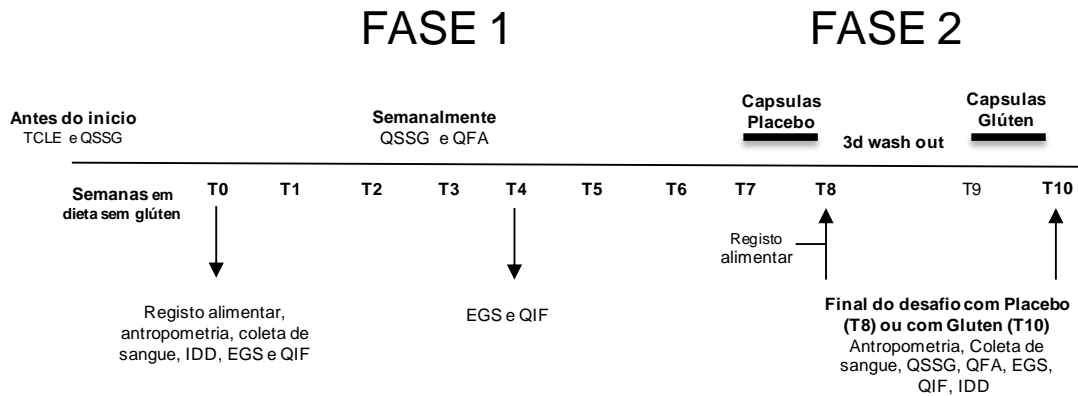


Figura 4. Modelo experimental. Abreviações: TCLE, termo de consentimento livre e esclarecido; QSSG, questionário de sensibilidade ao glúten; IDD, Índice de dor difusa; EGS, escala de gravidade de sintomas; QIF, questionário sobre o impacto da fibromialgia; QFA, questionário de frequência alimentar.

A coleta de dados foi realizada no Centro de Especialidades de Mateus Leme (MG/ Brasil) e por telefone. A primeira coleta de sangue foi realizada no laboratório LaborAnálise (Mateus Leme) e as demais, no Laboratório Municipal de Mateus Leme. As aferições da IgA total e IgE para trigo foram feitas no Laboratório LaborAnálise e a dosagem da IgA anti-transglutaminase e citocinas séricas foram feitas no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN), na Universidade Federal de Minas Gerais.

4.3 Questionários

4.3.1 Questionário de Sintomas de Sensibilidade ao Glúten (QSSG)

O QSSG foi utilizado para avaliar se o indivíduo é responsivo a retirada do glúten baseado no protocolo de Catassi et al 2015 (63). Foi solicitado às voluntárias que determinassem, duas semanas antes do tempo inicial, três dos sintomas listados na tabela do questionário que tinham maior impacto no seu dia a dia e foi estabelecida uma nota de 1 a 10 (escala de intensidade) para cada um dos sintomas. Esses sintomas foram avaliados semanalmente por mais duas semanas para estipular o valor no tempo basal (T-2, T-1 e T0). Os sintomas que obtiveram uma resposta maior ou igual a três na escala de intensidade foram selecionados para acompanhamento. O questionário foi reaplicado semanalmente durante 7 semanas (na Fase 1), para acompanhar a evolução destes sintomas em relação ao tempo basal. O indivíduo foi definido como responsivo à retirada de glúten se: houvesse melhora $\geq 30\%$ nos sintomas acompanhados em relação ao tempo basal (ou melhora de pelo menos um dos sintomas, sem o agravamento dos demais), por um período mais longo que a metade do tempo de observação (50).

Na Fase 2, os sintomas foram avaliados antes de iniciar cada desafio (placebo e glúten). O diagnóstico de SGNC poderia ser confirmado caso houvesse piora de 30% ou mais quando o paciente estivesse em uso de cápsulas de glúten comparado ao período de ingestão de placebo.

4.3.2 Questionário sobre o impacto da fibromialgia (QIF)

Este questionário avalia o impacto da fibromialgia no dia a dia da pessoa. O resultado do questionário é dado como a média dos 10 itens que integram o QIF (ver anexo B). Para considerarmos a média global, todos os itens devem ter o mesmo intervalo de variação. Assim itens com pontuação máxima de 7 ou de 30 pontos foram ajustados, multiplicando-se o valor por 10 e dividindo pelo número máximo de pontos (7 ou 30, respectivamente) (64).

4.3.4 Escala de Gravidade de Sintomas (EGS)

Essa escala é utilizada não só para quantificar a gravidade dos sintomas da fibromialgia mas como também para acompanhamento longitudinalmente dos pacientes (ANEXO E e APÊNDICE D).

A pontuação final é entre 0 e 12 pontos e é obtida pela soma da pontuação da gravidade de 3 sintomas: fadiga, sono não reparador e sintomas cognitivos. Cada item é avaliado com pontuação de 0 a 3 (0= sem problema, 1 =leve, 2= moderado e 3 =intenso). O 4º item que completa a pontuação é o número de sintomas presentes, sendo 0=sem sintomas, 1=poucos sintomas (de 1 a 10 sintomas); 2= moderado número de sintomas (11 a 22 sintomas) e 3= muitos sintomas (acima de 22 sintomas) (20).

4.3.5 Registro Alimentar

Método que coleta informações sobre a ingestão atual de um indivíduo ou grupo. O voluntário foi orientado a anotar todos os alimentos e bebidas consumidos ao longo de 3 dias (APENDICE A). O registro foi realizado em dias alternados e abrangendo um dia do fim de semana (65). Posteriormente, os registros foram analisados no *Software Avanutri* e quantificado a ingestão média de calorias, carboidratos, proteínas, lipídios e fibras.

4.3.6 Questionário de Frequência Alimentar (QFA)

O QFA é um método de avaliação da qualidade alimentar, muito utilizado em estudos que avaliam a associação entre o consumo dietético e a ocorrência de desfechos clínicos (65). O QFA utilizado no estudo foi composto por uma lista de alimentos selecionados e da frequência de seu consumo. O objetivo de sua aplicação foi acompanhar a adesão dos pacientes à dieta sem glúten, além da qualidade da dieta (APENDICE B).

4.4 Avaliação antropométrica

As medidas antropométricas foram coletas por uma única nutricionista qualificada para tal procedimento, antes do início da Fase 1 com a dieta contendo fontes de glúten (T0), ao final do período sem glúten (T8) e ao final do desafio com glúten (T10). Foram aferidos peso, altura, IMC e circunferência abdominal de acordo com a literatura (65).

Para aferição do peso foi utilizado balança de plataforma Balmak®, com a voluntária descalça, vestindo roupas leves, de costas para o equipamento, em posição ereta, com os pés unidos ao centro da plataforma e braços estendidos ao longo do corpo.

A estatura foi aferida com o auxílio de um estadiômetro vertical com precisão de 0,1 cm, acoplado à balança. A voluntária foi orientada a ficar descalça e sem acessórios na cabeça, em posição ereta, com o olhar fixo no plano horizontal, calcanhares juntos, braços estendidos ao longo do corpo e peso distribuído igualmente entre os pés.

O Índice de Massa Corporal (IMC), após aferição do peso e da estatura, foi determinado pelo uso da seguinte fórmula: $IMC = p/a^2$; onde **p** equivale ao peso em quilogramas (kg) e **a** equivale à estatura do indivíduo em metros. O IMC foi classificado de acordo com o preconizado pela OMS (2000).

Para mensuração da circunferência da cintura foi utilizada uma fita antropométrica milimetrada, não flexível. A avaliação foi realizada com a participante em posição ereta, com a fita posicionada entre a região inferior da caixa torácica e a região superior da cicatriz umbilical. A leitura é feita no momento da expiração.

Circunferência abdominal foi aferida com o voluntário em posição ereta, com a fita num plano horizontal, posicionada passando por cima da cicatriz umbilical. Foi utilizada uma fita antropométrica milimetrada, não flexível.

4.5 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi feita no Laboratório Municipal ou no Laboratório LaborAnálise, ambos em Mateus Leme. Após jejum de 8 horas (sempre entre 7 a 10h da manhã), foram coletados 8mL de sangue periférico em tubos a vácuo sem anticoagulantes. O sangue foi centrifugado, soro separado em tubos e acondicionados em gelo para serem transportados ao Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, para serem mantidos a -80°C para análise posterior.

O soro foi utilizado para avaliar as citocinas IL6, IL10, IL1- β e IgA anti-transglutaminase, todas pelo método ELISA (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*) de captura, conforme as orientações do fabricante. Foi utilizado os kits comerciais Affimetrix eBioscience Ready-to-go! para as citocinas e Orgentec Diagnostika GmbH para a IgA anti-transglutaminase.

4.5.1 Dosagem de IgA anti-transglutaminase

Para determinar a concentração de IgA anti-transglutaminase no soro das participantes, 100 μL dos padrões e da amostra foram plaqueados, em duplicata, em microplacas de 96 poços. Foram incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Após, foram descartas e os poços lavados três vezes com 300 μL de solução de lavagem provenientes do próprio kit. Foram pipetados 100 μL de enzima em cada poço e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Foi descartado após e lavado novamente com 300 μL de solução de lavagem. Foi adicionado 100 μL de TMB em cada poço e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 μL de solução de parada em cada poço e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 450 nm. Segundo orientado pelo kit, a cor é estável por 30 minutos. Foi considerado negativo quando a concentração foi menor do que 10 U/mL e positivo quando maior ou igual a 10 U/mL.

4.5.2 Dosagem de citocinas séricas

Os níveis circulantes das citocinas IL-6, IL-10 e IL1- β no soro foram determinados por ensaio de Elisa, conforme instruções do fabricante (Affimetrix eBioscience Ready-to-go!).

4.6 Análise estatística

Para a comparação das variáveis de interesse, medidas antes da retirada do glúten e após 8 semanas em dieta sem glúten, foi realizado o teste t de Student para amostras pareadas. Nos casos em que o teste de Shapiro-Wilk indicou evidências contrárias à suposição de distribuição normal das variáveis, utilizou o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. O mesmo procedimento foi utilizado para comparação das variáveis medidas após 8 semanas sem glúten e após o desafio de 7 dias com glúten. Em todos os testes considerou-se nível de significância de 5%.

Para realização dos testes de hipótese e análise descritiva dos dados utilizou-se o software SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os gráficos foram construídos através do programa Prisma GraphPad 5.

5 RESULTADOS

A Figura 5 mostra o fluxograma dos indivíduos que participaram do ensaio clínico simples cego. Inicialmente foram selecionados 26 indivíduos com o diagnóstico de fibromialgia e que atenderam aos critérios do ACR (2010). Foram excluídos sete indivíduos, sendo seis por não atenderem os critérios de inclusão e um por falta de discernimento para compreender os questionamentos necessários durante a pesquisa. Foram realizadas avaliações para descartar doença celíaca e alergia ao trigo em 19 pacientes, todos os casos deram resultados negativos e foram encaminhados para o grupo de estudo. Ao longo do estudo três pacientes desistiram do trabalho, e outras duas foram excluídas, uma pelo diagnóstico de hipotireoidismo e outra devido ao uso de fitoterápicos com propriedades anti-inflamatórias, totalizando na primeira fase do estudo 14 pacientes, desses pacientes somente sete foram acompanhados durante a segunda fase do estudo.

A média da idade dos indivíduos foi de 50,71 (\pm 7,22) anos e da altura foi de 1,57 (\pm 0,06) metros. Observou-se que 50% dos pacientes apresentaram hipertensão arterial, 21,4% problemas ortopédicos e 14,3% labirintite.

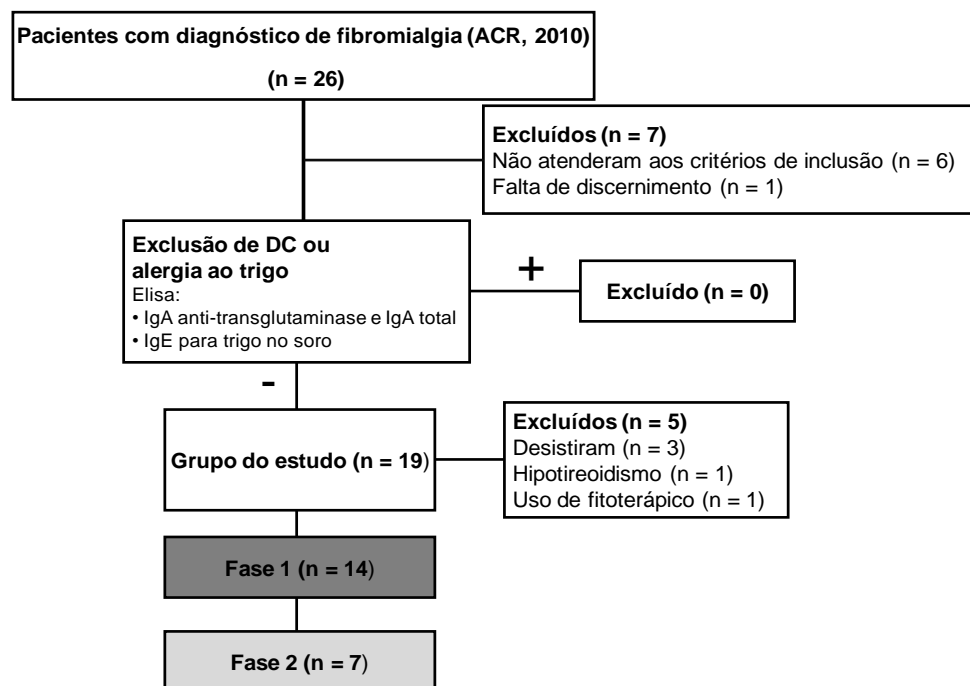


Figura 5. Fluxograma dos indivíduos que participaram do ensaio clínico simples cego.

5.1 FASE 1

A comparação dos dados antropométricos da população estudada, durante a Fase 1 estão mostrados na Tabela 1. Entre a 7^a e 8^a semanas experimentais, 7 voluntárias receberam cápsulas de placebo e 7 mantiveram apenas dieta isenta de glúten sem administração do placebo. Porém, ao comparar os dados entre a 7^a e 8^a semanas das voluntárias que receberam a cápsula de placebo com as que ficaram apenas com a dieta isenta de glúten, não houve diferenças estatísticas entre aquelas recebendo a proteína de arroz com as que não receberam. Por esta razão, os dados dessas semanas foram analisados em conjunto para o final da Fase 1.

Os resultados não mostraram diferenças significativas entre peso, IMC e circunferência abdominal quando se comparou o T0 e T8 da Fase 1.

Tabela 1. Comparação dos dados antropométricos de pacientes com Fibromialgia no início (T0) e após 8 semanas (T8) em dietas isentas de fonte de glúten atendidos no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 1)

Variáveis	Tempo Inicial	Tempo 8	P *
Peso	74,89 (±15,90)	74,53 (±16,08)	0,40
IMC¹	30,59 (±6,55)	30,43 (±6,63)	0,36
CA²	103,00 (± 12,77)	102,29 (±12,23)	0,12

* Teste t pareado. ¹ Índice de Massa Corporal; ² Circunferência Abdominal. n=14

Da mesma forma, a ingestão de calorias e macronutrientes, em T0 e T8 foi analisada. A retirada dos alimentos fontes de glúten não modificou a composição da dieta em relação às calorias totais, lipídeos e proteínas. A ingestão de carboidrato e fibras, porém, foram menores após 8 semanas sem ingestão de fontes de glúten.

Tabela 2. Comparação de calorias e macronutrientes de dietas rotineiras e após a retirada de alimentos fonte de glúten em indivíduos com fibromialgia atendidos no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 1)

Variáveis	Tempo Inicial	Tempo 8	P*
Calorias (kcal/dia)	1440 (± 468,1)	1287 (± 450,2)	0,36
Carboidrato (%)	52,48 (± 9,29)	46,34 (± 60,64)	0,049
Proteína (%)	17,65 (± 1,59)	20,02 (± 3,97)	0,08
Lipídeos (%)	27,50 (± 7,23)	33,63 (± 5,12)	0,09
Fibras (g)	13,51 (± 4,52)	8,82 (± 2,87)	0,01

* Teste t pareado. n= 7

A Figura 6A mostra as mudanças sobre o impacto da fibromialgia nas atividades cotidianas ao longo de oito semanas de retirada de fontes de glúten da dieta. Pelos resultados do QIF, observa-se uma melhora, com um menor impacto da doença na qualidade de vida após oito semanas sem glúten. Em relação à quantidade de sintomas da fibromialgia obtido pelo QSFM, nota-se que houve redução no número de sintomas entre o tempo inicial e após oito semanas (Figura 6B). Os resultados sugerem melhora dos sintomas da FM e da repercussão da doença nos indivíduos após a retirada das fontes de glúten.

Não houve alterações na gravidade dos sintomas da fibromialgia ao longo das oito semanas de retirada de fontes de glúten da dieta, segundo o resultado do EGS (Figura 6C). Quanto à alteração no número de regiões dolorosas no corpo obtido pelo Questionário de Índice de Dor Difusa, observa-se redução no número de regiões dolorosas após oito semanas de dieta isenta de glúten (Figura 6D).

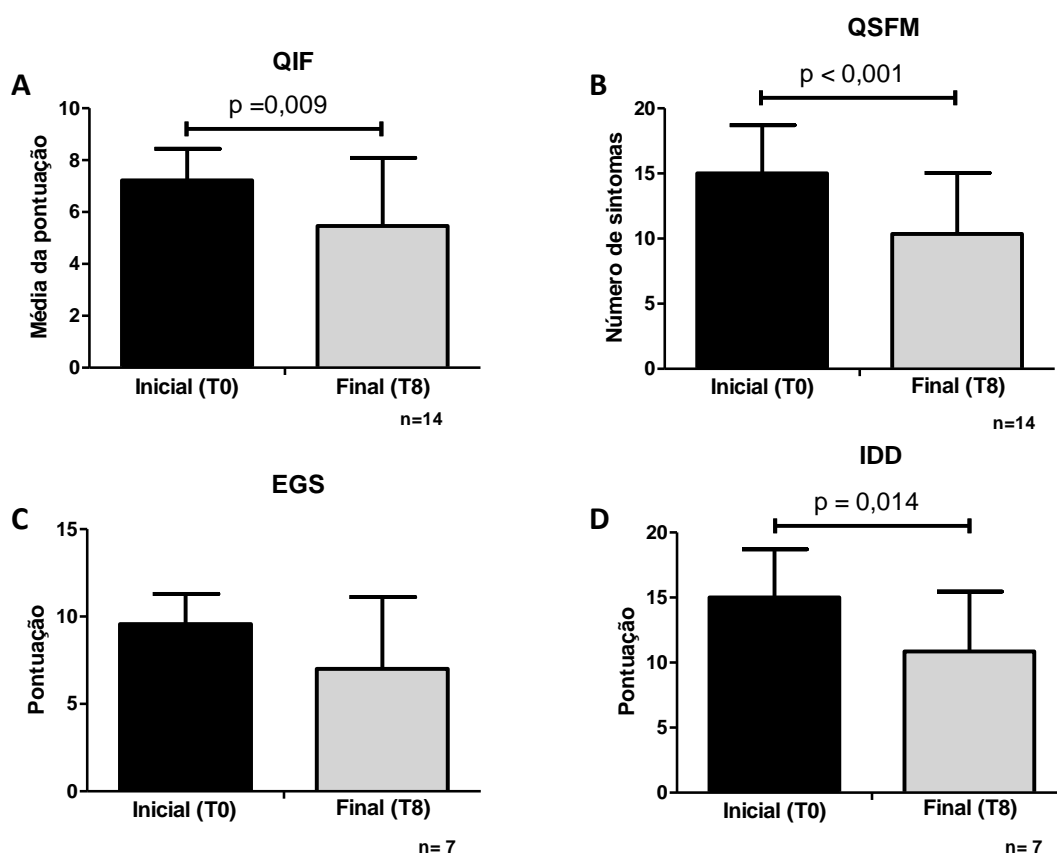


Figura 6. Comparação da evolução clínica de pacientes com fibromialgia na Fase 1, seguindo os Questionários sobre o Impacto da Fibromialgia (A), Questionário de Sintomas da Fibromialgia (B); Escala de Gravidade dos Sintomas (C); Índice de Dor Difusa (D), no início (T0) e após oito semanas (T8) em dietas isentas de fonte de glúten.

O glúten tem sido associado ao aumento de inflamação. Para avaliar se haveria alterações nos marcadores inflamatórios após a retirada do glúten, algumas citocinas foram medidas. Entretanto, não observamos diferenças dos níveis circulantes de IL-1 β , IL-6 e IL-10 quando T0 e T8 foram comparados (Tabela 3).

Tabela 3. Variações nas concentrações séricas de IL-1 β , IL-6 e IL-10 no início e no final de 8 semanas sem glúten em mulheres com fibromialgia atendidas no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 1)

Variáveis	Tempo Inicial	Tempo 8	P *
IL-10 ¹ (pg/mL)	67,09 (51,25 – 125,83)	67,08 (31,24 – 98,33)	0,73
IL-6 ² (pg/mL)	2,65 (0,01 – 14,26)	2,45 (0,01 – 8,73)	0,58
IL1- β ³ (pg/mL)	8,29 (0,01 – 80,43)	2,36 (0,01 – 51,14)	0,69

*Wilcoxon. ¹interleucina 10; ² interleucina 6; interleucina 1 beta. n= 14

Em seguida, foi feita uma análise do Questionário de Sensibilidade ao Glúten para a responsividade à retirada de alimentos fonte de glúten (feita em apenas 7 indivíduos). Desses, seis foram considerados responsivos, uma vez que apresentaram melhoras dos sintomas com a retirada de fontes de glúten (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de pacientes com fibromialgia identificados como possíveis portadores de sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) de acordo que o Questionário de Sintomas de Sensibilidade ao Glúten (QSSG) avaliado nas sete primeiras semanas sem glúten atendidos no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 1)

Variáveis	Número de pacientes (% total)
Responsivos ¹	6 (85,7%)
Não responsivos ²	1 (14,3%)

¹ presença de sensibilidade ao glúten não celíaca; ² sem sensibilidade ao glúten não celíaca. n=7

5.2 FASE 2

A comparação dos dados antropométricos das 7 voluntárias durante a Fase 2 está mostrada na Tabela 5. Não houve diferença significativa no peso, IMC e circunferência abdominal quando se comparou o final do desafio com glúten em relação ao final do período placebo.

Tabela 5. Comparação dos dados antropométricos após sete dias recebendo cápsulas contendo 8 gramas de proteína de arroz (Placebo) ou 8 gramas de glúten, em pacientes com fibromialgia atendidos no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 2)

Variáveis	Placebo	Glúten	P *
Peso	74,89 (±15,90)	74,53 (±16,08)	0,40
IMC ¹	30,59 (±6,55)	30,43 (±6,63)	0,36
CA²	103,00 (± 12,77)	102,29 (±12,23)	0,12

* Teste t pareado. ¹ Índice de Massa Corporal ² Circunferência abdominal. n= 7

Figura 7A, compara o impacto da fibromialgia no dia a dia dos pacientes entre os períodos de desafio com placebo (T8) e desafio com glúten (T10), segundo o resultado do QIF, não foi observado diferença entre a semana com glúten e a semana com placebo. Da mesma forma, em relação a redução dos sintomas (Figura 7B), obtido pelo questionário de sintomas da fibromialgia (QSFM), entre os períodos de desafio com placebo (T8) e glúten (T10), não foram vistas diferenças significativas. Os resultados sugerem que o desafio com glúten não acarretou piora dos sintomas da FM em relação ao placebo.

A Figura 7C demonstra que não houve alterações na gravidade dos sintomas da fibromialgia de acordo com os resultados da Escala de Gravidade de Sintomas (EGS) entre os períodos de desafio com placebo e glúten. Quanto à alteração no número de regiões dolorosas no corpo (obtidas pelo Questionário de Índice de Dor Difusa), não se observou redução no número de regiões dolorosas (Figura 7D). Os resultados sugerem que não houve piora da gravidade dos sintomas da FM e das regiões dolorosas após o desafio com glúten em relação ao placebo.

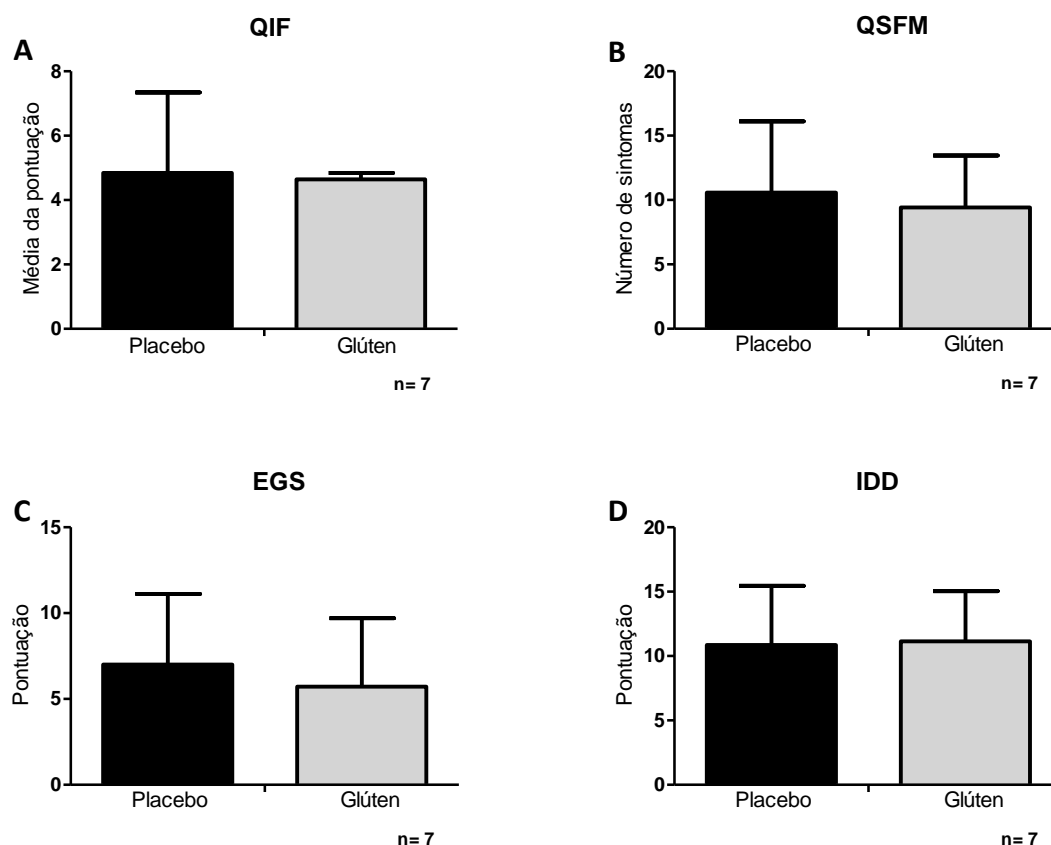


Figura 7. Comparação da evolução clínica de pacientes com fibromialgia, seguindo os Questionários sobre o Impacto da Fibromialgia (A), Questionário de Sintomas da Fibromialgia (B); Escala de Gravidade dos Sintomas (C); Índice de Dor Difusa (D), entre os períodos de desafio com placebo (T8) e desafio com glúten (T10), em mulheres com fibromialgia. (Fase 2)

Em seguida avaliou-se as variações nas concentrações sérica das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10, entre o desafio com glúten em relação ao placebo. Não foram observadas alterações em nenhuma citocina avaliada (Tabela 6).

Tabela 6. Variações nas concentrações séricas de IL-1 β , IL-6 e IL-10 entre os períodos de desafio com placebo (T8) e desafio com glúten (T10), em mulheres com fibromialgia atendidas no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 2)

Variáveis	Desafio Placebo	Desafio Glúten	P *
IL-10 ¹ (pg/mL)	65,83 (51,67 – 98,33)	84,58 (60,00 – 101,25)	0,24
IL-6 ² (pg/mL)	2,47 (0,01 – 8,73)	2,90 (1,33 – 8,40)	0,94
IL1- β ³ (pg/mL)	2,36 (0,01 – 51,14)	0,58 (0,01 – 52,57)	1,00

*Wilcoxon. ¹interleucina 10; ² interleucina 6; interleucina 1 beta. n= 7

Embora 6 pacientes tivessem sido classificadas como portadoras de SGNC na primeira fase, esse diagnóstico não foi confirmado na fase dois, uma vez que nenhuma delas apresentou piora dos sintomas com a ingestão de glúten em relação ao placebo (tabela 7).

Tabela 7. Percentual de pacientes com fibromialgia identificados como possíveis portadores de sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) de acordo que o Questionário de Sintomas de Sensibilidade ao Glúten (QSSG) comparando sintomas durante a fase de suplementação com cápsulas placebo ou de glúten, em mulheres com fibromialgia atendidas no Centro de Especialidades Clínicas no município de Mateus Leme – MG, nos anos de 2015 e 2016 (Fase 2)

Confirmação da SGNC*	Número de pacientes (% total)
Sim¹	0 (0%)
Não²	6 (100%)

* Sensibilidade ao glúten não celíaca. ¹ piora dos sintomas com a ingestão do glúten comparado com o período placebo; ² sem piora dos sintomas com a ingestão do glúten em relação ao placebo.

6 DISCUSSÃO

Na luz do nosso conhecimento, este é primeiro ensaio clínico simples cego que avaliou o efeito da restrição de alimentos fontes de glúten em pacientes com fibromialgia, quanto aos sintomas e marcadores inflamatórios, assim como quanto à evolução destes parâmetros após o desafio com glúten. Foi também a primeira pesquisa a avaliar a possível presença de sensibilidade de glúten não celíaca baseado no protocolo Salerno (50).

Os resultados sugerem uma melhora de vários parâmetros relacionados com a fibromialgia como redução do impacto da doença na rotina diária, do número de sintomas e de regiões dolorosas após oito semanas de dieta isenta de fontes de glúten. Entretanto, o desafio com 8g do glúten não teve nenhum impacto sobre os parâmetros analisados. Esses resultados em conjunto sugerem que nenhuma paciente apresentou diagnóstico para sensibilidade ao glúten não celíaca e que a ingestão de quantidades moderadas de glúten, pelo menos por um período de 7 dias, não está relacionada com agravamento da fibromialgia.

Como esperado, a retirada de alimentos fonte de glúten modificou a composição da dieta, principalmente em relação à ingestão fibras e carboidratos. Tanto por observações do Questionário de Frequência Alimentar semanal quanto pela análise do Registro Alimentar de 3 dias (coletado no final do período sem glúten), pode-se inferir que as pacientes, como forma de substituir os alimentos fonte de glúten, optaram por alimentos feitos com fubá ou polvilho. Estes alimentos apresentam baixo conteúdo em fibras, o que poderia justificar redução destas após a retirada do glúten. A redução dos carboidratos do pão e massas com trigo e a substituição por produtos com menos carboidratos seria a possível explicação para a redução na porcentagem de carboidratos na dieta após a retirada de alimentos fonte de glúten. Esses dados estão de acordo com os da literatura, mostrando que alimentos típicos de uma dieta isenta de glúten são constituídos de amidos e farinhas refinadas baixos em fibras (60).

Embora muitos estudos avaliaram o aporte nutricional de dietas isentas de glúten (58, 59, 66, 67) é importante ressaltar que este é o primeiro estudo que realiza esta análise em pacientes com fibromialgia. Um ensaio clínico randomizado realizado por Senna et al. (68) avaliou os resultados do QIF após uma dieta

hipocalórica ou dieta normocalórica em portadores de FM. Os autores observaram que a perda de peso naqueles com dieta hipocalórica foi acompanhada da melhora do QIF em relação ao grupo com dieta normocalórica sem perda de peso. Em nosso estudo, não houve diferenças entre a ingestão de calorias entre os grupos. Desta forma, é pouco provável os resultados do presente trabalho tenham sofrido influência da ingestão calórica.

Em concordância com a ingestão calórica, não houve mudanças significativas no peso, IMC ou conteúdo de gordura abdominal após as oito semanas de dieta isenta de fontes de glúten. O mesmo pode ser observado ao final do desafio com placebo ou glúten, quando também não ocorreu alteração nos mesmos parâmetros.

Estudos prévios do nosso grupo (69, 70) mostraram que camundongos recebendo dietas normo ou hipercalóricas com glúten (4,5%) apresentaram aumento de peso e tecido adiposo em comparação ao grupo sem glúten. As alterações no peso foram associadas ao aumento de marcadores inflamatórios e redução da termogênese e do “*browning*” no tecido adiposo (69). Neste estudo clínico, a perda de peso não pode ser confirmada, talvez pelas condições ambientais de cada experimento.

Acreditamos que, embora o glúten possa ter algum papel no ganho de peso por reduzir a termogênese, as variáveis ambientais (incluindo a alimentação) as quais as voluntárias são submetidas podem mascarar ou mesmo contrapor os efeitos do glúten. Os resultados do presente estudo estão em concordância com os de Slim et al (39) que também não observaram diferença no peso e circunferência abdominal com a retirada do glúten da dieta.

Alguns estudos experimentais *in vitro* mostram um efeito proinflamatório do glúten ou de seus componentes. Uma meta-análise avaliando ensaios clínicos que mediram algumas citocinas em pacientes com fibromialgia encontraram aumento de IL-6, mas não de IL-1 β , naqueles com FM em relação aos controles (5). Por essa razão, analisamos os níveis séricos das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10 antes e após a retirada do glúten e no período de desafio. Nossos resultados não mostraram nenhuma influência do glúten nos níveis dessas citocinas nos períodos analisados. Esses resultados podem ser devido a fatores relacionados à dieta ou mesmo a doença de base. Como a FM é uma doença que tem sido associada à inflamação (5), hipótese reforçada com a comparação dos nossos resultados com o de grupo controles saudáveis de estudos

brasileiros, pode ocorrer que os efeitos pró-inflamatórios do glúten não tenham sido suficientes para aumentar ainda mais a inflamação decorrente da FM (71,72). Alternativamente, a ingestão do glúten na dieta cotidiana pode não causar níveis detectáveis dessas citocinas no soro. Infelizmente, existe um número escasso de estudos avaliando o impacto da restrição de glúten nas citocinas séricas de pacientes com fibromialgia, impedindo de obter uma resposta definitiva sobre o assunto.

Do ponto de vista antropométrico e bioquímico, nenhuma alteração importante ocorreu pela retirada ou reintrodução do glúten. Para avaliarmos o impacto da retirada do glúten na evolução da doença, foram utilizados vários questionários, com o objetivo de obter um panorama amplo da doença.

Em relação aos resultados da primeira fase, nota-se melhora dos sintomas da fibromialgia e da repercussão da doença bem como redução de regiões dolorosas após a retirada de fontes de glúten da dieta. O mesmo resultado foi observado na aplicação do questionário baseado no protocolo de Salerno, em que a maioria das pacientes foram consideradas portadoras de SGNC de acordo com primeira fase do protocolo, isto é, apresentaram melhora com a dieta isenta de glúten. Esses dados falam a favor da presença de sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) naquelas pacientes. Entretanto, não houve piora desses parâmetros após desafio com glúten em relação ao desafio com placebo (Fase 2), o que seria de se esperar com a reintrodução do glúten. Assim, acreditamos que seja pouco provável que as voluntárias sejam portadoras de SGNC e que o glúten tenha sido responsável pela melhora dos sintomas da FM.

Alguns estudos relatam melhora do quadro de FM com a retirada de glúten da dieta. Porém, as características de cada grupo de pacientes assim como os métodos de avaliação divergem do presente estudo, o que pode ter causado resultados diferentes.

Isasi et al. 2014 (17) acompanharam 20 pacientes com fibromialgia e linfocitose duodenal mantidos em dieta isenta de glúten por cerca de 16 meses. Em 15 deles ocorreu desaparecimento da dor crônica generalizada, o que levou a hipótese de que a SGNC poderia ser uma das possíveis causas da FM. Além disso, houve retorno dos sintomas da FM em 7 pacientes quando fontes de glúten foram reintroduzidas na dieta. Porém, não foram utilizados questionários validados e nem análise dos dados obtidos por testes estatísticos. Além disso, não só alimentos fonte

de glúten foram retirados, houve administração de suplementos de micronutrientes e também a retirada de leite e derivados, uma vez que o estudo contava com alguns pacientes com intolerância à lactose. Além disso, o desenho experimental não contava com um grupo placebo controle.

Outro estudo com dietas isentas de glúten foi realizado por Rodrigo et al (18) que observaram a resposta a tais dietas em pacientes com FM e síndrome do intestino irritável (SII) apresentando ou não linfocitose duodenal. Após um ano de acompanhamento (por questionários como o de Impacto da Fibromialgia (QIF), de Qualidade de Vida, dos pontos dolorosos), houve melhora significativa na maioria dos parâmetros naqueles com linfocitose duodenal comparado a uma discreta e variável melhora naqueles sem linfocitose. Os autores concluem que uma dieta isenta de glúten não seria apropriada para paciente com FM sem linfocitose duodenal. Entretanto, por não ter sido um estudo randomizado, duplo-cego controlado seriam necessários mais estudos para confirmar esses resultados. Além disso, como ocorre na maioria dos estudos da literatura, não foram feitos desafios com glúten para confirmar ser a retirada desse nutriente o responsável pela melhora no grupo com linfocitose, como ocorreu no atual estudo.

Por outro lado, Slim e colaboradores (39) acompanharam pacientes com FM recebendo dieta hipocalórica (até 1500 kcal/dia) ou dieta livre em calorias, mas isenta de alimentos fonte de glúten, não observaram diferença entre os dois grupos quanto à redução dos sintomas de sensibilidade ao glúten. Os autores concluem não haver um efeito específico do glúten nos sintomas de fibromialgia e sugerem que outros fatores podem estar envolvidos nesta melhora clínica. Tais conclusões vão de encontro ao atual estudo, em que a melhora dos sintomas da fibromialgia não foi diretamente relacionada à retirada do glúten, como notado pelos resultados neutros da reintrodução desse nutriente. Entretanto, ao contrário do atual estudo, Slim et al não avaliaram a ingestão calórica e a composição das dietas daqueles com dieta livre e sem fontes de glúten para comparar o aporte calórico ou alteração de nutrientes entre as dietas.

Como pode ser visto pelos resultados apresentados, sem a fase de desafio com glúten, nossa conclusão seria equivocada, sugerindo presença de sensibilidade ao glúten não celíaca e melhora nos sintomas com a retirada do glúten. Diante disto, cabe ressaltar a importância da análise da fase de desafio com o glúten, como

realizado neste estudo e raro em estudos similares descritos na literatura em pacientes com fibromialgia.

Diante dos nossos resultados, cabe a pergunta de quais fatores foram responsáveis pela melhora na primeira fase de retirada de fontes de glúten.

Primeiramente, pode-se pensar no efeito da própria atenção à saúde, visto que as pacientes são da rede pública e receberam atenção especial. No caso de pacientes com FM, muitos sintomas são inespecíficos ou subjetivos e assim, os contatos frequentes com os profissionais envolvidos na pesquisa podem ter contribuído para a melhora. Além disto, a expectativa de melhora com a modificação dietética, pode ter levado a um efeito placebo durante a intervenção, como já descrito na literatura (57). Para avaliar essa hipótese seria necessário um grupo controle, submetido ao mesmo protocolo de pesquisa, mas sem a introdução de uma dieta isenta de glúten. Infelizmente, devido ao pequeno número de pacientes obtidos e pelo tempo necessário para terminar a pesquisa, optamos por não realizar esse grupo em um primeiro momento.

Outra possibilidade para a melhora dos sintomas com a retirada de fontes de glúten nessas pacientes é que a melhora pode ser devido a outros componentes dos alimentos fontes de glúten como FODMAPs - oligo, di, monossacarídeos e polióis fermentáveis (frutanos do trigo) ou outros componentes da farinha de trigo. FODMAPS são carboidratos de cadeia curta, presentes em grande quantidade em alimentos como trigo, leite, alho, cebola, entre outros. Devido a sua pobre absorção no intestino são rapidamente fermentados pela microbiota, levando ao aumento de gases e sintomas relacionados a SII em indivíduos susceptíveis (54). Alguns estudos têm mostrado a melhora de sintomas gastrointestinais relacionados à restrição de FODMAPs, sintomas estes que também fazem parte do espectro de sintomas da FM (52). No protocolo de Salerno, os autores propõem que pacientes apresentando resultados negativos ao desafio com glúten, como o observado neste estudo, devem ser investigados para outras causas que possam levar a sintomas similares da SII, como intolerância a FODMAPS e supercrescimento bacteriano no intestino curto – SIBO (50). De encontro a esta sugestão, está o estudo de Pimentel et al (73) demonstrando teste respiratório da lactulose alterado em 100% dos pacientes com FM avaliados. Uma possível hipótese seria que os FODMAPs ou outros componentes do trigo (como os inibidores da amilase-tripsina - ATIs), poderiam piorar um quadro já existente de SIBO. O desequilíbrio da microbiota levaria a um

aumento da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, a uma maior entrada de antígenos dietéticos e microbianos, o que levaria a ativação de células T (74). Acreditamos que um desafio com farinha de trigo (comparado com outra farinha sem glúten rica em FODMAPs) poderia ser útil em avaliar possível participação dos demais componentes do trigo nos sintomas da FM.

Pode-se também supor que a quantidade de glúten administrado no desafio seja pequena para desencadear os sintomas da FM. A escolha da quantidade de glúten utilizada no desafio (cerca de 6,3 gramas) foi calculada a partir de dados da ingestão média de glúten na população de países ocidentais (50) e em concordância com alguns estudos na literatura (75, 76). Porém, os efeitos do glúten na FM podem ser causados por uma ingestão em excesso de glúten e não por quantidades consideradas normais. Para isso, um estudo com reintrodução com diferentes quantidades de glúten poderia verificar essa hipótese.

Dentre as limitações do atual estudo estão: a falta de um grupo controle, ausência de marcadores específicos para a transgressão da dieta e o pequeno tamanho amostral. Novos estudos serão necessários, em delineamento duplo-cego controlado com tamanho amostral maior e desafio com quantidades crescentes de glúten para confirmar que o glúten não está diretamente envolvido nos sintomas da FM avaliados por nós.

7 CONCLUSÃO

A retirada de alimentos fonte de glúten resultou numa melhora dos sintomas e no impacto da fibromialgia na qualidade de vida, sem alterações nos parâmetros antropométricos e níveis circulantes das citocinas IL1- β , IL-6 e IL-10. Porém, a reintrodução do glúten (8g) não teve impacto sobre os parâmetros avaliados, sugerindo não ser o glúten o fator responsável pela melhora na intervenção. Nenhuma das pacientes em estudo apresentou diagnóstico confirmado de sensibilidade ao glúten não celíaca, considerando a fase de desafio com glúten.

Nossos resultados sugerem que dietas sem fontes de glúten podem melhorar os sintomas da FM, mas que a melhora não é devida diretamente à retirada do glúten.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Heymann RE, UNIFESP, Paiva EdS, UFPR, Helfenstein Junior M, UNIFESP, et al. Brazilian consensus on the treatment of fibromyalgia. *Rev Bras Reumatol.* 2010;50(1):56-66.
2. Cagnie B, Coppieters I, Denecker S, Six J, Danneels L, Meeus M. Central sensitization in fibromyalgia? A systematic review on structural and functional brain MRI. *Semin Arthritis Rheum.* 2014;44(1):68-75.
3. Protocolo e Diretrizes Terapêuticas – Fibromialgia - Bibliofarma. 2014.
4. Clauw DJ. Fibromyalgia: an overview. *Am J Med.* 2009;122(12 Suppl):S3-s13.
5. Uceyler N, Hauser W, Sommer C. Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome. 2016.
6. Uceyler N, Valenza R, Stock M, Schedel R, Sprotte G, Sommer C. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2656-64.
7. Sturgill J, McGee E, Menzies V. Unique cytokine signature in the plasma of patients with fibromyalgia. *J Immunol Res.* 2014;2014:938576.
8. Molina-Infante J, Santolaria S, Montoro M, Esteve M, Fernández-Benares F. Sensibilidad al gluten no celiaca: una revisión crítica de la evidencia actual. 2014;37(6):362–71.
9. Lu W, Gwee KA, Siah KT, Kang JY, Lee R, Ngan CC. Prevalence of Anti-deamidated Gliadin Peptide Antibodies in Asian Patients With Irritable Bowel Syndrome. *J Neurogastroenterol Motil.* 2014;20(2):236-41.
10. Lundin KE, Alaedini A. Non-celiac gluten sensitivity. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012;22(4):723-34.
11. Nijeboer P, Bontkes HJ, Mulder CJ, Bouma G. Non-celiac gluten sensitivity. Is it in the gluten or the grain? *J Gastrointest Liver Dis.* 2013;22(4):435-40.
12. Catassi C, Bai JC, Bonaz B, Bouma G, Calabrò A, Carroccio A, et al. Non-Celiac Gluten Sensitivity: The New Frontier of Gluten Related Disorders. *Nutrients.* 2013. p. 3839-53.
13. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med.* 2011;9:23.
14. Brottveit M, Beitnes AC, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL, Johansen FE, et al. Mucosal cytokine response after short-term gluten challenge in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(5):842-50.

15. Uhde M, Ajamian M, Caio G, De Giorgio R, Indart A, Green PH, et al. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut*. 2016.
16. Di Sabatino A, Giuffrida P, Fornasa G, Salvatore C, Vanoli A, Naviglio S, et al. Innate and adaptive immunity in self-reported nonceliac gluten sensitivity versus celiac disease. *Dig Liver Dis*. 2016;48(7):745-52.
17. Isasi C, Colmenero I, Casco F, Tejerina E, Fernandez N, Serrano-Vela JI, et al. Fibromyalgia and non-celiac gluten sensitivity: a description with remission of fibromyalgia. *Rheumatol Int*. 2014;34(11):1607-12.
18. Rodrigo L, Blanco I, Bobes J, de Serres FJ. Effect of one year of a gluten-free diet on the clinical evolution of irritable bowel syndrome plus fibromyalgia in patients with associated lymphocytic enteritis: a case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4):421.
19. Garcia-Leiva JM, Carrasco JL, Slim M, Calandre EP. Celiac symptoms in patients with fibromyalgia: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2015;35(3):561-7.
20. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(5):600-10.
21. Macfarlane GJ, Kronisch C, Dean LE, Atzeni F, Häuser W, Fluß E, et al. EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. 2016.
22. Queiroz LP. Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep*. 2013;17(8):356.
23. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004;31(3):594-7.
24. Jones GT, Atzeni F, Beasley M, Fluss E, Sarzi-Puttini P, Macfarlane GJ. The prevalence of fibromyalgia in the general population: a comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and modified 2010 classification criteria. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(2):568-75.
25. Sluka KA, Clauw DJ. Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Neuroscience*. 2016.
26. Arnold LM, Fan J, Russell IJ, Yunus MB, Khan MA, Kushner I, et al. The Fibromyalgia Family Study: A Genome-Scan Linkage Study. *Arthritis Rheum*. 2013;65(4):1122-8.
27. Ablin JN, Buskila D. Update on the genetics of the fibromyalgia syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2015;29(1):20-8.

28. Carvalho LS, Correa H, Silva GC, Campos FS, Baiao FR, Ribeiro LS, et al. May genetic factors in fibromyalgia help to identify patients with differentially altered frequencies of immune cells? *Clin Exp Immunol*. 2008;154(3):346-52.
29. Bondy B, Spaeth M, Offenbaecher M, Glatzeder K, Stratz T, Schwarz M, et al. The T102C polymorphism of the 5-HT_{2A}-receptor gene in fibromyalgia. *Neurobiol Dis*. 1999;6(5):433-9.
30. Offenbaecher M, Bondy B, de Jonge S, Glatzeder K, Kruger M, Schoeps P, et al. Possible association of fibromyalgia with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Arthritis Rheum*. 1999;42(11):2482-8.
31. Morton DL, Sandhu JS, Jones AK. Brain imaging of pain: state of the art. *J Pain Res*. 2016;9:613-24.
32. Jensen KB, Loitole R, Kosek E, Petzke F, Carville S, Fransson P, et al. Patients with fibromyalgia display less functional connectivity in the brain's pain inhibitory network. *Mol Pain*. 2012;8:32.
33. Geiss A, Rohleder N, Anton F. Evidence for an association between an enhanced reactivity of interleukin-6 levels and reduced glucocorticoid sensitivity in patients with fibromyalgia. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(5):671-84.
34. Kavelaars A, Broeke D, Jeurissen F, Kardux J, Meijer A, Franklin R, et al. Activation of human monocytes via a non-neurokinin substance P receptor that is coupled to Gi protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *J Immunol*. 1994;153(8):3691-9.
35. Mense S. The pathogenesis of muscle pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2003;7(6):419-25.
36. Kaartinen K, Lammi K, Hyten M, Nenonen M, Hanninen O, Rauma AL. Vegan diet alleviates fibromyalgia symptoms. *Scand J Rheumatol*. 2000;29(5):308-13.
37. Donaldson MS, Speight N, Loomis S. Fibromyalgia syndrome improved using a mostly raw vegetarian diet: An observational study. *BMC Complement Altern Med*. 2001. p. 7.
38. Holton KF, Taren DL, Thomson CA, Bennett RM, Jones KD. The effect of dietary glutamate on fibromyalgia and irritable bowel symptoms. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(6 Suppl 74):10-7.
39. Slim M, Calandre EP, Garcia-Leiva JM, Rico-Villademoros F, Molina-Barea R, Rodriguez-Lopez CM, et al. The Effects of a Gluten-free Diet Versus a Hypocaloric Diet Among Patients With Fibromyalgia Experiencing Gluten Sensitivity-like Symptoms: A Pilot, Open-Label Randomized Clinical Trial. *J Clin Gastroenterol*. 2016.
40. Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002;357(1418):133-42.
41. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*. 2007;24(2):115-9.

42. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013;62(1):43-52.
43. Caio G, Riegler G, Patturelli M, Facchiano A, L DEM, Sapone A. Pathophysiology of non-celiac gluten sensitivity: where are we now in 2016? *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2016.
44. Fasano A, Sapone A, Zevallos V, Schuppan D. Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1195-204.
45. Hill ID, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg E, Levy J, Reilly N, et al. NASPGHAN Clinical Report on the Diagnosis and Treatment of Gluten-related Disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;63(1):156-65.
46. Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, Card TR, Ciacci C, Ciclitira PJ, et al. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut*. 2014;63(8):1210-28.
47. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):656-76; quiz 77.
48. Nikulina M, Habich C, Flohe SB, Scott FW, Kolb H. Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *J Immunol*. 2004;173(3):1925-33.
49. Cianferoni A. Wheat allergy: diagnosis and management. *J Asthma Allergy*. 2016;9:13-25.
50. Catassi C, Elli L, Bonaz B, Bouma G, Carroccio A, Castillejo G, et al. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients*. 2015;7(6):4966-77.
51. Volta U, Tovoli F, Cicola R, Parisi C, Fabbri A, Piscaglia M, et al. Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance). *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(8):680-5.
52. Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology*. 2013;145(2):320-8.e1-3.
53. Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 2092012. p. 2395-408.
54. Barrett JS. Extending our knowledge of fermentable, short-chain carbohydrates for managing gastrointestinal symptoms. *Nutr Clin Pract*. 2013;28(3):300-6.
55. Magge S, Lembo A. Low-FODMAP Diet for Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2012;8(11):739-45.

56. Hollon J, Puppa EL, Greenwald B, Goldberg E, Guerrerio A, Fasano A. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients*. 2015;7(3):1565-76.
57. Molina-Infante J, Carroccio A. Suspected Nonceliac Gluten Sensitivity Confirmed in Few Patients After Gluten Challenge in Double-Blind, Placebo-Controlled Trials. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016.
58. Vici G, Belli L, Biondi M, Polzonetti V. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin Nutr*. 2016.
59. Saturni L, Ferretti G, Bacchetti T. The gluten-free diet: safety and nutritional quality. *Nutrients*. 2010;2(1):16-34.
60. Penagini F, Dilillo D, Meneghin F, Mameli C, Fabiano V, Zuccotti GV. Gluten-Free Diet in Children: An Approach to a Nutritionally Adequate and Balanced Diet. *Nutrients*. 2013. p. 4553-65.
61. Wallström P, Sonestedt E, Hlebowicz J, Ericson U, Drake I, Persson M, et al. Dietary Fiber and Saturated Fat Intake Associations with Cardiovascular Disease Differ by Sex in the Malmö Diet and Cancer Cohort: A Prospective Study. *PLoS One*. 72012.
62. Pires CV, Viçosa UFD, Oliveira MGdA, Universidade Federal de Viçosa V, Rosa JC, USP-Ribeirão Preto RP, et al. Nutritional quality and chemical score of amino acids from different protein sources. *Food Sci Technol (Campinas)*. 2006;26(1):179-87.
63. Marques AP, USP, Santos AMB, USP, Assumpção A, USP, et al. Validation of the brazilian version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ). *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(1):24-31.
64. Fisberg RM, Universidade de São Paulo SP, Brasil, Marchioni DML, Universidade de São Paulo SP, Brasil, Colucci ACA, Universidade Presbiteriana Mackenzie B. Assessment of food consumption and nutrient intake in clinical practice. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(5):617-24.
65. Heymsfield SB, Tighe A, Wang ZM. Nutritional assessment by anthropometric and biochemical methods. *Modern nutrition in health and disease*. 2nd edition. Philadelphia: Lea e Febiger; 1994.812p.
66. Salazar Quero JC, Espin Jaime B, Rodriguez Martinez A, Arguelles Martin F, Garcia Jimenez R, Rubio Murillo M, et al. [Nutritional assessment of gluten-free diet. Is gluten-free diet deficient in some nutrient?]. *An Pediatr (Barc)*. 2015;83(1):33-9.
67. Bonder MJ, Tigchelaar EF, Cai X, Trynka G, Cenit MC, Hrdlickova B, et al. The influence of a short-term gluten-free diet on the human gut microbiome. *Genome Med*. 2016;8(1):45.

68. Senna MK, Sallam RA, Ashour HS, Elarman M. Effect of weight reduction on the quality of life in obese patients with fibromyalgia syndrome: a randomized controlled trial. *Clin Rheumatol*. 2012;31(11):1591-7.
69. Freire RH, Fernandes LR, Silva RB, Coelho BS, de Araujo LP, Ribeiro LS, et al. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(3):479-86.
70. Soares FL, de Oliveira Matoso R, Teixeira LG, Menezes Z, Pereira SS, Alves AC, et al. Gluten-free diet reduces adiposity, inflammation and insulin resistance associated with the induction of PPAR-alpha and PPAR-gamma expression. *J Nutr Biochem*. 2013;24(6):1105-11.
71. Vieira EL, de Oliveira GN, Lessa JM, Goncalves AP, Sander JW, Cendes F, et al. Interleukin-1beta plasma levels are associated with depression in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2015;53:131-4.
72. Ranzolin A, Duarte AL, Bredemeier M, da Costa Neto CA, Ascoli BM, Wollenhaupt-Aguiar B, et al. Evaluation of cytokines, oxidative stress markers and brain-derived neurotrophic factor in patients with fibromyalgia - A controlled cross-sectional study. *Cytokine*. 2016;84:25-8.
73. Pimentel M, Wallace D, Hallegua D, Chow E, Kong Y, Park S, et al. A link between irritable bowel syndrome and fibromyalgia may be related to findings on lactulose breath testing. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(4):450-2.
74. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. <http://dxdoiorg/101080/2168837020161251384>. 2016.
75. Zanini B, Basche R, Ferraresi A, Ricci C, Lanzarotto F, Marullo M, et al. Randomised clinical study: gluten challenge induces symptom recurrence in only a minority of patients who meet clinical criteria for non-coeliac gluten sensitivity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42(8):968-76.
76. Elli L, Tomba C, Branchi F, Roncoroni L, Lombardo V, Bardella MT, et al. Evidence for the Presence of Non-Celiac Gluten Sensitivity in Patients with Functional Gastrointestinal Symptoms: Results from a Multicenter Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Gluten Challenge. *Nutrients*. 2016;8(2):84.