

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

**NÁDIA REGINA JARDIM DA SILVA**

**EFEITO DA MELATONINA E DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR  
CORRENTE CONTINUA NA METAPLASTICIDADE E LIMIAR DE DOR: ENSAIO  
CLÍNICO, RANDOMIZADO, *CROSSOVER* EM SUJEITOS SAUDÁVEIS**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

**NÁDIA REGINA JARDIM DA SILVA**

**EFEITO DA MELATONINA E DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR  
CORRENTE CONTINUA NA METAPLASTICIDADE E LIMIAR DE DOR: ENSAIO  
CLÍNICO, RANDOMIZADO, *CROSSOVER* EM SUJEITOS SAUDÁVEIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação  
em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Wolnei Caumo

Porto Alegre, junho de 2014.

#### CIP - Catalogação na Publicação

Jardim da Silva, Nádia Regina  
Efeito da melatonina e da estimulação  
transcraniana de corrente contínua na  
metaplasticidade e limiar de dor: ensaio clínico,  
randomizado, crossover em sujeitos saudáveis / Nádia  
Regina Jardim da Silva. -- 2014.  
139 f.

Orientador: Wolnei Caumo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Melatonina. 2. Estimulação transcraniana por  
corrente contínua (tDCS). 3. Estimulação magnética  
transcraniana (TMS). 4. Limiar de dor. 5. BDNF. I.  
Caumo, Wolnei, orient. II. Título.

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

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Felicidade Jardim**, minha grande inspiração na vida, ensinou-me tudo, a andar, a falar, a ter fé, caráter, força de vontade, a maneira de olhar o mundo com coragem, aliada a doçura, a beneficência, o entendimento do ser humano com suas virtudes e com seus defeitos, a importância do estudo e do trabalho, e o principal: “- *Que a vida é muito curta para sermos infelizes.*” Não é à toa que sou “literalmente” filha da Felicidade.

Meu pai, **Nivaldo**, parceiro em tantas brincadeiras da infância e presença “silenciosa” na vida adulta.

À minhas irmãs, **Nadiege, Nadilene, Nadilce** pela companhia, alegria, força e apoio em todos os momentos, e com quem sabemos podemos contar sempre, uma com as outras. Meus irmãos, **Nivaldo Junior e Nelson**, parceiros e amigos, para todos os momentos desta caminhada.

Ao meu companheiro e parceiro, **Marcos Portella**, presente na minha vida com sua disposição, coragem e alegria para conduzir os erros e acertos de uma dupla formada com o objetivo de tornar o caminho do envelhecimento menos difícil.

Em especial, a meu filho **Jorge Miguel**, a descoberta do amor materno incondicional, a vida transbordando de amor. Torcendo que um dia ele diga: “- *Sou filho da Nádia e neto da Felicidade.*”.

Aos meus sobrinhos, **Sarah, Rafael, Netinho** e minha afilhada **Jeanne**, alegrias, dinamismo e novidades no caminho. À Ninon, Andréia e Humberto pela magnífica experiência.

À minha madrinha **Dulce**, aos meus irmãos de coração, de tantas brincadeiras e alegrias, **Roberto, Gonzaga, André**.

À minha tia **Rosa** e prima **Irene**, pela presença constante, mas principalmente nas horas mais difíceis.

Aos meus tios **Maria e Enéas**, na simplicidade, o exemplo da luta pela vida.

À tia **Jandira**, superação nas adversidades.

À minha irmã de coração, **Síglia**, gargalhadas pela vida.

In memoriam, aos meus avós, **Maria Hermenegilda e Plínio, Josefa, João e Teobaldo, Maria Machado e Abelardo**, a tia **Aurora**, e a minha amada madrinha, **Darcy**.

E a todos da minha família, que torcem por mais esta conquista.

Dedico a eles, a incoerência da ausência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a vida e a família na qual me proporcionou nascer numa relação divina.

Ao **Prof. Dr. Wolnei Caumo**, meu orientador, pela escolha, pelo apoio, experiência, coragem e amizade, construídos desde o primeiro contato. Demonstrando paixão que motiva e muita paciência, frutos da sua experiência como educador e médico na ajuda de seus pacientes a superarem a dor, e nas diversas formas de apresentação do sofrimento humano como o paternal apoio aos seus alunos, amparando-os nas suas ansiedades e angústias, minha admiração, respeito e meu eterno: - *Muito obrigada*.

À **Profa. Dra. Iraci Torres**, com a sua acolhida e preocupações maternais, e apresentação de um novo olhar e ferramentas para o aprendizado.

Ao **Prof. Dr. Felipe Fregni**, uma honra tê-lo como um dos mestres.

À Doutoranda **Alicia Deitos** pela assistência, ensino, ajuda, contribuição, cooperação e apoio em todas as etapas desse trabalho. Minha admiração e minha eterna amizade.

À **PhD. Gabriela Laste**, pelo suporte, ensino e compreensão no percurso deste trabalho.

Ao **PhD. Rafael Vercelino**, pela colaboração e apoio na realização do trabalho.

Ao colega **Jairo Sarria**, que sempre ofereceu uma acolhida fraternal no contexto do estudo; no seu olhar a inocência e o vigor do começo da árdua caminhada no exercício da medicina, recordando meu passado, também cheio de sonhos e esperanças. No final de mais essa etapa, reforço que todas as dificuldades só fortaleceram ainda mais esta escolha.

À **Profa. Dra. Luciana Stefani** pelo apoio no transcorrer desta etapa.

Aos professores da Pós-Graduação de Ciências Médicas: **Luciana Nunes, Edison Capp, José Roberto Goldim, Alexandre Zavascki, Márcia Graudenz, Ricardo Reis**: - Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Ronaldo**, sempre a nos receber com palavras de força e ânimo para superarmos as dificuldades, nos lembrando de sua estada em Belém das nossas mangueiras e da nossa chuva.

Aos amigos que socorreram os meus na minha ausência: **Dr.Reinaldo Maia, Dra. Mariângela Marques, Dra.Regina Mendonça**. Serei eternamente grata.

Aos colegas do grupo de Dor e Neuromodulação: **Vinicius, André, Gustavo, Fernando, Leonardo, Alexandre** pela acolhida e apoio na realização do trabalho.

Às colegas do grupo de Dor e Neuromodulação: **Dra. Graça, Dra. Simone Zanette, Cristini Klein, Fabiana, Adriana**, as alunas: **Luciana, Vitória** e a **Cintya Ogliari** pela acolhida e apoio na realização do trabalho.

Aos colegas do Grupo de Dor e Neuromodulação: Modelos Animais - **Carla Oliveira, Paulo Ricardo Filho, Jonnsin Kuo, Isabel** pela acolhida e apoio na realização do trabalho.

À **PhD Liciane Medeiros**, apoio, orientação, amizade, disponibilidade em ajudar, um anjo no meu caminho.

À Doutoranda **Aline Brietzke**, disposição em ajudar e diminuir os obstáculos do trabalho.

À **PhD Andressa Souza**, apoio, amizade e ensino.

A todos que me deram uma palavra de alento, de força, estímulo, que manifestaram preocupações com o frio, com a distância, das mães (e pais) que se colocaram solidárias (os) pela distância de um filho.

A todas as colaboradoras das clínicas: Cardio Ritmo e Centro Cardiológico do Pará, em especial **Marivane, Rose e Adarlete**.

Às minhas colaboradoras, em especial, as que cuidam dos meus: **D. Jacinete e D. Betânia**.

Aos colegas que se tornaram amigos no decorrer do curso, em especial as que compartilharam angústias na etapa em Porto Alegre: **Maria de Nazaré Cunha**, empatia, força, alegria e fé; **Angely**, juventude e força na resolução de problemas; **Sônia**, parceria, aprendizado e pontos em comum; **Valéria**, sempre disponível em ajudar e cuidar.

À amiga **Maria Francisca** me refiro a uma associação materna: *“Nos menores frascos estão os melhores perfumes”*.

Ao colega **Priante**, alegria, confiança e espiritualidade, exemplo de dedicação e amor filial, minha admiração.

Ao colega **Arivaldo**, no reencontro a saudade de um caminho iniciado nos meus 17 anos de idade, lembrança da juventude.

Aos demais colegas **Edna, Alessandra, Rosilene, Jorge, Carmen**, na força de vontade a busca de objetivos.

À **Profa. Maria do Horto**, a docilidade maternal, um presente conhecê-la, infelizmente recebido na etapa final em Porto Alegre.

A Sra. **Vera Ribeiro**, mais que um apoio do PPGCM, palavras de conforto, força e certeza da vitória, sempre a nos impulsionar pra frente.

Ao serviço administrativo da pós-graduação, **Isis, Rodrigo e Lucas** e em especial ao **Johnathan**, ajudando e cooperando para que as etapas exigidas fossem cumpridas.

Ao corpo clínico do HCPA, que me receberam e ajudaram durante a coleta dos dados e realização da pesquisa.

Aos colegas da UNIMED urgente, que torcem pelo meu regresso.

Aos **PhD. Dr. Eduardo Costa e Dr. José Augusto Gonçalves**, que foram meus incentivadores durante minha formação acadêmica e no interesse pela Cardiologia.

A todos os meus amigos que me encorajam sempre e torcem pelo meu retorno, em especial a **Dra. Ana Claudia e Dr Manoel Maneschy** e ao **Prof. Dr. Wesley Melo**.

À **Profa. Dra. Lúcia Sales**, pelo apoio na solução dos problemas no decorrer do curso.

À UFPa, ao **magnífico reitor Carlos Maneschy** por propiciar a cooperação com a UFRGS e ao Pró-reitor **João Cauby de Almeida Junior**, por favorecerem o desenvolvimento profissional, com objetivo de melhorar as reais condições de nossa região.

Ao Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, ao **Dr. Paulo Amorim, Renato Silva**, e a **Dra. Roselis Gonçalves** pelo apoio nesta etapa de formação profissional.

Ao Serviço de Perícia Médica da UFPa, ao **Dr. Francisco Jadir de Sousa Campos** e a Diretora de Saúde e qualidade de vida, **Maria Josefa Quadros** pelo apoio na formação profissional.

À UFRGS, por favorecer o crescimento intelectual e humano.

Aos voluntários que participaram da pesquisa, meu muito obrigado.

A todos que direta e indiretamente me ajudaram e torceram pela realização e finalização deste trabalho divido o meu esforço e a minha coragem.

“Não chores, meu filho;

Não chores, que a vida

É luta renhida:

Viver é lutar.

A vida é combate,

Que os fracos abate,

Que os fortes, os bravos

Só pode exaltar.”

Antônio Gonçalves Dias

(Minha mãe sempre nos encoraja com este trecho da Canção do Tamoio)

“A dor é inseparável da vida.”

Sófocles

“Conhece-te a ti mesmo”.

Sócrates



## RESUMO

**Introdução:** A neuroplasticidade é um processo dinâmico e contínuo. Estruturas cerebrais e vias neurais participam de maneira conexa e intrincada no processo nociceptivo e nos seus mecanismos neuromodulatórios, tanto na sinalização quanto no desencadeamento de modificações anátomo-funcionais. Com o advento de técnicas de estimulação transcraniana não invasiva, como a estimulação transcraniana por corrente contínua (tDCS) que tem se revelado uma possibilidade terapêutica não farmacológica para o tratamento da dor, associada à melatonina, fármaco que tem demonstrado ação analgésica, o racional deste estudo é a pressuposição que o uso combinado dessas duas intervenções poderia ter efeito sinérgico ou aditivo no processamento nociceptivo. Foram avaliados parâmetros neurofisiológicos da excitabilidade cortical dados pela estimulação magnética transcraniana (TMS), pela dosagem do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e pelo teste de quantificação sensitiva (QST).

**Objetivos:** Com o intuito de compreender o processo neuroplástico do sistema nociceptivo o presente trabalho tem dois objetivos: 1) Determinar a relação entre os níveis séricos do BDNF e a resposta à dor aguda induzida experimentalmente, assim como avaliar os substratos neurais dessa relação por meio da estimulação magnética transcraniana (TMS) e da função do sistema modulador descendente durante o estímulo condicionado pela tarefa (CPM-TASK); 2) Avaliar o efeito da melatonina isolada ou combinada à tDCS no limiar de dor ao calor, no CPM-TASK, nos parâmetros de excitabilidade cortical e nos níveis de BDNF em sujeitos saudáveis.

**Pacientes e métodos:** Foram recrutados 20 sujeitos saudáveis masculinos, com idade entre 18 e 40 anos, em um ensaio clínico randomizado, crossover, placebo-controlado, cujo processo de randomização foi 2:2:1, favorendo os grupos de tratamentos ativos, divididos em 3 grupos:

melatonina+tDCS ativo (n=20); melatonina+tDCS-sham (n=20) e placebo+tDCS-sham (n=10). Realizado coleta de sangue, parâmetros de excitabilidade cortical com o limiar motor (LM), potencial evocado motor (MEP), facilitação intracortical (FIC), inibição intracortical (IIC), e teste de quantificação sensitiva (QST) e CPM-TASK mensurados por escala numérica (NPS<sub>(0-10)</sub>) durante o estímulo algogênico induzido pelo calor (HPT), em avaliações basais e após os tratamentos propostos. A estimulação com a tDCS anódica foi aplicada sobre o córtex motor primário (M1), durante 20 minutos, com corrente de 2 mA, em única sessão. A melatonina foi administrada por via sublingual na dose de 0,25 mg/kg (máximo de 20mg).

**Resultados:** Os resultados mostram que o limiar de dor ao calor (HPT) em graus Celsius (°C) está inversamente correlacionado com o BDNF sérico [Beta= -0.09, P=0.03], escores da NPS<sub>(0-10)</sub> durante CPM-TASK [Beta= -0.08, P=0.04] e a facilitação intracortical [Beta= -1.11, P=0.01]. Em relação ao ensaio clínico o efeito do tratamento determinou diferença significativa no limiar de dor ao calor, cuja diferença na média foi 4.86 [intervalo de confiança (IC), 95% (0.9 a 8.63)] quando comparado o grupo melatonina+tDCS ativo com o placebo+tDCS-sham. A diferença na média foi de 5.16 [(IC) 95% (0.84 a 8.36)] quando comparado o grupo melatonina+tDCS-Sham com o grupo placebo+tDCS-sham. A diferença na média entre os grupos melatonina+tDCS ativo com melatonina+tDCS-Sham foi 0.29 [(CI) 95% = -3.72 a 4.23]. A diferença na média entre os grupos melatonina+tDCS ativo *versus* placebo+tDCS-sham no MEP foi de -20,37[(CI) 95% (-39,68 a -1,2)]. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos demais parâmetros de excitabilidade cortical, no sistema modulador descendente (SMD) da dor avaliado pela CPM-TASK ou nos níveis séricos de BDNF.

**Conclusões:** Estes achados apoiam a hipótese de que o limiar de dor (HPT) está correlacionado de maneira inversa com o BDNF sérico e o nível de FIC, assim como a potência do sistema modulador descendente mostrou relação inversa com os níveis séricos de

BDNF. Também, no contexto de dor aguda experimental a tDCS associada à melatonina não exerceu efeito sinérgico ou aditivo no limiar de dor ao calor. O tratamento combinado não mudou a função do sistema modulador descendente, nem os níveis séricos de BDNF. Estes achados sugerem que a ação da melatonina não é mediada por fatores em níveis cortical ou medular, pelo fato de não mudar a excitabilidade cortical, nem a dor ao estímulo condicionado pela tarefa.

**Palavras-chave:** Melatonina, estimulação transcraniana por corrente contínua (tDCS), estimulação magnética transcraniana (TMS), limiar de dor, BDNF.

## ABSTRACT

**Background:** Pain-induced neuronal plasticity involves multiple molecular interactions. Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive method of brain stimulation has been used to address a variety pain conditions. Melatonin, new therapies pharmacological, used in different therapeutic as analgesic, anti-inflammatory and sedative effects. Interesting question is if their combination could result in additive or synergistic effect on cortical excitability measurements via transcranial stimulation parameters (TMS), pain threshold determined by quantitative sensory testing (QST) and BDNF serum levels.

**Objective:** 1) Determine the relationship between BDNF serum levels and acute experimental pain response, neural substrates of this relationship by assessing transcranial magnetic stimulation (TMS)-indexed cortical excitability and descending inhibitory response [Conditioned Pain Modulation, (CPM)] during CPM-TASK. 2) To test the effects combined intervention transcranial direct current stimulation (tDCS) and melatonin on pain was assessed by quantitative and sensory testing and the conditional pain modulation (CPM) during CPM-TASK, cortical excitability, as assessed by transcranial magnetic stimulation (TMS), and on serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) level.

**METHODS:** We enrolled 20 healthy males aged 18 to 40 years in a blinded, placebo-controlled, crossover, randomized clinical trial. They were divided into three groups: sublingual melatonin (0.25 mg/kg)+active-tDCS (n = 20), melatonin (0.25 mg/kg)+sham-tDCS (n = 20), or sublingual placebo+sham-tDCS (n = 10). One session of anodal stimulation (2 mA, 20 min) was applied over the primary motor cortex. Blood sample was collected and cortical excitability parameters were determined by TMS, followed by psychophysical pain testing and descending inhibitory response [Conditioned Pain Modulation, (CPM)] during CPM-TASK.

**Results:** Heat pain threshold (HPT) was inversely correlated with BDNF levels [Beta=-0.09, P=0.03] and Intracortical Facilitation (ICF) (Beta=-1.11, P=0.01) and the efficiency of the descending pain inhibitory system (as indexed by CPM, Beta=-1.11, P=0.04) was inversely correlated with BDNF levels. There was a significant difference in the heat pain threshold (°C) for melatonin+active-tDCS (mean difference: 4.86, 95% confidence interval [CI]: 0.9 to 8.63) and placebo+sham-tDCS (mean: 5.16, 95% CI: 0.84 to 8.36). There was no difference between melatonin+active-tDCS and melatonin+sham-tDCS (mean difference: 0.29, 95% CI: -3.72 to 4.23). Melatonin alone did not significantly affect cortical excitability, CPM task result, or serum BDNF level.

**Conclusions:** These findings support that serum neuroplasticity mediators have an association with the cortical excitability pattern and its response to acute experimental pain in healthy males, clinically supporting the existence of a role in the pain modulation process which is possibly involved in the descending pain inhibitory system. Also findings support the beneficial effects of melatonin on acute experimental pain; however, its association with active-tDCS did not increase its effectiveness. Melatonin's effects are likely not mediated by cortical or spinal centers given the lack of effects on cortical excitability and on the CPM task.

**Keywords:** tDCS, TMS; CPM; pain threshold; melatonin; clinical trial.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

**Table 1.** Clinical, psychophysical testing and cortical excitability characteristics of the healthy male sample. Data are presented as mean (SD) or frequency (percentage) (n=20).  
..... **Erro! Indicador não definido.**

**Table 2.** Multivariate regression analysis of cortical excitability, Brain-derived Neurotrophic Factor and Psychophysical pain tests (n=20). ..... **Erro! Indicador não definido.**

### ARTIGO 2

**Table 1.** Characteristics of the study sample. Values are given as the mean ( $\pm$ SD) or as a frequency according to the sequence cohort (n = 20).....112

**Table 2.** Primary outcomes. The mean delta score (SD) (post-treatment values minus pre-treatment values) of the heat pain thresholds and motor-evoked potentials (n = 20).....113

**Table 3.** Secondary outcomes related to cortical excitability (n = 20).....114

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Termos de busca usados nas bases de dados pesquisadas. ....	134
<b>Figura 2:</b> Termos de busca e cruzamento pas palavras-chave nas principais bases de dados .....	135
<b>Figura 3:</b> Resultado dos cruzamentos das palavras-chave nas bases de dados e que fundamentaram a segunda etapa desta tese .....	135
<b>Figura 4:</b> Disposição de contatos sinápticos no neurônio nociceptivo do corno posterior da medula espinhal (CPME). A fibra aferente de um nociceptor (fibras A $\delta$ mielínicas e C amielínicas) em um amplo terminal sináptico (acima, à direita).....	139
<b>Figura 5:</b> Esquema dos principais circuitos de mediação da dor.....	140
<b>Figura 6:</b> Figura 6: TMS 2002 (Modelo Magventure); Laboratório de Dor e Neuromodulação. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Prof. Dr.Wolnei Caumo.....	47
<b>Figura 7:</b> Voluntário TMS 2002 (Modelo Magventure); Laboratório de Dor e Neuromodulação. Hospital de Clínicas de PortoAlegre, Prof.Dr.Wolnei Caumo.....	48
<b>Figura 8:</b> Parâmetros da avaliação de excitabilidade cortical. ....	157
<b>Figura 9:</b> Marco conceitual construído a partir da base teórica que sustenta este estudo. ....	159

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

<b>Figure 1</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figure 2</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figure 3</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figure 4</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

NOME	SIGLA/ ABREVIATURA	NOME EM INGLÊS
Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico	AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Cloreto de Prata	AgCl	
Inventário de Depressão de Beck	BDI	Beck Depression Inventory
Fator neurotrófico derivado do cérebro	BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
Escala Brasileira de catastrofismo	B-PCS	Brazilian-Pain Catastrophizing Scale
	B-PCP:S	Screen for a Brazilian Population
Centímetros	cm	centimeter
Celsius	C	Celsius
Setor 1 do hipocampo ou “Corno de Amón”	CA-1	
Intervalo de confiança	CI	Confidence Interval
Catecol-O-metiltransferase	COMT	Catechol-O-methyltransferase
Sistema Nervoso Central	CNS	Central Nervous System
	CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
Modulação da dor condicionada	CPM	Conditioned Pain Modulation
Período silente cortical	CSP	Cortical Silent Period
Receptor Dopaminérgico tipo 2	D2	Dopaminergic receptor 2
Receptor Dopaminérgico tipo 3	D3	Dopaminergic receptor 3
	DNIC	Diffuse Noxious Inhibitory
Gânglio da raiz dorsal	DRG	Dorsal root ganglion
Escala Analógica Visual	EAV	
Eletromiografia	EMG	Electromyography



Estímulo Condicionado	EC	Conditioning Stimulus
Estímulo Teste	ET	Stimulation test
Primeiro Interósseo dorsal	FDI	First Dorsal Interosseus
Ácido Gama-aminobutírico	GABA	Gamma-AminoButyric Acid
Hospital de Clínicas de Porto Alegre	HCPA	
Hipotálamo-Pituitária-Adrenal	HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal
Limiar de dor ao calor	HPT	Heat Pain Threshold
Limiar de detecção do calor	HDT	Heat Detection Threshold
Facilitação Intracortical	ICF	Intracortical Facilitation
Inibição Intracortical	ICI	Intracortical Inhibition
Inventário de Ansiedade Traço – Estado	IDATE	
Intervalo Inter-Estímulos	IIEs	
Quilograma	Kg	Kilogram
Limiar Motor	LM	Motor Threshold
Depressão de longa duração	LTD	Long Term Depression
Potenciação de longa duração	LTP	Long Term Potentiation
miliAmpere	mA	miliAmpere
minuto	min	minute
miligramma	mg	milligram
miliLitro	mL	milliliter
Milisegundo	ms	milisecond
Melatonina	M	Melatonin
Córtex motor	M1	Motor cortex
Potencial evocado motor	MEP	Motor Evocate Potencial
Limiar motor	MT	Motor Threshold
N-metil-D-aspartato	NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
Escala de avaliação numérica	NRS	Numerical Rating Scale
picograma	pg	picogram
Teste de quantificação sensitiva	QST	Quantitative Sensory testing
Ensaio clínico randomizado	RCT	Randomized Controlled Trial
Rotações por minuto	rpm	revolutions per minute

Média	SD	mean
Sistema modulador descendente	SMD	
	STAI	State-Trait Anxiety Inventory
	STROBE	STrenghtening the reporting of Observational studies in Epidemiology
Inibição intracortical curta	SICI	Short Intracortical Inhibition
Substância P	SP	Substance P
Estimulação transcraniana por corrente contínua	tDCS	Transcranial Direct Current Stimulation
Estimulação magnética transcraniana	TMS	Transcranial magnetic stimulation
Escala analógica visual	VAS	Visual Analogue Scale
volt	V	Volt
Ampla faixa dinâmica	WDR	Wide Dynamic Range

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$f^2$	Effect size
$\mu$	micro
$\delta$	delta
$\theta$	teta
$\gamma$	gama

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>131</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>134</b>
<b>2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações .....</b>	<b>134</b>
<b>2.2 Sistema Nervoso .....</b>	<b>135</b>
<b>2.2.1. Neurobiologia do processo nociceptivo.....</b>	<b>136</b>
<b>2.2.2. Aspectos moleculares da neurotransmissão .....</b>	<b>141</b>
<b>2.2.3. Neuroplasticidade e sistema nociceptivo .....</b>	<b>144</b>
<b>2.2.4. Metaplasticidade e depotenciação.....</b>	<b>145</b>
<b>2.2.5. Estimulação cortical não invasiva.....</b>	<b>148</b>
<b>2.2.6. Efeito da melatonina no processo de sinalização .....</b>	<b>150</b>
<b>2.2.7. Avaliação dos processos de neuroplasticidade por meio de medidas neurofisiológicas e marcadores séricos.....</b>	<b>152</b>
<b>2.2.8. Marco conceitual do estudo .....</b>	<b>157</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>160</b>
<b>3.1. Objetivo principal .....</b>	<b>160</b>
<b>3.2. Objetivos secundários.....</b>	<b>160</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>160</b>
<b>5 ARTIGOS ORIGINAIS EM INGLÊS .....</b>	<b>175</b>
<b>5.1. ARTIGO 1 .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5.2. ARTIGO 2 .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>176</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS: .....</b>	<b>225</b>

<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>227</b>
<b>8.1. TCLE.....</b>	<b>227</b>
<b>8.2. QUESTIONÁRIOS E ESCALAS.....</b>	<b>230</b>
<b>8.2.1 IDATE .....</b>	<b>231</b>
<b>8.2.2 Escala de Pensamento Catastrófico sobre Dor .....</b>	<b>134</b>
<b>8.2.3 Questionário Efeitos Adversos - tDCS.....</b>	<b>135</b>
<b>8.2.4 Validação do Cegamento.....</b>	<b>136</b>
<b>8.2.5 Pittsburg - qualidade de sono .....</b>	<b>138</b>
<b>8.2.6 Contra-indicações ao TMS .....</b>	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As primeiras reflexões sobre a organização do corpo, da mente e suas relações surgem na civilização grega, com o objetivo de entender o sofrimento humano (1). O cérebro, como centro da razão e das sensações, foi sugerido inicialmente por Alcmeon de Crótona, entre 500 e 450 anos a.C., ideia que se fortaleceu com Hipócrates de Cós, estabelecendo-o como centro do intelecto, do entendimento e da emoção (2). Somente no século XX a neurociência proporcionou maior compreensão do sistema nervoso e introduziu conceitos de neuroplasticidade, propondo mecanismos neurobiológicos para processos fisiológicos e patológicos (3-5). A inquietação na busca de solução para o sofrimento humano colocou a dor no ponto central dessa questão (1, 2).

A dor pode ter finalidade adaptativa, como é o caso da dor aguda, ou ser uma manifestação de caráter mal-adaptativo, como é o caso da dor crônica (6). A avaliação da dor pode ser feita por meio de instrumentos unidimensionais que mensuram a intensidade, como é o caso da escala análogo-visual; aspectos afetivos motivacionais são analisados por instrumentos que apresentam essas dimensões em seu construto, como o Questionário de McGill, ou através de medidas psicofísicas, como o limiar de dor (7). No entanto, o que se observa é que tais mensurações sofrem a influência de múltiplos fatores, dentre os quais os hormonais, bioquímicos, humorais, neurobiológicos, cognitivos, comportamentais e psicológicos (8, 9). As diferenças na percepção da dor entre os gêneros podem expressar a interferência de diferentes fatores (10, 11).

A dor é, portanto, uma resposta que pode combinar aspectos sensorio discriminativos, cognitivos e avaliativos. A contribuição da sinalização nociceptiva e dos processos de neuroplasticidade, ainda que não mutuamente excludentes, induziram a definição de dor adotada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), que contempla os aspectos discriminativos ao associá-la ao dano tecidual, e os aspectos cognitivos e avaliativos ao integrarem o conceito de que se trata de uma experiência sensorial e emocional desagradável (12). A partir desses conceitos, é possível perceber que se trata de um fenômeno complexo de expressiva magnitude no que tange à multiplicidade de sistemas neurobiológicos implicados nessa resposta que induz sofrimento e excessivos custos ao sistema de saúde. Deve-se enfatizar que uma melhor

compreensão dos possíveis mecanismos implicados na resposta dolorosa é primordial para o avanço do processo terapêutico. Dentre os fatores envolvidos nos processos de neuroplasticidade o fator neurotrófico derivado do cérebro – BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) regula o crescimento e a sobrevivência neuronal, além de manter a conectividade sináptica. Essa neurotrofina também altera o balanço excitatório/inibitório do sistema nervoso central (SNC) e favorece a amplificação da resposta à dor (13-16).

Considerando a premissa de que a neuroplasticidade é um processo dinâmico, que envolve múltiplos sistemas ativados por diversos meios, o uso de terapêuticas combinadas parece ser uma estratégia promissora. Nesse cenário, o uso de estratégias terapêuticas não farmacológicas que modificam a excitabilidade endógena dos circuitos neuronais e de complexas redes neurais, incluindo o sistema modulatório corticodescendente, coloca em evidência técnicas como a estimulação transcraniana por corrente contínua (tDCS), que favorece modificações da excitabilidade cortical por modular o potencial de repouso da membrana axonal (17-19). Seus efeitos são polaridade dependente, desse modo, a estimulação anódica incrementa a excitabilidade por reduzir a inibição intracortical e melhorar a facilitação intracortical, e a estimulação catódica induz a hiperpolarização da membrana, por reduzir a facilitação intracortical e, adicionalmente, aumentar a inibição intracortical (20-25).

Os efeitos neuroplásticos duradouros e significativos induzidos pela tDCS são, em parte, mediados por receptores N-metil-D-aspartato (26). Hipotetiza-se que essas propriedades neuromodulatórias podem ser reforçadas ou diminuídas por intervenções farmacológicas (27). Dentre as opções disponíveis, o grupo de Dor e Neuromodulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) tem investigado o efeito da melatonina na modulação da dor. Seu efeito isolado foi demonstrado em modelos animais de inflamação (28) e de dor neuropática (29), assim como em estudos clínicos na dor aguda (30, 31) e na crônica (32-35). Além disso, estudos demonstram que a melatonina aumenta o limiar de dor em indivíduos saudáveis (36), melhora a qualidade do sono (37) e modula os sistemas envolvidos na dor, como os sistemas GABAérgicos e opioidérgicos (29, 38) restaurando o sistema modulador descendente da dor (39). Uma das formas de avaliar esse sistema é a modulação condicionada da dor – CPM (*Conditioned Pain Modulation*) (40) cuja resposta é regulada por neurotransmissores como noradrenalina, serotonina (5-HT) e dopamina (41-44). Em

estudos pré-clínicos, tem sido demonstrado que a CPM depende do recrutamento de opioides endógenos na substância periaquedutal, que ativam a liberação de 5-HT pelos neurônios do núcleo da rafe e, conseqüentemente, atenuam a aferência nociceptiva para o corno posterior da medula espinhal (45), assim como projeções noradrenérgicas do *locus ceruleus* produzem efeitos similares (45).

Nesse cenário, em que se mostram, de um lado, os mecanismos fisiopatológicos e, de outro, a resposta às diferentes abordagens terapêuticas, baseia-se a hipótese de que a tDCS combinado à melatonina poderia apresentar um efeito sinérgico ou aditivo em comparação com cada intervenção isolada. Para compreender os possíveis mecanismos de neuroplasticidade envolvidos nessa resposta do sistema nociceptivo, o presente estudo objetivou avaliar mediadores de neuroplasticidade como o BDNF e o potencial aditivo ou sinérgico da melatonina à tDCS no limiar nociceptivo. As respostas a tais questões originaram os dois artigos que constituem esta tese. A estrutura da apresentação segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

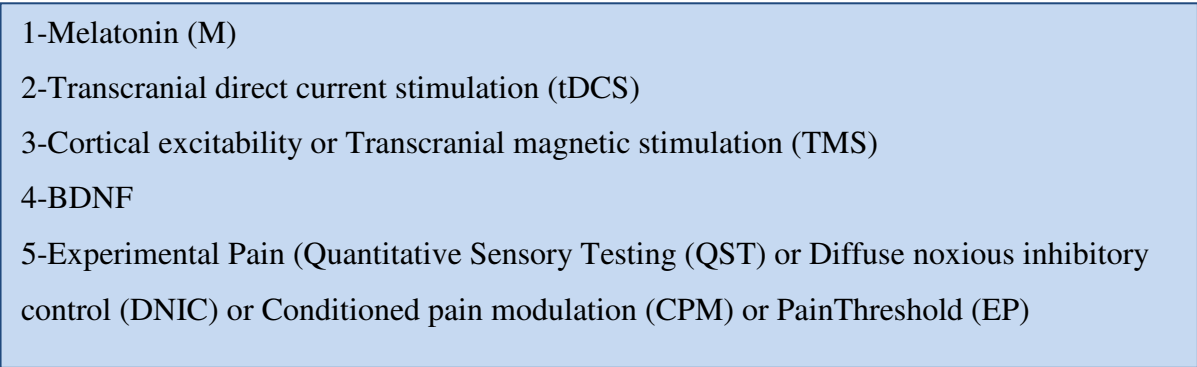
### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Na revisão da literatura, ressaltaremos os principais aspectos relacionados à dor, neuroplasticidade, estimulação cortical não invasiva, estimulação elétrica transcraniana por corrente contínua (tDCS), excitabilidade cortical (avaliada por estimulação magnética transcraniana), melatonina, BDNF, Teste sensitivo quantitativo – QST (*Quantitative Sensory Testing*) e modulação condicionada da dor – CPM (*Conditioned pain modulation*).

A estratégia de busca envolveu as bases de dados MEDLINE (PubMed - Mesh), LILACS (BIREME) e ScIELO de 1990 a 2014. As referências selecionadas serviram de base para localizar outros estudos não contemplados nessa busca. Foram utilizados o banco de tese da CAPES, livros-texto e monografias buscando identificar materiais relevantes.

Foram usados os seguintes termos de busca: *melatonin, transcranial direct current stimulation (tDCS), transcranial magnetic stimulation (TMS) OR cortical excitability, BDNF, Experimental Pain, Quantitative Sensory Testing (QST) and diffuse noxious inhibitory control (DNIC) OR conditioned pain modulation (CPM) OR pain threshold.*

A busca dos artigos está demonstrada na sequência abaixo, conforme figura 1.

- 
- 1-Melatonin (M)
  - 2-Transcranial direct current stimulation (tDCS)
  - 3-Cortical excitability or Transcranial magnetic stimulation (TMS)
  - 4-BDNF
  - 5-Experimental Pain (Quantitative Sensory Testing (QST) or Diffuse noxious inhibitory control (DNIC) or Conditioned pain modulation (CPM) or PainThreshold (EP)

**Figura 1:** Termos de busca usados nas bases de dados pesquisadas.

O cruzamento das palavras-chave, caracterizadas por números, está demonstrado na figura 2.

PUBMED	LILACS	SCIELO
1)M= 969	1)M= 170	1)M= 101
2)tDCS= 243	2)tDCS= 296	2)tDCS= 9
3)TMS=1746	3)TMS=1451	3)TMS=78
4)BDNF=232	4)BDNF=689	4)BDNF=24
5)EP= 2492	5)EP= 26	5)EP= 15
1+ 2= 2	1+ 2= 2	1+ 2= zero
1+ 3= 1116	1+ 3= 14	1+ 3= zero
1+ 4= 15	1+ 4= 6	1+ 4= 1
1+ 5=535	1+ 5=zero	1+ 5=zero

**Figura 2:** Termos de busca e cruzamento pas palavras-chave nas principais bases de dados.

Do resultado das buscas, dos 50 artigos pesquisados, 22 artigos se relacionavam especificamente com o tema abordado, no primeiro artigo.

- 1º artigo

$$1+ 3+ 4+ 5= 50$$

$$\text{Total}= 22$$

- 2º artigo:

Todos os 9 artigos foram utilizados.

$$1+ 2+ 4+ 5= 9$$

Figura 3: Resultado dos cruzamentos das palavras-chave nas bases de dados e que fundamentaram a segunda etapa desta tese

## 2.2 Sistema Nervoso

A compreensão dos processos neurofisiológicos *in vivo* é um passo importante para a evolução dos conceitos da neurofisiologia aplicada, onde se pode investigar a capacidade do sistema nervoso central de

suportar as necessidades do meio e sua permeabilidade à influência do ambiente e dos padrões de atividade funcional. A expressão “plasticidade dependente de atividade” mostra que a estrutura do sistema nervoso é, ao menos em parte, influenciada pelas demandas induzidas pelos padrões de atividade. Nesta revisão abordaremos os conceitos e bases neurobiológicas que possam permitir a compreensão dos sistemas neurobiológicos e os processos funcionais envolvidos na modulação da dor, no contexto experimental controlado, quando aplicada intervenção farmacológica com efeitos multifacetados, como a melatonina associada à tDCS. A apresentação será dividida nos seguintes subitens: neurobiologia do processo nociceptivo, neuroplasticidade e sistema nociceptivo, metaplasticidade e depotenciação, efeito da tDCS no sistema nociceptivo, efeito da melatonina no processo de sinalização e avaliação dos processos de neuroplasticidade por meio de medidas neurofisiológicas e marco conceitual, objetivos, considerações finais e perspectivas futuras.

### **2.2.1. Neurobiologia do processo nociceptivo**

A dor é um fenômeno multifatorial, que envolve fatores bioquímicos, humorais, neurobiológicos, cognitivos e psicológicos, daí ser uma experiência com grande variabilidade individual (8, 9).

No seu processamento normal, a percepção da dor envolve dois principais grupos de vias neurais: ascendente e descendente. Os nervos periféricos transmitem sinais sensoriais, incluindo sinais nociceptivos, para a medula espinhal, através da via nociceptiva ascendente, e para o cérebro, onde são processados. Sinais nociceptivos são emitidos quando receptores especializados dos nervos periféricos, os nociceptores, são ativados por estímulos danosos ou potencialmente prejudiciais, como temperatura, pressão ou tato (46). Nociceptores são classificados de acordo com a velocidade de condução de suas fibras: as fibras C são amielínicas, de pequeno diâmetro e apresentam velocidade de condução lenta, variando entre 0,5 a 2 ms, constituem mais da metade das fibras sensitivas nos nervos periféricos e são polimodais, pois respondem a estímulos térmicos, mecânicos, químicos. As fibras A são mielínicas, de grande e médio diâmetro, com

velocidades de 6 a 30 ms e são subdivididas em:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . As fibras A $\delta$  transportam, preferencialmente, estímulos mecânicos e térmicos (8, 9, 47).

Nesse processo, uma lesão evidente desencadeia a cascata de eventos nas vias da dor, cujos estímulos são captados por nociceptores, e a informação, pelo processo de transdução, gera um potencial de ação de membrana que é conduzido aos neurônios de primeira ordem situados no gânglio da raiz dorsal, em sequência aos neurônios de segunda ordem localizados no corno posterior da medula espinhal, posteriormente segue aos neurônios de terceira ordem localizados no tálamo (13), e aos de quarta ordem localizados no córtex (6, 48, 49).

No corno posterior da medula espinhal, a informação nociceptiva proveniente das fibras A $\delta$  e C estimula neurônios de segunda ordem localizados nas lâminas I, II, V e VI. Dentre esses neurônios estão os de ampla faixa dinâmica (WDR), que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, e os neurônios nociceptivos específicos. Os WDR respondem a estímulos dolorosos (fibras A $\delta$  e C) e não dolorosos (A $\beta$ ), exercendo um papel fundamental nos mecanismos inibitórios de supressão da dor (50). Ao contrário dos WDR, os neurônios nociceptivos específicos são predominantemente ativados por estímulos dolorosos provenientes das fibras A $\delta$  e C (51). Esses neurônios do corno posterior da medula espinhal além de receberem estímulos excitatórios dos nociceptores, são influenciados por sinapses inibitórias e por células microgliais (13, 52, 53).

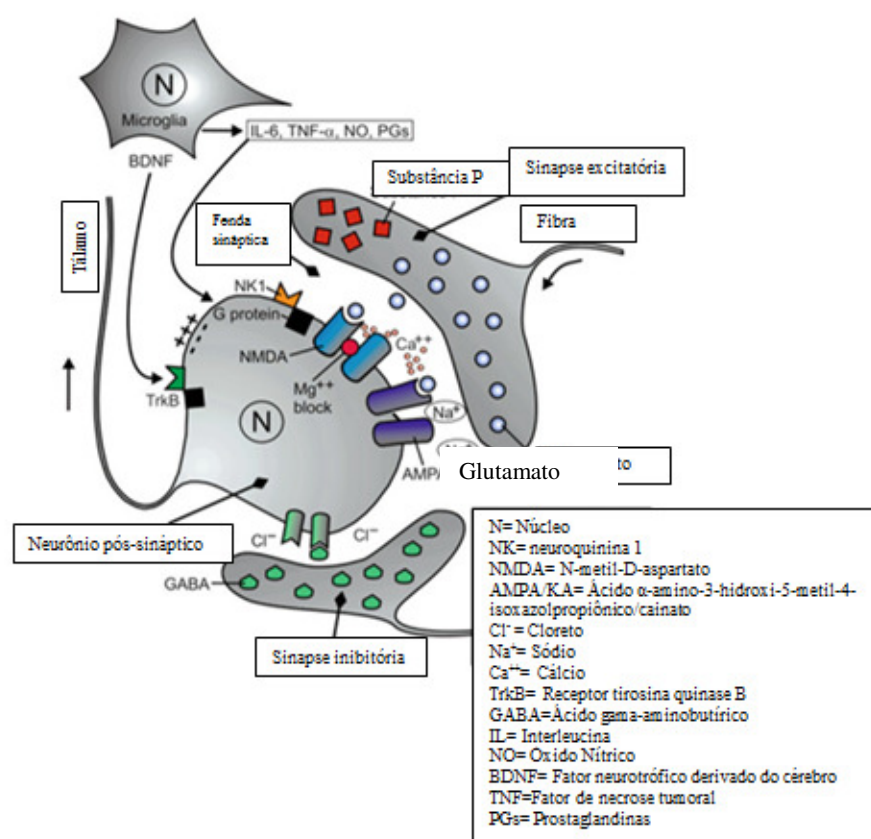
A sinapse nociceptiva do corno posterior da medula espinhal tem basicamente dois diferentes caminhos de funcionamento:

- 1 - Quando uma descarga de curta duração ou baixa frequência chega ao terminal pré-sináptico, apenas o glutamato é liberado. Na ausência de substância P, o glutamato abre os canais para AMPA ( *$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) e cainato. Isto resulta em uma despolarização da membrana do neurônio pós-sináptico, devido ao influxo de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) para o interior da célula. Subsequentemente à cessação do estímulo, o neurônio volta a seu estado prévio de excitabilidade. Nesse processo de ativação normal, canais NMDA (N-metil-D-aspartato) permanecem fechados, bloqueados por íons magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (54, 55). A maioria das sinapses AMPA com a superfície do neurônio central são

inefetivas ou chamadas silentes. Um nervo pode ter muitas sinapses silentes com neurônios de segmentos adjacentes. Uma situação patológica pode tornar essas sinapses ativas, levando à formação de novas conexões do neurônio com a periferia, mecanismo que parece ser fundamental no processo de sensibilização central (56).

2 - Quando um estímulo prolongado ou de alta frequência adentra a terminação pré-sináptica nociceptiva, glutamato e substância P são liberados conjuntamente. Ao ligar-se ao receptor metabotrópico proteína-G (trifosfato de guanosina – GTP) acoplado à neurocinina 1, a substância P ativa uma cascata intracelular, levando à formação de quinases e a despolarização de longa duração dos neurônios do corno posterior da medula espinhal. Simultaneamente, há o acúmulo intracelular de  $\text{Na}^+$  com despolarização da membrana, influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para o interior da célula com deslocamento do magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e abertura do canal NMDA. Se esses eventos se prolongam, levam à sensibilização dos neurônios pós-sinápticos (54, 55).

Na figura 4, mostra-se a sinapse no corno posterior da medula espinhal em resposta ao estímulo nociceptor, possuem propriedades moleculares e biofísicas que permitem identificar estímulos potencialmente danosos (47).

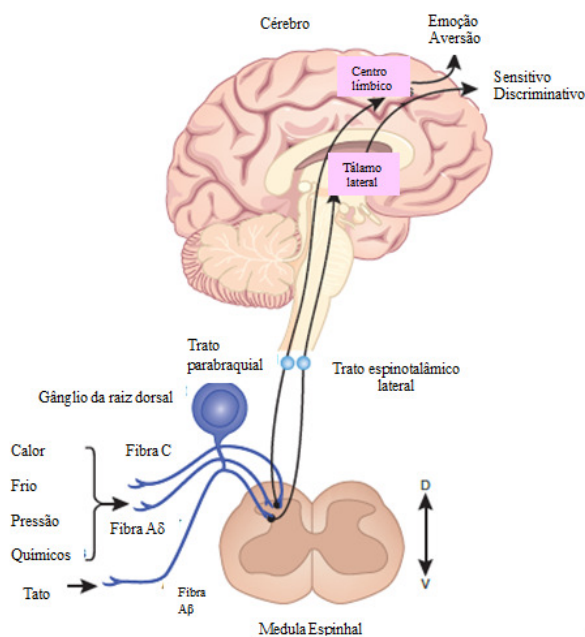


**Figura 4:** Disposição de contatos sinápticos no neurônio nociceptivo do corno posterior da medula espinhal (CPME). A fibra aferente de um nociceptor (fibras A  $\delta$  miélnicas e C amielínicas) em um amplo terminal sináptico (acima, à direita). Figura adaptada de Mense e Gerwin (52).

Ainda no corno posterior da medula espinhal, os axônios desses neurônios decussam para o outro lado e transmitem o estímulo nociceptivo pelos tratos espinotalâmico e espinoreticular para o tronco cerebral e tálamo, e então para o córtex somatossensorial primário e secundário, a ínsula e o córtex cingulado anterior (57). Neurônios talâmicos distribuem a informação nociceptiva para o córtex somatossensorial primário, onde o aspecto sensório-discriminativo da dor é processado, e para o córtex somatossensorial secundário, que parece ter um importante papel no reconhecimento, aprendizado e memória de eventos dolorosos. A ínsula tem sido proposta como envolvida nas reações autonômicas ao estímulo doloroso e aspectos afetivos da memória e aprendizado relacionados à dor. O córtex cingulado anterior está intimamente relacionado ao desprazer da dor e do afeto, da cognição e da seleção de resposta (58).

Os diferentes tipos de receptores e fibras aferentes estão associados a vias centrais distintas e a estruturas neurais de integração (59). Esses achados provavelmente refletem as diferentes funções biológicas

de cada tipo de dor, em que a primeira sinaliza o dano e provê precisa informação sensorial para uma imediata retirada, por estar associada à ativação do córtex somatossensorial primário, enquanto a segunda está intimamente relacionada à ativação do córtex cingulado anterior é mais duradoura, motiva respostas comportamentais para limitar mais a lesão e favorecer a recuperação (60), como mostra a figura 5.



**Figura 5:** Esquema dos principais circuitos de mediação da dor.

Figura adaptada de Kuner (49).

A sinalização nociceptiva é processada em várias estações ao longo do neuro-eixo, e a percepção da dor acontece quando ocorre a corticalização (53). No córtex cerebral, a substância cinzenta, inclui os corpos celulares dos neurônios, dispostos em camadas ou lâminas, os quais se integram e se conectam com outras áreas e estruturas subcorticais, formando uma verdadeira rede, com disposição hierárquica dentro e entre os sistemas (61, 62). O arranjo altamente ordenado dos neurônios corticais e suas conexões permitem a qualidade e a organização da informação através dos domínios corticais (63). Os neurônios no córtex cerebral se classificam, classicamente, em piramidais ou estrelados. Os piramidais ou de projeção são considerados excitatórios, pois ativam neurônios subsequentes, áreas corticais distantes e subcorticais, apresentam o glutamato como neurotransmissor e correspondem a 70% dos neurônios corticais (64). Esses neurônios fornecem o conceito de vias, como a ascendente, na qual os axônios se dirigem para áreas

superiores recebendo e transmitindo a informação; e a descendente, na qual os axônios se dirigem à medula, aos nervos cranianos e espinhais até aos órgãos ou estruturas periféricas, favorecendo a integração entre o periférico e o central (12, 49, 65).

Os neurônios estrelados, também chamados interneurônios ou neurônios de circuito local, apresentam sua arborização axonal restrita ao córtex (64). Podem ter função inibitória, pois diminuem a atividade dos neurônios subsequentes ao circuito de que fazem parte, utilizam o neurotransmissor GABA e representam 20 a 30% do total de neurônios corticais (64).

O neurônio, portanto, é uma célula excitável, capaz de produzir o chamado potencial de ação, que são impulsos elétricos que percorrem a superfície da membrana neuronal, meio pelo qual ocorre a comunicação entre os neurônios. A comunicação entre os neurônios ocorre através de um sítio especializado chamado sinapse, que pode ser elétrica ou química. As sinapses químicas representam a principal forma de modulação e amplificação da transmissão neuronal por envolver a liberação de substâncias denominadas neurotransmissores e/ou neuromoduladores na fenda sináptica.

Apesar da diversidade de fatores, a percepção da dor pode ser modulada e três importantes mecanismos são descritos: 1) a inibição segmentar refere-se à teoria do portão no controle da dor, na qual a transmissão pode ser diminuída ou bloqueada entre as fibras e o corno dorsal da medula espinhal; 2) ação do sistema opioide endógeno; 3) sistema inibitório descendente, definido como áreas do cérebro, principalmente a região cinzenta periaquedutal, que podem controlar informações nociceptivas ascendentes (9).

Conceitos como sensibilização periférica, que se relaciona a alterações na altura das terminações aferentes nociceptivas, e central, com modificações na resposta neuronal no SNC, contribuem para o adequado funcionamento do sistema nociceptivo (1, 6).

### **2.2.2. Aspectos moleculares da neurotransmissão**



A atividade dos neurotransmissores ou moduladores não depende exclusivamente de sua natureza química, mas também das características do receptor a que se ligam, gerando excitação, quando o acoplamento favorecer a despolarização ou a inibição, se propiciar a hiperpolarização da membrana neuronal (66). Existem dois tipos de receptores, os que comportam canais iônicos em sua estrutura, chamados ionotrópicos, e conduzem respostas rápidas, e os acoplados à proteína G (guanosina ciclase ou proteína quinase), isto é, os metabotrópicos, que favorecem ações mais lentas ou prolongadas, pois agem através do segundo mensageiro. Os principais neurotransmissores envolvidos no processamento da sinalização nociceptiva são o ácido gama-aminobutírico (GABA), a glicina, o NMDA (N-metil-D-aspartato) e as aminas.

O GABA é o principal aminoácido inibitório no cérebro por favorecer a hiperpolarização da membrana (67). A síntese de GABA é mediada pela descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), que catalisa a descarboxilação do ácido glutâmico e do glutamato em GABA nas terminações nervosas gabaérgicas, que apresentam sistema de recaptção ativa, depois da liberação na fenda sináptica (66-68). As ações derivam de seu acoplamento a receptores GABA A, ionotrópicos, com localização pós-sináptica, cuja ativação permite rápido influxo de cloreto para o interior do neurônio, promovendo a hiperpolarização e GABA B, receptor metabotrópico com distribuição pré e pós-sináptica (66). Os neurônios gabaérgicos e seus receptores são abundantes e difusamente presentes no encéfalo e na medula espinhal; constituem 25-30% da população neuronal no córtex motor (63, 67-69). São responsáveis por produzir uma corrente inibitória basal, exercendo, portanto um papel regulador na atividade cerebral (68). A liberação de GABA pode produzir inibição na transmissão nociceptiva demonstrada pelo uso de fármacos que melhoram a função gabaérgica e atenuam o comportamento da dor neuropática e a hiperexcitabilidade neuronal (68, 70).

A glicina é um neurotransmissor com ação inibitória, presente no tronco cerebral e na medula espinhal. Apresenta dois receptores ionotrópicos: GLYT 1 e 2, presentes nas células gliais e nos terminais pré-sinápticos. É liberada em algumas áreas cerebrais com o GABA, podendo, no entanto, facilitar a neurotransmissão excitatória através dos receptores NMDA que possuem sítios de ligação para a glicina, atuando também como coagonista (71, 72).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, produz despolarização em neurônios pós-sinápticos por favorecer a inibição dos canais de potássio e induz ação inibitória pré-sináptica, bloqueando os canais de cálcio. Os receptores ionotrópicos são: NMDA (N-metil-D-aspartato) com as subunidades NR1 e NR2, AMPA (ácido-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e cainato. Os receptores NMDA e AMPA são mais abundantes no córtex, nos gânglios da base e nas vias sensoriais. Os receptores metabotrópicos (mGlu) e seus subtipos, principalmente os receptores do grupo III, tal como mGlu4 e mGlu6-8, estão localizados nos terminais nervosos, nos sítios pós-sinápticos e nas células da glia e podem influenciar e modular a ação do glutamato (73). Os receptores de glutamato, tanto gliais quanto neuronais colaboram nas ações adaptativas e fisiológicas, como na plasticidade sináptica e na potenciação de longo prazo (LTP) (11, 74). As vias glutamatérgicas desempenham um papel crítico na transmissão da nocicepção e têm sido associadas à dor de etiologia diversa, tanto aguda quanto crônica (11, 73). No entanto, podem desempenhar papéis opostos na nocicepção, dependendo do local de ativação e do processo fisiopatogênico da dor (75-77).

O aminoácido tirosina é o precursor comum de aminas que regulam funções em nível cerebral e periférico, tais como dopamina, norepinefrina, epinefrina, histamina e serotonina. A dopamina apresenta diversos receptores, D1 a D5, amplamente distribuídos no cérebro e na medula espinhal, participando da modulação descendente da dor (78). O precursor da serotonina é o triptofano, aminoácido da dieta que é ativamente captado pelos neurônios. Apresenta ação predominantemente inibitória. Possui diversos receptores, sendo os principais: 1, 2 e 3, distribuídos amplamente no cérebro e na medula espinhal (79, 80). A substância P atua como neurotransmissor excitatório ou como cotransmissor, geralmente associado à serotonina. O ATP (adenosina trifosfato) é liberado por neurônios pré-sinápticos e atua como cotransmissor em receptores ionotrópicos e metabotrópicos. A adenosina (produto da degradação do ATP) e o ATP são responsáveis pela transmissão purinérgica, que modula o processo de inibição da transmissão de informação nociceptiva no sistema periférico, em níveis medulares e supraespinhais.

O sistema opioide endógeno, constituído de encefalinas e beta-endorfinas, é necessário para a integridade biológica do sistema nervoso. Os receptores mu, kappa e delta, são amplamente distribuídos no

córtex cerebral, no tálamo, no hipotálamo, na substância cinzenta periaquedutal, nos núcleos da rafe e na medula espinhal. Estão interrelacionados com a neurotransmissão gabaérgica e dopaminérgica. Os canabinóides apresentam receptores CB1 que estão largamente distribuídos no SNC e são expressos pela proteína G.

A integração dessa rede de neurotransmissores e neuromoduladores, seus receptores de membrana celular ou nuclear, uma diversidade de canais e proteínas são fundamentais para a compreensão dos diferentes mecanismos moleculares de neuroplasticidade nas diferentes regiões cerebrais.

### **2.2.3. Neuroplasticidade e sistema nociceptivo**

Plasticidade neuronal refere-se à capacidade do neurônio para modificar sua estrutura ou funções em resposta às demandas e aos estímulos (4, 81, 82). Modificações que envolvem os mecanismos de reorganização neuronal e a complexa rede de transmissão, tais como reforço das conexões sinápticas existentes, recrutamento de novas ou silenciosas vias de transmissão, mudanças na arborização dendrítica, sinaptogênese e neurogênese, integram o que se define como neuroplasticidade (4, 81, 83).

Os neurônios usam o mecanismo de plasticidade de acordo com suas necessidades, e é provável que exista redundância em suas ações (83, 84). Há considerações de que isto se deva à propriedade intrínseca do sistema nervoso, com caráter celular e molecular (85). Sabe-se que as modificações na atividade neuronal podem fortalecer ou enfraquecer a transmissão sináptica (86), com reorganização dos seus circuitos (87), mudanças que estão relacionadas intimamente a dois fenômenos, potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longo prazo (LTD) (88). A LTP é definida como um aumento na força sináptica, mas não de maneira irreversível, e a LTD seria o enfraquecimento (81). A maneira de induzir LTP é a ativação dos receptores NMDA e o aumento do influxo de cálcio (81, 84), sendo que a interação com o receptor NMDA-LTP constitui a principal forma de plasticidade sináptica no cérebro (89). A LTP depende da ativação sináptica excitatória, que envolve o sistema glutamatérgico através de seus receptores NMDA e AMPA, processo que concorre com as modificações morfológicas nas espinhas dendríticas, o principal local das

sinapses glutamatérgicas no cérebro (87, 88, 90, 91). Estudos recentes mostram evidências de que sinapses gabaérgicas também estão envolvidas na plasticidade sináptica (21, 70, 87, 92, 93).

As neurotrofinas integram o processo de sinalização que induz LTP e LDP. São proteínas que regulam aspectos do desenvolvimento, manutenção e função neuronal, abrangendo a formação de sinapses e sua plasticidade (94). Os principais componentes são o fator de crescimento neuronal (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), NT-3, NT-4/5 (95), NT-6 e NT-7 (94, 96). O BDNF é a neurotrofina mais amplamente distribuída no SNC(97, 98). Age na regulação, no crescimento e na diferenciação neuronal, exercendo ações tanto no terminal pré-sináptico quanto no terminal pós-sináptico (13, 99, 100). Regula o equilíbrio entre a sobrevivência e a apoptose neuronal (94, 100, 101). Tem papel na transmissão das vias nociceptivas em nível espinhal e supraespinhal assim como na sensibilização central (16, 100-103). Tem sido demonstrado que o BDNF pode ser produzido também pelas células gliais (100). Uma vez liberado, o BDNF modula a neurotransmissão excitatória, ativando os receptores NMDA/glutamatérgicos e a neuromodulação inibitória através de uma ação GABAérgica/glicinérgica (13, 99, 104) provavelmente o BDNF regula o equilíbrio entre essas ações (16, 100). As evidências de que o BDNF esteja envolvido na regulação de mecanismos relacionados à plasticidade sináptica, devido à sua relação com o aumento da excitabilidade, porém o excessivo influxo de cálcio via receptor NMDA contribui para o dano neuronal (16, 90, 96, 100, 103, 105, 106).

#### **2.2.4. Metaplasticidade e depotenciação**

As formas mais conhecidas e mais intensamente estudadas de plasticidade permanecem sendo a potenciação de longa duração (LTP), a depressão de longa duração (LTD), a metaplasticidade e a plasticidade homeostática. Tem sido demonstrado que o pico de tempo-plasticidade dependente (*spike timing- STDP*) está vinculado ao aspecto temporal entre os estímulos, a quantidade, a intensidade e a localização do estímulo na rede sináptica (24, 90, 107-109). O fato de que múltiplas formas de LTP podem ocorrer simultaneamente no mesmo tipo de sinapse incrementa a utilidade funcional desses processos (89,

91). Sabe-se que o processo de plasticidade pode ocorrer em minutos, horas ou por períodos mais prolongados (110).

A metaplasticidade é um conceito importante de regulação, pois abrange as mudanças no tempo de atividade sináptica e/ou no estado neuronal, que modula a direção, a intensidade e a duração do comportamento das sinapses subsequentes. É um processo intrínseco. Pode ser classificada como heterossináptica e homossináptica. A heterossináptica envolve as transmissões das células neuronais, através dos dendritos com outras sinapses, englobando, possivelmente, até os astrócitos (107). A metaplasticidade, do tipo homossináptica é expressa nas alterações da própria atividade sináptica, ocorrendo de forma que receptores metabotrópicos (mGluRs) medeiam a facilitação e prolongam, na sequência posterior, o LTP, enquanto que a ativação dos receptores NMDA inibem a posterior LTP e facilitam a subsequente LTD (107).

A metaplasticidade, através da função espaço e tempo, serve para prolongar as interações entre os eventos neurais e assegurar a estabilidade da rede neuronal, portanto o termo metaplasticidade homeostática descreve o efeito neuroprotetor para estabilizar a força sináptica enquanto mantém a capacidade de plasticidade sináptica. De acordo com os princípios da metaplasticidade homeostática, a capacidade de memória que envolve as redes neurais é um fator limitante, por constituir um mecanismo celular protetivo para evitar a morte celular por sobrecarga (107).

Os mecanismos de metaplasticidade homeostática são baseados na teoria bidirecional das sinapses, ou seja, da pré e da pós-sinapse, estado em que o limiar sináptico é modificado, ou seja, o limiar para indução de LTP *versus* LTD não é estável e varia como uma função integrada da atividade pós-sináptica, que poderia ser expressa da seguinte maneira:

Se diminuir o limiar = LTP > LTD

Se aumentar o limiar = LTD > LTP

Desse modo, se houver redução nos níveis de atividade pós-sináptica, ocorrerá o favorecimento do LTP sobre LTD e, inversamente, se houver elevação dos níveis de atividade pós-sináptica ocorrerá favorecimento do LTD sobre LTP, portanto esse processo controla a excitabilidade fisiológica e a função da rede neuronal (107).

Pesquisas demonstram que a plasticidade, em ambos os circuitos de excitação e de inibição, no córtex motor humano é regulada por metaplasticidade homeostática, e que os efeitos sobre a inibição primária contribuem para a regulação homeostática em circuitos excitatórios, ou seja, a metaplasticidade homeostática de maneira geral ocorre tanto nos circuitos excitatórios corticoespinhais como nos circuitos neurais inibitórios intracorticais, e que a metaplasticidade nos circuitos excitatórios corticoespinhais pode ser explicada, pelo menos em parte, por modulação primária no controle inibitório desses circuitos (107, 111).

As alterações na excitabilidade dos circuitos GABAérgicos em estudos utilizando estimulação magnética transcraniana por explosão teta, intermitente ou contínua (iTBS e cTBS) correlacionaram-se com a intensidade e a direção da metaplasticidade homeostática na amplitude do MEP, sugerindo um papel da neurotransmissão GABAérgica para controlar a plasticidade dos circuitos corticoespinhais excitatórios, mais do que a depotenciação (70, 112).

Depotenciação representa um mecanismo homeostático que permite a inversão de reforço previamente induzido pela eficácia sináptica (LTP), a fim de eliminar informação redundante sináptica e, conseqüentemente, aumentar a capacidade de armazenamento ou facilitar a geração de novas informações. Primeiramente demonstrada nas células piramidais do setor 1 do hipocampo ou “Corno de Amón” (CA-1), experimentos com ratos que se movimentavam livremente, o LTP produzido pela alta frequência de estimulação (200 Hz) previamente mostrou-se invertido ou depotenciado quando os ratos exploravam um novo ambiente, portanto é uma resposta de adaptação na qual a exploração da novidade ou estresse restabelece as alterações induzidas anteriormente, possivelmente para facilitar a geração de novas informações através do LTP (112-115).

Igualmente demonstrada na amígdala, a depotenciação, é dependente da NMDA, da ativação de canais dependentes de  $Ca^{++}$  e da atividade de fosfatase. Quando foram utilizadas baixas frequências de estimulação com parâmetros semelhantes à depotenciação, houve atenuação a memória de medo (116). A perda da depotenciação corticoestriada tem sido associada à discinesia crônica em modelos animais e em humanos com parkinsonismo (81).

### **2.2.5. Estimulação cortical não invasiva**

O córtex cerebral é uma estrutura complexa composta por elementos excitáveis que variam em tamanho, localização, orientação e função. A estimulação cortical não invasiva (NICS) pode ser usada para avaliar, facilitar ou inibir as redes neuronais corticais (117-119). No entanto, a compreensão dessa ação nos processos fisiológicos do sistema nociceptivo ainda não está completamente esclarecida (117-119). Existem dois métodos principais de estimulação transcraniana não invasiva que têm sido utilizados no cenário clínico e experimental com impacto considerável sobre os desfechos, que são: a estimulação transcraniana por corrente contínua (tDCS) e a estimulação magnética transcraniana (TMS). Nesta tese abordaremos o efeito terapêutico da tDCS, e os aspectos sobre a TMS serão aqueles pertinentes ao seu uso como instrumento de diagnóstico.

#### **2.2.5.1. tDCS como modulador da via nociceptiva**

O processamento da informação nociceptiva em nível cortical está vinculado à expressão de dor. Possivelmente o efeito analgésico observado ao estimular o córtex motor primário (M1) se deva, pelo menos em parte, à modulação do potencial de membrana de redes neurais com extensa projeção ao tálamo, aos núcleos subtalâmicos, ao cortex cingulado anterior, à substância cinzenta periaquedutal e até ao nível da medula espinhal (69, 120-122). O efeito da tDCS está associado à modificação dos potenciais de repouso da membrana neuronal, da área cortical alvo, com efeitos dependentes da polaridade utilizada. A estimulação catódica diminui a excitabilidade cortical através da hiperpolarização de neurônios, enquanto a anódica favorece a despolarização neuronal e, como consequência, aumenta a excitabilidade cortical (92). Evidências mostram que esse efeito modulatório pode se dever à estimulação de células gliais (69).

Como mencionado, o circuito cortical é composto por dois tipos principais de células: neurônios excitatórios e interneurônios inibitórios, existindo entre eles uma sincronização neural. Os mecanismos de sincronização das sinapses químicas agem através: 1) da excitação recorrente entre os neurônios excitatórios;

2) da mútua inibição entre interneurônios e, 3) do *feedback* negativo da alça de inibição excitatória-inibitória. Mais recentemente, sugeriu-se que as sinapses elétricas também contribuam para a sincronia neural (123).

A rede cerebral, que é classicamente associada com o processamento da dor, estudos de neuroimagem mostram mudanças hemodinâmicas nas regiões do cérebro relacionadas com a função motora durante a dor, incluindo o córtex motor primário (M1), possivelmente por apresentar extensa projeção ao tálamo e aos núcleos subtalâmicos e que, subsequentemente, podem modificar outras estruturas relacionadas com a dor, como o córtex cingulado anterior e a substância cinzenta periaquedutal, com extensão até ao nível da medula espinhal (120-122).

O córtex motor é constituído por uma ampla rede de neurônios, que apresentam uma arquitetura funcional favorável a mudanças duradouras na eficácia de conexões sinápticas, conhecidas como LTP ou, ao contrário, LTD (108). Possivelmente os mecanismos de deslocamento da excitabilidade induzida pelo tDCS resultam em alterações dependentes do receptor de NMDA (124). O sítio que tem sido mais amplamente utilizado na modulação do sistema nociceptivo é o córtex motor primário (M1). A estimulação desse ponto parece induzir alterações fundamentais para a reorganização da rede neuronal dessa via (69, 108, 125). O efeito dessa estimulação está vinculado à direção do fluxo de corrente, ao estado fisiológico do tecido subjacente (126) e do tipo de estímulo, sendo que a estimulação anódica determina a redução do GABA e a catódica, a redução da atividade glutamatérgica (69, 127).

O efeito da tDCS na dor aguda (128) e na crônica tem sido amplamente demonstrado (129). De acordo com Antal (2010)(121), em pacientes com dor crônica o efeito se deve ao reforço da inibição intracortical e à redução da facilitação excessiva (121). tDCS é uma opção potencialmente viável no tratamento da dor crônica, conforme demonstrado por estudos clínicos (17, 130, 131) e por estudos conduzidos em animais, nos quais seu uso reverteu a hiperalgesia induzida pelo estresse (132) e também pela inflamação (133).

Fregni *et al* (2006) (17) avaliaram tDCS no tratamento da dor decorrente de traumatismo raquimedular. O protocolo utilizado foi a estimulação anódica sobre o M1 e a catódica sobre a região



supraorbital contralateral a 2mA, 20 minutos, durante cinco dias consecutivos. Os autores verificaram melhora significativa da dor após estimulação ativa, mas não após estimulação sham. Além disso, houve efeito analgésico cumulativo durante a estimulação que perdurou por até duas semanas após término do tratamento. Esse mesmo protocolo foi adotado em outro estudo com pacientes fibromiálgicas, divididas em três grupos: estimulação anódica em M1, córtex pré-frontal dorso lateral (posicionando o eletrodo catódico na região supraorbital) e estimulação sham. Os autores observaram melhora da dor até três semanas após o término do tratamento (17). Em 2009, Valle *et al.* realizaram estudo com tDCS 2mA, por 20 minutos, durante 10 dias, em mulheres com fibromialgia e observaram importante efeito analgésico e melhora da qualidade de vida (130). Em pacientes com dor pélvica crônica refratária, o uso da tDCS numa intensidade de corrente de 1mA, por 20 minutos em dois dias consecutivos, reduziu significativamente os escores de dor em comparação com os do grupo sham (131). Em ensaio clínico randomizado realizado pelo grupo de Dor e Neuromodulação do HCPA, o uso da tDCS foi superior ao sham no tratamento da dor difusa induzida pelo uso de interferon peguilhado (134).

Adicionado ao potencial terapêutico, a tDCS apresenta como vantagens facilidade de uso, o tamanho do eletrodo que permite influenciar uma maior rede neural, a possibilidade de uso de sham em experimentos e ensaios clínicos, além de sua portabilidade. A aplicação é limitada pela pobre resolução temporal, pela localização anatômica e pela variação interindividual na condutividade da corrente elétrica devido a fatores como cabelo, couro cabeludo e osso que podem interferir na condução da corrente ao sítio efetor. Quanto aos efeitos adversos, tendem a ser de pequena magnitude se o uso seguir as orientações preconizadas nos *guidelines* (108, 135-139).

#### **2.2.6. Efeito da melatonina no processo de sinalização**

A melatonina é o neuro-hormônio produzido pela glândula pineal que regula o ritmo sono/vigília. Tem produção exclusivamente noturna, daí seu nome derivar do grego, *melas* (noturno) e *tonos* (trabalho). O

ritmo de produção é controlado pelo ciclo da iluminação ambiental, característico do dia e noite; através de uma via bioquímica que começa com o aminoácido triptofano, passando por 5-hidroxitriptofano, serotonina, N-acetilserotonina e, finalmente melatonina ou N-acetil-5metoxitriptamina (140, 141).

A melatonina apresenta ação sistêmica, é metabolizada no fígado e no cérebro e excretada na urina. É uma molécula anfipática, atravessa a membrana celular, agindo não só nos receptores de membrana como também no interior celular, através de reações bioquímicas (142-144). Apresenta receptores metabotrópicos, MT1 e MT2 (145). Exerce inúmeras e diversas funções fisiológicas como no ciclo vigília-sono, nos sistema cardiovascular e reprodutivo. Demonstra ações antioxidante, imunomoduladora, neuroendócrina, anti-inflamatória, hipnótica, ansiolítica, antidepressiva e analgésica (145-150).

Em 1969, Morris demonstrou que na escuridão os animais estão menos suscetíveis aos estímulos nociceptivos (151). Como os níveis de melatonina são elevados à noite, tem sido associada a efeitos antinociceptivos (152). Em humanos, o efeito da analgesia de parto foi mais potente à noite, o que sugere dever-se, em parte ao efeito da melatonina endógena como modulador dos sistemas nociceptivo (153).

A melatonina tem um papel na inflamação, reduzindo a hiperalgesia e contribuindo para o controle da dor (154). Naloxone e flumazenil reduzem a ação analgésica da melatonina na hiperalgesia térmica, assim como na alodínia mecânica, demonstrando que a ação antinociceptiva envolve a via opióide (38), os sistemas gabaérgico, glicinérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e glutamatérgico (152). Também apresenta ação direta nos receptores MT1 e MT2 (155). No que se refere às ações anti-inflamatórias, favorece a inibição das enzimas COX-2 e iNOS, ativa o NF-kB e inibe a infiltração por neutrófilos (145, 156). Do mesmo modo que suas ações antioxidantes contribuem para a analgesia (157). Seu uso tem sido investigado em diferentes modelos de dor experimental com animais (154, 157). Em humanos seu efeito tipo dose-resposta foi demonstrado em estudo conduzido pelo grupo de Dor e neuromodulação do HCPA (158).

Em estudos clínicos, o efeito analgésico da melatonina tem sido evidenciado em diferentes situações, como na dor aguda pós-operatória (30, 31, 159-161), na cefaléia (162), no refluxo gastroesofágico (163), na síndrome do intestino irritável (164), na fibromialgia (165), na dor miofacial temporomandibular (37), na

endometriose (32). É importante ressaltar que os efeitos analgésicos mostram-se independentes da melhora na qualidade do sono (37).

Dentre os mecanismos envolvidos com a resposta antinociceptiva estão a liberação de betaendorfinas no SNC, por ação central através de receptor GABA A e GABA B e na medula espinhal (166) pela redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (145, 157). O potencial efeito neuroprotetor da melatonina tem sido atribuído à ligação com agonista em receptor específico, que parece aumentar a expressão do BDNF (167, 168) assim como o crescimento da árvore dendrítica, por seu efeito neurotrófico modificando a rede neuronal (148, 169). Embora tenham sido demonstradas múltiplas vias de modulação do sistema nociceptivo (145), o exato mecanismo pelo qual a melatonina exerce seu efeito analgésico ainda não está completamente elucidado (145, 146). Apresenta segurança no uso devido a baixa toxicidade, mas os efeitos colaterais incluem fadiga, náuseas, tontura, dor de cabeça e irritabilidade (170).

Um dos questionamentos que persiste e que motivou o presente estudo foi o de avaliar como a melatonina poderia alterar a função das vias nociceptivas em níveis cortical e subcortical, isolada e combinada a outras modalidades de modulação neuronal.

### **2.2.7. Avaliação dos processos de neuroplasticidade por meio de medidas neurofisiológicas e marcadores séricos**

#### **2.2.7.1. Estimulação magnética transcraniana e excitabilidade cortical na dor**

A estimulação magnética transcraniana é uma técnica não invasiva de neuromodulação e neuroestimulação cerebral, que tem sido amplamente utilizada para examinar a fisiologia do córtex motor em seres humanos (88).

O método é baseado no princípio eletromagnético de indução, descoberto por Michael Faraday em 1838 (171, 172). TMS foi primeiro introduzido por Baker em 1985 (172, 173).

Uma bobina magnética conectada a um aparelho de estimulação magnética promove uma mudança constante na orientação da corrente elétrica, gerando um campo magnético. O pulso magnético é capaz de

passar ininterrupto através da pele e do crânio e, finalmente, atinge o córtex; ocasiona uma corrente elétrica restrita a pequenas áreas dependendo da geometria e forma da bobina (174, 175). A corrente induzida despolariza neurônios, que estão em uma orientação apropriada ao campo magnético (85) e pode atingir de 1,5 a 3 cm de profundidade no parênquima cerebral (124, 176). Dependendo da relação entre o campo elétrico induzido e a orientação dos elementos neuronais, os axônios piramidais podem ser ativados diretamente (mecanismo-D) na substância branca ou na cinzenta, ou indiretamente (mecanismo-I), via interneurônios, na substância cinzenta (177, 178). Além da ótima orientação da bobina, o limiar entre os mecanismos D e I diferem, o que torna possível ajustar as contribuições relativas aos dois mecanismos. A base teórica para a diferença entre os mecanismos D e I provém de: *i*) estudos fisiológicos, os quais mostram que os axônios são maximamente ativados quando estão, pelo menos, parcialmente paralelos ao campo elétrico, e esses axônios são particularmente sensíveis ao *hot spot*; *ii*) tipos de estudos (179-183).

*Hot spot* é o local de estimulação do córtex motor (M1) que gera melhor resposta no músculo em repouso, no caso, músculo interósseo dorsal (184, 185). A complexidade dos neurônios torna difícil prever precisamente os efeitos da estimulação (87). A estimulação pode ser realizada utilizando-se pulsos individuais, pares de pulsos, ou salvas de pulsos, cada um com efeitos diferentes nas redes cerebrais, por mecanismos ainda não completamente compreendidos (186).

Pulsos únicos e pareados são utilizados como parâmetros para obter as medidas de excitabilidade cortical. Os principais parâmetros de excitabilidade cortical são: limiar motor (LM), potencial evocado motor (MEP), período silente cortical (PSC), inibição intracortical curta (IIC) e facilitação intracortical curta (FIC) (183, 187).



**Figura 6:** TMS 2002 (Modelo MagVenture); Laboratório de Dor e Neuromodulação.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Prof. Dr. Wolnei Caumo.



**Figura 7:** Voluntário TMS 2002 (Modelo MagVenture); Laboratório de Dor e Neuromodulação.

Hospital de Clínicas de Porto

### 2.2.7.2. Medidas de projeção córtico-espinhal com pulso único

#### a) Limiar motor

O limiar motor (LM) refere-se a menor intensidade de estímulo capaz de gerar um MEP com amplitude mínima de 50  $\mu\text{V}$  no músculo em repouso ou 200  $\mu\text{V}$  no músculo contraído, em pelo menos 50% dentre os pulsos magnéticos aplicados (188-190), e fornece informações sobre um núcleo central de neurônios da representação muscular no córtex motor. É menor para os músculos intrínsecos da mão em relação ao braço proximal, membros inferiores e músculos tronculares (191). O LM reflete a excitabilidade da membrana dos neurônios corticoespinhais e interneurônios do córtex motor, da medula espinhal, das junções neuromusculares e dos músculos (172), ou seja, propicia conhecer a eficácia de uma cadeia de

sinapses dos neurônios para os músculos porque está aumentado por agentes que bloqueiam canais de sódio (190, 192). O LM é diminuído por agentes glutamatérgicos não NMDA (193), mas não é afetado por drogas que alteram o GABA (194) ou a transmissão NMDA de glutamato (4, 195).

#### b) Potencial evocado motor

O potencial evocado motor (MEP) representa a ativação de fibras musculares das unidades motoras estimuladas no hemisfério contralateral, demonstrado pela EMG. Reflete a integridade do trato corticoespinal, a excitabilidade do córtex motor e a condução das raízes nervosas periféricas para os músculos. Vários fatores influenciam a amplitude do MEP, entre eles: intensidade do estímulo, número de neurônios motores recrutados no trato corticoespinal, sincronização do estímulo da TMS e o disparo neuronal, localização do campo magnético e a direção da indução do campo elétrico (171, 187, 196-198). A intensidade de estímulo do MEP apresenta-se com amplitude de 1mV pico a pico (188, 189). De maneira semelhante ao LM, o MEP reflete a excitabilidade da membrana neuronal (182, 187, 192), apresentando desse modo, como visto, variação entre sujeitos e entre um estímulo e outro, e essa amplitude de variação é imprevisível (184).

#### c) Período silente cortical

O período silente é reproduzido na aplicação do estímulo transcraniano, durante a contração voluntária do músculo efector. Indica um silêncio transitório na atividade eletromiográfica isométrica voluntária do músculo efector produzida pela TMS de pulso único no córtex motor contralateral. Apresenta-se logo após o MEP. Sua duração está diretamente relacionada à intensidade do estímulo, e seu mecanismo envolve a atividade de circuitos inibitórios na altura do córtex motor, resultando numa falha transitória da saída cortical motora (65, 199, 200). A duração da inibição cortical avaliada pelo período silente é consistente com as medições intracelulares de potenciais pós-sinápticos inibitórios de longa duração (na ordem das centenas de milissegundos) dependentes dos receptores GABA B (201). Siebner *et al* (1998)

(202) encontraram um alongamento dose dependente depois de infusões contínuas intratecais de baclofeno, agonista GABA B, em um paciente com distonia generalizada.

### 2.2.7.3. Pulso pareado

A TMS pode ser usada para investigar os mecanismos facilitatórios e inibitórios, através de estímulos pareados, sublimiares e supralimiais, denominados de estímulo condicionante e de estímulo teste (174, 190). Os parâmetros de estimulação que determinam a interação entre estímulo condicionante e estímulo teste são: a intensidade desses estímulos e o intervalo de tempo entre os estímulos (intervalo interestímulo - IIEs). O estímulo aplicado em intervalos curtos entre 1 e 5 ms, favorece a respostas inibitórias, e quando aplicados em intervalos maiores, de 8, 15 ms até 30 ms, as respostas do teste são facilitadas, ou seja, promovem facilitação intracortical (ICF) (85).

O pulso pareado é normalmente expresso como a razão entre a amplitude de MEP (80% do LM – estímulo sublimiar) para produzir inibição intracortical curta ou facilitação intracortical curta pela amplitude de MEP (130% do LM – estímulo supralimiar) produzida apenas como estímulo teste. Índices abaixo de 1 representam inibição, e relações superiores a 1 representam facilitação (203, 204).

Em indivíduos saudáveis, a administração aguda da maioria dos medicamentos GABAérgicos reforçam a inibição intracortical curta (IIC) (192, 194). O efeito facilitador de lorazepam na IIC e a diminuição da FIC foram igualmente documentados por Di Lazzaro *et al* (2000) (205). Esses resultados corroboram fortemente as evidências de que a IIC reflete a inibição GABA A mediada no córtex motor (194, 206). A FIC pode refletir a transmissão glutamatérgica NMDA no córtex motor, hipótese apoiada por dados experimentais, que mostram que os antagonistas NMDA reduzem a FIC (197, 207). Tem sido sugerido que a FIC não é, exclusivamente, mediada por interneurônios excitatórios, mas, sim, por um equilíbrio entre os fenômenos inibitório e excitatório (173).

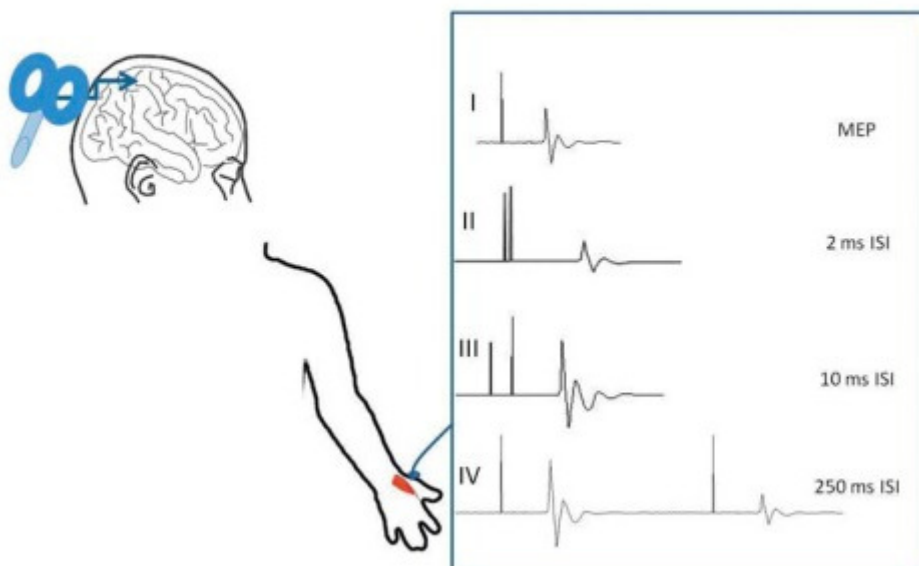
A dinâmica temporal dos estímulos e a resposta correspondente precisa de melhor caracterização para identificar os diferentes parâmetros e a duração do estímulo, juntamente com o intervalo adequado entre a estimulação e terapia comportamental ou farmacológica (186).

A extensão da despolarização ou hiperpolarização depende de vários fatores, incluindo a direção do fluxo de corrente em paralelo à superfície do cérebro, a forma de onda, se monofásica ou bifásica, a condutividade de tecido, a orientação e morfologia da população de neurônios sob investigação, bem como a camada cortical e o tipo de célula permitindo um maior ou menor grau de modulação (186).

As principais limitações são cliques cerebrais, implantes cocleares em função do aquecimento gerado pela estimulação (172).

O principal risco associado à TMS é a convulsão, mas que pode ser minimizado se os protocolos forem seguidos corretamente (186, 208). Pode ocorrer piora de sintomas sensoriais como zumbido, alucinações auditivas e visuais e, cefaleia, tonturas, síncope (172, 176, 208).

#### a) Motor cortical excitability



**Figura 7:** Parâmetros da avaliação de excitabilidade cortical.  
Figura adaptada de Badawy *et al* , 2012 (209) .

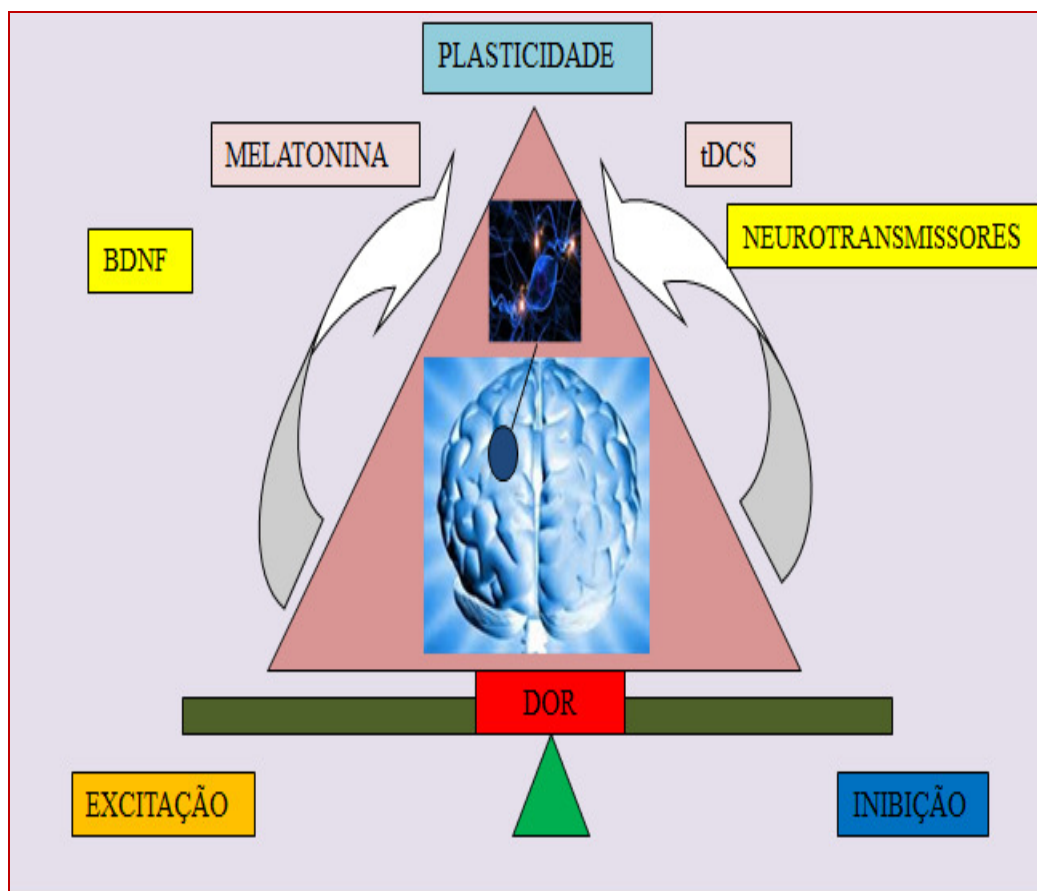
#### 2.2.8. Marco conceitual do estudo



A base teórica desta tese procura mostrar a complexidade e a multidimensionalidade da dor. Defrontamo-nos com conceitos básicos, abrangentes e estritos, principiámos por uma única célula para alcançarmos bilhões, exploramos respostas unitárias e nos deparamos com trilhões de circuitos. A busca do equilíbrio no sistema visa uma integração dinâmica das informações internas em resposta ao meio, através de um processo adaptativo contínuo, promovendo mudanças facilitadoras ou supressoras, que são reguladas por limites como a metaplasticidade e a depotenciação, objetivando sempre o equilíbrio homeostático.

No contexto deste estudo, dentre os sistemas neurobiológicos de maior interesse destacam-se o nociceptivo e seus mecanismos neuromodulatórios. Almejamos a compreensão da excitabilidade cortical indexada por meio de parâmetros da estimulação magnética transcraniana (MEP, IIC, FIC, PS), medidas psicofísicas (limiar de dor e CPM) e marcadores de neurobiológicos, como o BDNF. Esse processo avaliativo integrado pode auxiliar na compreensão da sinalização nociceptiva a nível cortical e infracortical. A compreensão desse complexo sistema nos motivou avaliar a resposta de sistemas neurobiológicos saudáveis a estímulos padronizados com e sem o efeito de intervenções farmacológicas e não farmacológicas. A hipótese do trabalho é que poderia haver sinergismo ou efeito aditivo.

A base central está direcionada às alterações funcionais do sistema nociceptivo, à sua relação com o BDNF e ao efeito da tDCS combinado ou não com a melatonina. A hipótese de um possível efeito aditivo ou sinérgico dessas intervenções na função do sistema nociceptivo faz parte da compreensão dos limites de resposta desse sistema, aqui denominados metaplasticidade e depotenciação.



**Figura 8:** Marco conceitual construído a partir da base teórica que sustenta este estudo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo principal**

- Avaliar a neuroplasticidade do sistema nociceptivo integrando parâmetros de excitabilidade cortical, medidas psicofísicas e o efeito de intervenções neuromodulatórias não farmacológicas, como a tDCS, e farmacológicas, como a melatonina.

#### **3.2. Objetivos secundários**

- 1) Determinar a relação entre os níveis séricos do BDNF e a resposta à dor aguda induzida experimentalmente, assim como a função do sistema modulador descendente durante CPM-TASK e os substratos neurais por meio da TMS.
- 2) Avaliar o efeito da melatonina isolada ou combinada à tDCS no limiar de dor ao calor e parâmetros de excitabilidade cortical de sujeitos saudáveis, nos seguintes desfechos:
  - limiar de dor ao calor;
  - parâmetros de excitabilidade cortical avaliada por meio do limiar motor, do potencial evocado motor, da facilitação intracortical, da inibição intracortical e do período silente;
  - níveis séricos de BDNF.

### **4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA**

1. Benzon HT, P. RJ, L. WC, C. TD, Argoff CE. RAJ'S PRACTICAL MANAGEMENT OF PAIN

2008.

2. Castro FS, Landeira-Fernandez J. Alma, corpo e a antiga civilização grega: as primeiras observações do funcionamento cerebral e das atividades mentais. *Psicologia: Reflexão e Crítica*. 2011;24:798-809.
3. Fregni F, Pascual-Leone A. Technology insight: noninvasive brain stimulation in neurology-perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007;3(7):383-93.
4. Ziemann U, Muellbacher W, Hallett M, Cohen LG. Modulation of practice-dependent plasticity in human motor cortex. *Brain*. 2001;124(Pt 6):1171-81.
5. Córdoba-Montoya DA, Albert J, López-Martín S. [All together now: long term potentiation in the human cortex]. *Rev Neurol*. 2010;51(6):367-74.
6. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*. 2009;10(9):895-926.
7. Schestatsky P, Stefani LC, Sanches PR, Silva Júnior DP, Torres IL, Dall-Agnol L, et al. Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011;69(6):943-8.
8. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3779-87.
9. Kopf A, Patel NB. *Guide to Pain Management in Low-Resource Settings*. 2010.
10. Racine M, Tousignant-Laflamme Y, Kloda LA, Dion D, Dupuis G, Choiniere M. A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and experimental pain perception - part 1: are there really differences between women and men? *Pain*. 2012;153(3):602-18.
11. Palazzo E, Marabese I, de Novellis V, Rossi F, Maione S. Supraspinal metabotropic glutamate receptors: a target for pain relief and beyond. *Eur J Neurosci*. 2014;39(3):444-54.
12. Basbaum A, Bushnell C. *Science of Pain*. First Edition ed2009.
13. Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, et al. BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol*. 2008;85(3):297-317.
14. Zhang Y, Zhang L. Prevalence of allergic rhinitis in china. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;6(2):105-13.
15. Zhang HH, Zhang XQ, Xue QS, Yan-Luo, Huang JL, Zhang S, et al. The BDNF/TrkB signaling pathway is involved in heat hyperalgesia mediated by Cdk5 in rats. *PLoS One*. 2014;9(1):e85536.
16. Huie JR, Garraway SM, Baumbauer KM, Hoy KC, Jr., Beas BS, Montgomery KS, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes adaptive plasticity within the spinal cord and mediates the beneficial effects of controllable stimulation. *Neuroscience*. 2012;200:74-90.
17. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJ, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 2006;54(12):3988-98.

18. Roizenblatt S, Fregni F, Gimenez R, Wetzel T, Rigonatti SP, Tufik S, et al. Site-specific effects of transcranial direct current stimulation on sleep and pain in fibromyalgia: a randomized, sham-controlled study. *Pain Pract.* 2007;7(4):297-306.
19. Lefaucheur JP, Hatem S, Nineb A, Ménard-Lefaucheur I, Wendling S, Keravel Y, et al. Somatotopic organization of the analgesic effects of motor cortex rTMS in neuropathic pain. *Neurology* December. 2006;67(11):1998-2004.
20. Boros K, Poreisz C, Munchau A, Paulus W, Nitsche MA. Premotor transcranial direct current stimulation (tDCS) affects primary motor excitability in humans. *Eur J Neurosci.* 2008;27(5):1292-300.
21. Johnson MD, Lim HH, Netoff TI, Connolly AT, Johnson N, Roy A, et al. Neuromodulation for brain disorders: challenges and opportunities. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2013;60(3):610-24.
22. Baudewig J, Nitsche MA, Paulus W, Frahm J. Regional modulation of BOLD MRI responses to human sensorimotor activation by transcranial direct current stimulation. *Magn Reson Med.* 2001;45(2):196-201.
23. Paulus W. Outlasting excitability shifts induced by direct current stimulation of the human brain. *Suppl Clin Neurophysiol.* 2004;57:708-14.
24. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol.* 2000;527 Pt 3:633-9.
25. Horvath JC, Carter O, Forte JD. Transcranial direct current stimulation: five important issues we aren't discussing (but probably should be). *Front Syst Neurosci.* 2014;8:2.
26. Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain.* 2002;125(Pt 10):2238-47.
27. Stagg CJ, Bestmann S, Constantinescu AO, Moreno LM, Allman C, Mекle R, et al. Relationship between physiological measures of excitability and levels of glutamate and GABA in the human motor cortex. *J Physiol.* 2011;589(Pt 23):5845-55.
28. Laste G, de Macedo IC, Ripoll Rozisky J, Ribeiro da Silva F, Caumo W, Torres IL. Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats. *J Pain Res.* 2012;5:359-62.
29. Ambriz-Tututi M, Granados-Soto V. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. *Pain.* 2007;132(3):273-80.
30. Caumo W, Torres F, Moreira NL, Jr., Auzani JA, Monteiro CA, Londero G, et al. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesth Analg.* 2007;105(5):1263-71, table of contents.
31. Caumo W, Levandovski R, Hidalgo MP. Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Pain.* 2009;10(1):100-8.
32. Schwertner A, Conceicao Dos Santos CC, Costa GD, Deitos A, de Souza A, de Souza IC, et al. Efficacy of melatonin in the treatment of endometriosis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain.* 2013;154(6):874-81.

33. Volz MS, Medeiros LF, Tarragô MaG, Vidor LP, Dall'Agnol L, Deitos A, et al. The relationship between cortical excitability and pain catastrophizing in myofascial pain. *J Pain*. 2013;14(10):1140-7.
34. Citera G, Arias MA, Maldonado-Cocco JA, Lazaro MA, Rosemffet MG, Brusco LI, et al. The effect of melatonin in patients with fibromyalgia: a pilot study. *Clin Rheumatol*. 2000;19(1):9-13.
35. Hussain S, Al-khalifa I, Jasim N, Gorial F. Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia. *J pineal res* [Internet]. 2011; 50:[267-71 pp.].
36. Stefani L, Muller S, Torres I, Razzolini B, Rozisky J, Fregni F, et al. A phase II randomised, double-blind, placebo controlled, dose-response trial of the melatonin effect on the pain threshold of healthy subjects. *plos one* [Internet]. 2013; 8.
37. Vidor LP, Torres IL, Custodio de Souza IC, Fregni F, Caumo W. Analgesic and sedative effects of melatonin in temporomandibular disorders: a double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled study. *J Pain Symptom Manage*. 2013;46(3):422-32.
38. Zurowski D, Nowak L, Machowska A, Wordliczek J, Thor PJ. Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. The role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism. *J Physiol Pharmacol*. 2012;63(6):641-7.
39. Zanette SA, Vercelino R, Laste G, Rozisky JR, Schwertner A, Machado CB, et al. Melatonin analgesia is associated with improvement of the descending endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: A phase II, randomized, double-dummy, controlled trial. *BMC Pharmacology and Toxicology* 2014.
40. Yarnitsky D. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2010;23(5):611-5.
41. Houvenagel E, Forzy G, Leloire O, Gallois P, Hary S, Hautecoeur P, et al. [Cerebrospinal fluid monoamines in primary fibromyalgia]. *Revue du rhumatisme et des maladies osteo-articulaires*. 1990;57(1):21-3.
42. Legangneux E, Mora JJ, Spreux-Varoquaux O, Thorin I, Herrou M, Alvado G, et al. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites, plasma-rich platelet serotonin and [3H]imipramine reuptake in the primary fibromyalgia syndrome. *Rheumatology*. 2001;40(3):290-6.
43. Russell IJ, Michalek JE, Vipraio GA, Fletcher EM, Javors MA, Bowden CA. Platelet 3H-imipramine uptake receptor density and serum serotonin levels in patients with fibromyalgia/fibrositis syndrome. *The Journal of rheumatology*. 1992;19(1):104-9.
44. Wood PB, Holman AJ. An elephant among us: the role of dopamine in the pathophysiology of fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2009;36(2):221-4.
45. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002;66(6):355-474.
46. Clauw DJ, Arnold LM, McCarberg BH, FibroCollaborative. The science of fibromyalgia. *Mayo Clinic proceedings*. 2011;86(9):907-11.
47. Basbaum AI, Braz JM. Transgenic Mouse Models for the Tracing of "Pain" Pathways. In: Kruger L, Light AR, editors. *Translational Pain Research: From Mouse to Man*. *Frontiers in Neuroscience*. Boca

Raton, FL2010.

48. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007;55(3):353-64.
49. Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*. 2010;16(11):1258-66.
50. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res*. 2004;1000(1-2):40-56.
51. Price DD, Greenspan JD, Dubner R. Neurons involved in the exteroceptive function of pain. *Pain*. 2003;106(3):215-9.
52. Mense S, Gerwin R. Central Nervous Mechanisms of Muscle Pain. *Muscle Pain: Understanding the Mechanisms: Springer-Verlag* 2010. p. 105-75.
53. Merighi A, Bardoni R, Salio C, Lossi L, Ferrini F, Prandini M, et al. Presynaptic functional trkB receptors mediate the release of excitatory neurotransmitters from primary afferent terminals in lamina II (substantia gelatinosa) of postnatal rat spinal cord. *Dev Neurobiol*. 2008;68(4):457-75.
54. Baranauskas G, Nistri A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol*. 1998;54(3):349-65.
55. Sandkuhler J. Learning and memory in pain pathways. *Pain*. 2000;88(2):113-8.
56. Li P, Zhuo M. Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. *Nature*. 1998;393(6686):695-8.
57. Russell IJ, Larson AA. Neurophysiopathogenesis of fibromyalgia syndrome: a unified hypothesis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2009;35(2):421-35.
58. Schnitzler A, Ploner M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society*. 2000;17(6):592-603.
59. Mylius V, Borckardt JJ, Lefaucheur JP. Noninvasive cortical modulation of experimental pain. *Pain*. 2012;153(7):1350-63.
60. Ploner M, Gross J, Timmermann L, Schnitzler A. Cortical representation of first and second pain sensation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(19):12444-8.
61. Kaas JH, Qi HX, Burish MJ, Gharbawie OA, Onifer SM, Massey JM. Cortical and subcortical plasticity in the brains of humans, primates, and rats after damage to sensory afferents in the dorsal columns of the spinal cord. *Exp Neurol*. 2008;209(2):407-16.
62. Kaas JH. The evolution of the complex sensory and motor systems of the human brain. *Brain Res Bull*. 2008;75(2-4):384-90.
63. Sultan KT, Brown KN, Shi SH. Production and organization of neocortical interneurons. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:221.
64. Druga R. Neocortical inhibitory system. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(6):201-17.

65. Chen R, Yung D, Li JY. Organization of ipsilateral excitatory and inhibitory pathways in the human motor cortex. *J Neurophysiol*. 2003;89(3):1256-64.
66. Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry*. 2003;8(8):721-37, 15.
67. Radhu N, de Jesus DR, Ravindran LN, Zanjani A, Fitzgerald PB, Daskalakis ZJ. A meta-analysis of cortical inhibition and excitability using transcranial magnetic stimulation in psychiatric disorders. *Clin Neurophysiol*. 2013;124(7):1309-20.
68. Gwak YS, Hulsebosch CE. GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2011;60(5):799-808.
69. Kidgell DJ, Daly RM, Young K, Lum J, Tooley G, Jaberzadeh S, et al. Different current intensities of anodal transcranial direct current stimulation do not differentially modulate motor cortex plasticity. *Neural Plast*. 2013;2013:603502.
70. Chevalyere V, Piskorowski R. Modulating excitation through plasticity at inhibitory synapses. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:93.
71. Betz H, Gomeza J, Arnsen W, Scholze P, Eulenburg V. Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 1):55-8.
72. Singer P, Boison D, Möhler H, Feldon J, Yee BK. Modulation of sensorimotor gating in prepulse inhibition by conditional brain glycine transporter 1 deletion in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011;21(5):401-13.
73. Osikowicz M, Mika J, Przewlocka B. The glutamatergic system as a target for neuropathic pain relief. *Exp Physiol*. 2013;98(2):372-84.
74. Osikowicz M, Skup M, Mika J, Makuch W, Czarkowska-Bauch J, Przewlocka B. Glial inhibitors influence the mRNA and protein levels of mGlu2/3, 5 and 7 receptors and potentiate the analgesic effects of their ligands in a mouse model of neuropathic pain. *Pain*. 2009;147(1-3):175-86.
75. Bliss TV, Collingridge GL, Morris RG. Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1633):20130129.
76. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*. 2003;97(4):1108-16.
77. Collins S, Sigtermans MJ, Dahan A, Zuurmond WW, Perez RS. NMDA receptor antagonists for the treatment of neuropathic pain. *Pain Med*. 2010;11(11):1726-42.
78. Stone LS, Molliver DC. In search of analgesia: emerging roles of GPCRs in pain. *Mol Interv*. 2009;9(5):234-51.
79. Brederson JD, Jarvis MF, Honore P, Surowy CS. Fibromyalgia: mechanisms, current treatment and animal models. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(10):1613-26.
80. Jennings KA. A comparison of the subsecond dynamics of neurotransmission of dopamine and serotonin. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(5):704-14.



81. Udupa K, Chen R. Motor Cortical Plasticity in Parkinson's Disease. *Front Neurol.* 2013;4:128.
82. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul.* 2008;1(3):206-23.
83. Butler AJ, Wolf SL. Putting the brain on the map: use of transcranial magnetic stimulation to assess and induce cortical plasticity of upper-extremity movement. *Phys Ther.* 2007;87(6):719-36.
84. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004;44(1):5-21.
85. Pascual-Leone A. *Handbook of transcranial magnetic stimulation.* London Oxford University Press; 2002.
86. Iezzi E, Suppa A, Conte A, Li Voti P, Bologna M, Berardelli A. Short-term and long-term plasticity interaction in human primary motor cortex. *Eur J Neurosci.* 2011;33:1908-15.
87. Nitsche J, Howell C, Howell T. Skin closure with subcuticular absorbable staples after cesarean section is associated with decreased analgesic use. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285:979-83.
88. Butler AJ, Wolf SL. Putting the brain on the map: use of transcranial magnetic stimulation to assess and induce cortical plasticity of upper-extremity movement. *Phys Ther.* 2007;87:719-36.
89. Park P, Volianskis A, Sanderson TM, Bortolotto ZA, Jane DE, Zhuo M, et al. NMDA receptor-dependent long-term potentiation comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1633):20130131.
90. Bliss TV, Collingridge GL, Morris RG. Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 2013;369:20130129.
91. Savtchenko LP, Rusakov DA. Moderate AMPA receptor clustering on the nanoscale can efficiently potentiate synaptic current. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1633):20130167.
92. Krause B, Márquez-Ruiz J, Kadosh RC. The effect of transcranial direct current stimulation: a role for cortical excitation/inhibition balance? *Front Hum Neurosci.* 2013;7:602.
93. Maffei A. The many forms and functions of long term plasticity at GABAergic synapses. *Neural Plast.* 2011;2011:254724.
94. Ichim TE, Solano F, Lara F, Paris E, Ugalde F, Rodriguez JP, et al. Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report. *Int Arch Med.* 2010;3:30.
95. Vanelderden P, Rouwette T, Kozicz T, Roubos E, Van Zundert J, Heylen R, et al. The role of brain-derived neurotrophic factor in different animal models of neuropathic pain. *Eur J Pain.* 2010;14:473.e1-9.
96. Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;15:117-36.
97. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 2004;22(3):123-31.

98. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;63(1):71-124.
99. Merighi A, Bardoni R, Salio C, Lossi L, Ferrini F, Prandini M, et al. Presynaptic functional trkB receptors mediate the release of excitatory neurotransmitters from primary afferent terminals in lamina II (substantia gelatinosa) of postnatal rat spinal cord. *Dev Neurobiol.* 2008;68:457-75.
100. Murray PS, Holmes PV. An overview of brain-derived neurotrophic factor and implications for excitotoxic vulnerability in the hippocampus. *Int J Pept.* 2011;2011:654085.
101. Jang SW, Liu X, Pradoldej S, Tosini G, Chang Q, Iuvone PM, et al. N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3876-81.
102. Goda A, Ohgi S, Kinpara K, Shigemori K, Fukuda K, Schneider EB. Changes in serum BDNF levels associated with moderate-intensity exercise in healthy young Japanese men. *Springerplus.* 2013;2:678.
103. Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res.* 2006;55(1):1-10.
104. Zhang Y, Zhang L. Prevalence of allergic rhinitis in china. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014;6:105-13.
105. Katoh-Semba R, Wakako R, Komori T, Shigemi H, Miyazaki N, Ito H, et al. Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. *Int J Dev Neurosci.* 2007;25(6):367-72.
106. Betley JN, Wright CV, Kawaguchi Y, Erdelyi F, Szabo G, Jessell TM, et al. Stringent specificity in the construction of a GABAergic presynaptic inhibitory circuit. *Cell.* 2009;139(1):161-74.
107. Muller-Dahlhaus F, Ziemann U. Metaplasticity in Human Cortex. *Neuroscientist.* 2014.
108. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul.* 2008;1:206-23.
109. Nitsche MA, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology.* 2001;57(10):1899-901.
110. Ziemann U, Muellbacher W, Hallett M, Cohen LG. Modulation of practice-dependent plasticity in human motor cortex. *Brain.* 2001;124:1171-81.
111. Murakami T, Müller-Dahlhaus F, Lu MK, Ziemann U. Homeostatic metaplasticity of corticospinal excitatory and intracortical inhibitory neural circuits in human motor cortex. *J Physiol.* 2012;590(Pt 22):5765-81.
112. Froc DJ, Chapman CA, Trepel C, Racine RJ. Long-term depression and depotentiation in the sensorimotor cortex of the freely moving rat. *J Neurosci.* 2000;20(1):438-45.
113. Ormond J, Woodin MA. Disinhibition mediates a form of hippocampal long-term potentiation in area CA1. *PLoS One.* 2009;4(9):e7224.
114. Buzsáki G, Csicsvari J, Dragoi G, Harris K, Henze D, Hirase H. Homeostatic maintenance of neuronal excitability by burst discharges in vivo. *Cereb Cortex.* 2002;12(9):893-9.

115. Massey PV, Bashir ZI. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci.* 2007;30(4):176-84.
116. Lin CH, Lee CC, Gean PW. Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Mol Pharmacol.* 2003;63(1):44-52.
117. Di Lazzaro V, Pilato F, Dileone M, Profice P, Capone F, Ranieri F, et al. Modulating cortical excitability in acute stroke: a repetitive TMS study. *Clin Neurophysiol.* 2008;119:715-23.
118. Di Lazzaro V, Pilato F, Dileone M, Profice P, Oliviero A, Mazzone P, et al. The physiological basis of the effects of intermittent theta burst stimulation of the human motor cortex. *J Physiol.* 2008;586:3871-9.
119. Di Lazzaro V, Pilato F, Dileone M, Profice P, Oliviero A, Mazzone P, et al. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation suppresses specific excitatory circuits in the human motor cortex. *J Physiol.* 2008;586:4481-7.
120. Fregni F, Orsati F, Pedrosa W, Fecteau S, Tome FA, Nitsche MA, et al. Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates the desire for specific foods. *Appetite.* 2008;51:34-41.
121. Antal A, Paulus W. Effects of transcranial theta-burst stimulation on acute pain perception. *Restor Neurol Neurosci.* 2010;28(4):477-84.
122. Mercier C, Léonard G. Interactions between Pain and the Motor Cortex: Insights from Research on Phantom Limb Pain and Complex Regional Pain Syndrome. *Physiother Can.* 2011;63(3):305-14.
123. Wang T, Li SR, Dai X, Peng YL, Chen Q, Wang R. Effects of melatonin on orphanin FQ/nociceptin-induced hyperalgesia in mice. *Brain Res.* 2006;1085(1):43-8.
124. Ridding MC, Ziemann U. Determinants of the induction of cortical plasticity by non-invasive brain stimulation in healthy subjects. *J Physiol.* 2010;588(Pt 13):2291-304.
125. Polanía R, Paulus W, Nitsche MA. Reorganizing the Intrinsic Functional Architecture of the Human Primary Motor Cortex during Rest with Non-Invasive Cortical Stimulation. *PLoS ONE.* 2012;7(1):e30971.
126. Schlaug G, Renga V, Nair D. Transcranial direct current stimulation in stroke recovery. *Arch Neurol.* 2008;65(12):1571-6.
127. Stagg CJ, Bestmann S, Constantinescu AO, Moreno LM, Allman C, Meckle R, et al. Relationship between physiological measures of excitability and levels of glutamate and GABA in the human motor cortex. *J Physiol.* 2011;589:5845-55.
128. Antal A, Brepohl N, Poreisz C, Boros K, Csifcsak G, Paulus W. Transcranial direct current stimulation over somatosensory cortex decreases experimentally induced acute pain perception. *Clin J Pain.* 2008;24(1):56-63.
129. Lima MC, Fregni F. Motor cortex stimulation for chronic pain: systematic review and meta-analysis of the literature. *Neurology.* 2008;70(24):2329-37.
130. Valle A, Roizenblatt S, Botte S, Zaghi S, Riberto M, Tufik S, et al. Efficacy of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) for the treatment of fibromyalgia: results of a randomized, sham-controlled longitudinal clinical trial. *J Pain Manag.* 2009;2(3):353-61.

131. Fenton BW, Palmieri PA, Boggio P, Fanning J, Fregni F. A preliminary study of transcranial direct current stimulation for the treatment of refractory chronic pelvic pain. *Brain Stimul.* 2009;2(2):103-7.
132. Spezia Adachi LN, Caumo W, Laste G, Fernandes Medeiros L, Ripoll Rozisky J, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res.* 2012;1489:17-26.
133. Laste G, Caumo W, Adachi LN, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PR, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res.* 2012;221(1):75-83.
134. Brietzke A. Efeito da estimulação por corrente contínua nos sintomas associados ao tratamento com interferon peguilado em portadores de hepatite C crônica 2013.
135. Brunoni AR, Amadera J, Berbel B, Volz MS, Rizzerio BG, Fregni F. A systematic review on reporting and assessment of adverse effects associated with transcranial direct current stimulation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011;14(8):1133-45.
136. Brunoni AR, Bensenor IM, Alves TC. Therapeutic interventions for vascular depression: a systematic review. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33(4):400-9.
137. Brunoni AR, Nitsche MA, Bolognini N, Bikson M, Wagner T, Merabet L, et al. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. *Brain Stimul.* 2012;5(3):175-95.
138. Poreisz C, Boros K, Antal A, Paulus W. Safety aspects of transcranial direct current stimulation concerning healthy subjects and patients. *Brain Res Bull.* 2007;72(4-6):208-14.
139. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept.* 2000;9(3-4):160-71.
140. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:376-86.
141. Reiter RJ, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Manchester LC, Tan DX. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;993:35-47; discussion 8-53.
142. Hardeland R, Poeggeler B, Srinivasan V, Trakht I, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonergic drugs in clinical practice. *Arzneimittelforschung.* 2008;58(1):1-10.
143. Hardeland R, Madrid JA, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res.* 2012;52(2):139-66.
144. Kurdi MS, Patel T. The role of melatonin in anaesthesia and critical care. *Indian journal of anaesthesia.* 2013;57(2):137-44.
145. Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter RJ, Rosenberg J, Gogenur I. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies. *J Pineal Res.* 2011;51(3):270-7.
146. Sukumaran S, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ. Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(9-

10):904-17.

147. Appelbaum L, Wang G, Yokogawa T, Skariah GM, Smith SJ, Mourrain P, et al. Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. *Neuron*. 2010;68(1):87-98.

148. Srinivasan V, Brzezinski A, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Cardinali DP, Brown GM. Melatonin agonists in primary insomnia and depression-associated insomnia: are they superior to sedative-hypnotics? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(4):913-23.

149. Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, Pandi-Perumal SR. Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(4-6):272-8.

150. Morris RW, Lutsch EF. Daily susceptibility rhythm to morphine analgesia. *J Pharm Sci*. 1969;58(3):374-6.

151. Srinivasan V, Zakaria R, Jeet Singh H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin and its agonists in pain modulation and its clinical application. *Arch Ital Biol*. 2012;150(4):274-89.

152. Vieira WS, Hidalgo MP, Torres IaS, Caumo W. Biological rhythms of spinal-epidural labor analgesia. *Chronobiol Int*. 2010;27(4):865-78.

153. Markus RP, Ferreira ZS. The immune-pineal axis: the role of pineal and extra-pineal melatonin in modulating inflammation. *Advances in neuroimmune Biology [Internet]*. 2011; 1:[95-104 pp.].

154. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Brown GM, Cardinali DP. Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:326320.

155. Mahmood NMA, Mahmood KJ, Hussain SA. Dose-dependent anti-inflammatory activity of melatonin in experimental animal model of chronic inflammation. *Global J Pharmacol [Internet]*. 2010; 4 (2):[66-70 pp.].

156. Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter RJ, Rosenberg J, Gögenur I. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies. *J Pineal Res*. 2011;51(3):270-7.

157. Stefani LC, Torres IL, de Souza IC, Rozisky JR, Fregni F, Caumo W. BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects. *Neurosci Lett*. 2012;514(1):62-6.

158. Borazan H, Tuncer S, Yalcin N, Erol A, Otelcioglu S. Effects of preoperative oral melatonin medication on postoperative analgesia, sleep quality, and sedation in patients undergoing elective prostatectomy: a randomized clinical trial. *J Anesth*. 2010;24(2):155-60.

159. Mowafi HA, Ismail SA. Melatonin improves tourniquet tolerance and enhances postoperative analgesia in patients receiving intravenous regional anesthesia. *Anesth Analg*. 2008;107(4):1422-6.

160. Yousaf F, Seet E, Venkatraghavan L, Abrishami A, Chung F. Efficacy and safety of melatonin as an anxiolytic and analgesic in the perioperative period: a qualitative systematic review of randomized trials. *Anesthesiology*. 2010;113(4):968-76.

161. Peres MF. Melatonin, the pineal gland and their implications for headache disorders. *Cephalalgia*. 2005;25(6):403-11.

162. Kandil TS, Mousa AA, El-Gendy AA, Abbas AM. The potential therapeutic effect of melatonin in

Gastro-Esophageal Reflux Disease. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:7.

163. Mozaffari S, Rahimi R, Abdollahi M. Implications of melatonin therapy in irritable bowel syndrome: a systematic review. *Curr Pharm Des.* 2010;16(33):3646-55.
164. Hussain SA, Al K, II, Jasim NA, Gorial FI. Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia. *J Pineal Res.* 2011;50(3):267-71.
165. Ambriz-Tututi M, Rocha-Gonzalez HI, Cruz SL, Granados-Soto V. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life sciences.* 2009;84(15-16):489-98.
166. Imbesi M, Uz T, Dzitoyeva S, Manev H. Stimulatory effects of a melatonin receptor agonist, ramelteon, on BDNF in mouse cerebellar granule cells. *Neurosci Lett.* 2008;439(1):34-6.
167. Imbesi M, Uz T, Manev H. Role of melatonin receptors in the effects of melatonin on BDNF and neuroprotection in mouse cerebellar neurons. *Journal of neural transmission.* 2008;115(11):1495-9.
168. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006;40(1):1-9.
169. Rondanelli M, Faliva MA, Perna S, Antonello N. Update on the role of melatonin in the prevention of cancer tumorigenesis and in the management of cancer correlates, such as sleep-wake and mood disturbances: review and remarks. *Aging Clin Exp Res.* 2013;25(5):499-510.
170. Chen R, Cros D, Curra A, Di Lazzaro V, Lefaucheur JP, Magistris MR, et al. The clinical diagnostic utility of transcranial magnetic stimulation: report of an IFCN committee. *Clin Neurophysiol.* 2008;119:504-32.
171. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol.* 2009;120:2008-39.
172. Radhu N, de Jesus DR, Ravindran LN, Zanjani A, Fitzgerald PB, Daskalakis ZJ. A meta-analysis of cortical inhibition and excitability using transcranial magnetic stimulation in psychiatric disorders. *Clin Neurophysiol.* 2013;124:1309-20.
173. Hallett M. Transcranial magnetic stimulation and the human brain. *Nature.* 2000;406(6792):147-50.
174. Wassermann EM, Lisanby SH. Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: a review. *Clin Neurophysiol.* 2001;112(8):1367-77.
175. Tzabazis A, Aparici CM, Rowbotham MC, Schneider MB, Etkin A, Yeomans DC. Shaped magnetic field pulses by multi-coil repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) differentially modulate anterior cingulate cortex responses and pain in volunteers and fibromyalgia patients. *Molecular pain.* 2013;9(1):33.
176. Terao Y, Ugawa Y. Basic mechanisms of TMS. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society.* 2002;19(4):322-43.
177. Di Lazzaro V, Oliviero A, Pilato F, Saturno E, Dileone M, Mazzone P, et al. The physiological basis of transcranial motor cortex stimulation in conscious humans. *Clin Neurophysiol.* 2004;115(2):255-66.

178. Tranchina D, Nicholson C. A model for the polarization of neurons by extrinsically applied electric fields. *Biophysical journal*. 1986;50(6):1139-56.
179. Amassian VE, Eberle L, Maccabee PJ, Cracco RQ. Modelling magnetic coil excitation of human cerebral cortex with a peripheral nerve immersed in a brain-shaped volume conductor: the significance of fiber bending in excitation. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1992;85(5):291-301.
180. Rotem A, Moses E. Magnetic stimulation of curved nerves. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2006;53(3):414-20.
181. Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Oliviero A, Ziemann U. The effects of motor cortex rTMS on corticospinal descending activity. *Clin Neurophysiol*. 2010;121(4):464-73.
182. Di Lazzaro V, Ziemann U, Lemon RN. State of the art: Physiology of transcranial motor cortex stimulation. *Brain Stimul*. 2008;1(4):345-62.
183. Peterchev AV, Wagner TA, Miranda PC, Nitsche MA, Paulus W, Lisanby SH, et al. Fundamentals of transcranial electric and magnetic stimulation dose: definition, selection, and reporting practices. *Brain Stimul*. 2012;5(4):435-53.
184. Valero-Cabré A, Pascual-Leone A, Coubard OA. [Transcranial magnetic stimulation (TMS) in basic and clinical neuroscience research]. *Rev Neurol (Paris)*. 2011;167(4):291-316.
185. Johnson MD, Lim HH, Netoff TL, Connolly AT, Johnson N, Roy A, et al. Neuromodulation for brain disorders: challenges and opportunities. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2013;60:610-24.
186. Paulus W, Classen J, Cohen LG, Large CH, Di Lazzaro V, Nitsche M, et al. State of the art: Pharmacologic effects on cortical excitability measures tested by transcranial magnetic stimulation. *Brain Stimul*. 2008;1(3):151-63.
187. Rossini PM, Barker AT, Berardelli A, Caramia MD, Caruso G, Cracco RQ, et al. Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1994;91(2):79-92.
188. Rothwell JC, Hallett M, Berardelli A, Eisen A, Rossini P, Paulus W. Magnetic stimulation: motor evoked potentials. *The International Federation of Clinical Neurophysiology*. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*. 1999;52:97-103.
189. Kobayashi M, Pascual-Leone A. Transcranial magnetic stimulation in neurology. *Lancet Neurol*. 2003;2(3):145-56.
190. Chen R, Cros D, Curra A, Di Lazzaro V, Lefaucheur JP, Magistris MR, et al. The clinical diagnostic utility of transcranial magnetic stimulation: report of an IFCN committee. *Clin Neurophysiol*. 2008;119(3):504-32.
191. Ziemann U, Rothwell JC, Ridding MC. Interaction between intracortical inhibition and facilitation in human motor cortex. *J Physiol*. 1996;496 ( Pt 3):873-81.
192. Di Lazzaro V, Oliviero A, Pilato F, Saturno E, Dileone M, Tonali PA. Motor cortex hyperexcitability to transcranial magnetic stimulation in Alzheimer's disease: evidence of impaired glutamatergic neurotransmission? *Ann Neurol*. 2003;53(6):824; author reply -5.

193. Ziemann U, Lönnecker S, Steinhoff BJ, Paulus W. The effect of lorazepam on the motor cortical excitability in man. *Exp Brain Res.* 1996;109(1):127-35.
194. Ziemann U. TMS and drugs. *Clin Neurophysiol.* 2004;115(8):1717-29.
195. Hess G, Aizenman CD, Donoghue JP. Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J Neurophysiol.* 1996;75(5):1765-78.
196. Ziemann U. TMS induced plasticity in human cortex. *Rev Neurosci.* 2004;15(4):253-66.
197. Rösler KM, Roth DM, Magistris MR. Trial-to-trial size variability of motor-evoked potentials. A study using the triple stimulation technique. *Exp Brain Res.* 2008;187(1):51-9.
198. Cantello R, Gianelli M, Civardi C, Mutani R. Magnetic brain stimulation: the silent period after the motor evoked potential. *Neurology.* 1992;42(10):1951-9.
199. Wassermann EM, Pascual-Leone A, Valls-Sole J, Toro C, Cohen LG, Hallett M. Topography of the inhibitory and excitatory responses to transcranial magnetic stimulation in a hand muscle. *Electroencephalography and clinical neurophysiology.* 1993;89(6):424-33.
200. Roick H, von Giesen HJ, Benecke R. On the origin of the postexcitatory inhibition seen after transcranial magnetic brain stimulation in awake human subjects. *Exp Brain Res.* 1993;94(3):489-98.
201. Siebner HR, Willoch F, Peller M, Auer C, Boecker H, Conrad B, et al. Imaging brain activation induced by long trains of repetitive transcranial magnetic stimulation. *Neuroreport.* 1998;9(5):943-8.
202. Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, et al. Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol.* 1993;471:501-19.
203. Sanger TD, Garg RR, Chen R. Interactions between two different inhibitory systems in the human motor cortex. *J Physiol.* 2001;530(Pt 2):307-17.
204. Di Lazzaro V, Oliviero A, Meglio M, Cioni B, Tamburrini G, Tonali P, et al. Direct demonstration of the effect of lorazepam on the excitability of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol.* 2000;111(5):794-9.
205. Ziemann U, Bruns D, Paulus W. Enhancement of human motor cortex inhibition by the dopamine receptor agonist pergolide: evidence from transcranial magnetic stimulation. *Neurosci Lett.* 1996;208(3):187-90.
206. Schwenkreis P, Witscher K, Janssen F, Addo A, Dertwinkel R, Zenz M, et al. Influence of the N-methyl-D-aspartate antagonist memantine on human motor cortex excitability. *Neurosci Lett.* 1999;270(3):137-40.
207. Muller PA, Pascual-Leone A, Rotenberg A. Safety and tolerability of repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with pathologic positive sensory phenomena: a review of literature. *Brain Stimul.* 2012;5(3):320-9.e27.
208. Badawy RA, Loetscher T, Macdonell RA, Brodtmann A. Cortical excitability and neurology: insights into the pathophysiology. *Funct Neurol.* 2012;27(3):131-45.





## **5 ARTIGOS ORIGINAIS EM INGLÊS**

Artigo 1: **Putative neural substrate for the relationship between BDNF levels and acute experimental pain response in healthy males**

Submetido ao *Neuroscience Letters*.

Artigo 2: **Homeostatic metaplasticity modulates the effects of melatonin on acute experimental pain: A non-invasive brain stimulation study**

Submetido ao *BMC Neuroscience*.

**Putative neural substrate for the relationship between BDNF levels and acute experimental pain response in healthy males**

Nadia Regina Jardim da Silva MD, PhD,<sup>3</sup> Alicia Deitos PharmD, MSH<sup>3</sup> Luciana Cadore Stefani MD, PhD<sup>3,4,6</sup>; Gabriela Laste PhD<sup>3,4</sup>, Jairo Alberto Dussán-Sarria MD<sup>3</sup>, Iraci L.S.Torres PharmD, PhD<sup>2,3,4</sup>; Felipe Fregni MD, PhD<sup>5</sup>; Wolnei Caumo MD, PhD<sup>1,2,3,4</sup>

**Authors and Affiliations**

<sup>1</sup>*Pain and Palliative Care Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).*

<sup>2</sup>*Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brazil.*

<sup>3</sup>*Post Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, UFRGS.*

<sup>4</sup>*Laboratory of Pain & Neuromodulation at HCPA/UFRGS.*

<sup>5</sup>*Harvard Medical School, Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Spaulding Neuromodulation Center, Boston, Massachusetts, USA.*

<sup>6</sup>*Anesthesia and Perioperative Care at HCPA, Brazil.*

**Corresponding Author:**

Name: Wolnei Caumo

Laboratory of Pain & Neuromodulation

Institution: Hospital de Clínicas de Porto Alegre at UFRGS

Mailing address: Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90035-003 Bairro Rio Branco - Porto Alegre, RS.

Phone: (55) 51- 3359.8083; Fax: (55) 51- 3359.8083

**Email:** caumo@cpovo.net

**DISCLOSURE STATEMENT**

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## ABSTRACT

Although the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been intensively investigated in animal models, its correlation with human behavior and cortical plasticity are less understood. We therefore recruited 20 healthy male volunteers (19-40 years old) to determine the relationship between BDNF serum levels and acute experimental pain response during quantitative sensory testing. We also aimed to study neural substrates of this relationship by assessing transcranial magnetic stimulation (TMS)-indexed cortical excitability and descending inhibitory response via Conditioned Pain Modulation (CPM). The heat pain threshold (HPT) in Celsius degrees ( $^{\circ}\text{C}$ ) was inversely correlated with the serum BDNF (Beta=-0.09,  $P=0.03$ ), and the Intracortical Facilitation (ICF) expressed as the ratio ICF/MEP (Beta=-1.11,  $P=0.01$ ); indicating that lower experimental pain thresholds are associated with a higher serum BDNF and ICF. Also, BDNF levels are inversely correlated with the efficiency of the descending pain inhibitory system (as indexed by CPM, Beta=-1.11,  $P=0.04$ ), indicating that higher BDNF was associated with less pain inhibition by noxious heterotopic stimulation. These findings support the existence of an association between serum neuroplasticity mediators, cortical excitability patterns, and its response to acute experimental pain in healthy males. These findings further support the existence of a BDNF role in the pain modulation process, which is possibly involved with the descending pain inhibitory system.

**Key words:** TMS; CPM; pain threshold; BDNF.

## INTRODUCTION

Pain-induced neuronal plasticity involves multiple molecular interactions [1, 2], that notably include the widespread neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) which is capable of strengthening excitatory (glutamatergic) synapses and weakening inhibitory (GABAergic) synapses[3]. BDNF production in the central nervous system (CNS) contributes to ~80% of the circulating peripheral levels [4], which are associated with psychophysical assessments that depend on sexual hormones [5, 6]. Given the important role of BDNF in modulating synaptic plasticity, this neurotrophic factor has been used as marker to index neuroplasticity. Indeed, BDNF levels have been shown to have different levels in patients with psychiatric diseases such as depression, anxiety and schizophrenia [7], and also have been shown to change after pharmacological and non-pharmacological interventions [8, 9].

In pain, BDNF has been extensively studied in animal models. Interestingly, it is still not clear whether BDNF in animal models of pain is associated with increased or decreased nociceptive effects [10]. Differences in terms of chronic and acute pain in animal models may explain these discrepancies. In humans, there is even less data to understand the role of BDNF in pain modulation. Therefore, we recruited healthy male volunteers to determine the relationship between BDNF serum levels and acute experimental pain response. We also aimed to study neural substrates of this relationship by assessing transcranial magnetic stimulation (TMS)-indexed cortical excitability, and descending inhibitory response via the Conditioned Pain Modulation (CPM) during a heterotopic noxious stimulation (CPM-TASK). Given the important role of the primary motor cortex as a modulator of the pain system [11, 12], we would obtain important insights into neural mechanisms associated with the role of BDNF in the modulation of the pain response.

## METHODS

The methods and results sections are reported according to STROBE guidelines [13]. All volunteers provided written informed consent prior to their participation in this study, and the protocol was approved by

the Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Institutional Review Board IRB), according to the Declaration of Helsinki (Resolution 466/2012 of National Health Council).

### *Study Design, Settings and Participants*

Volunteers were recruited by postings in universities, the Internet and public places in the Porto Alegre area. Subjects were considered eligible if they were male, right-handed and between 19 and 40 years old. Those with current acute or chronic pain conditions, the use of analgesics in the past week, a rheumatologic disease, a clinically significant or unstable medical or psychiatric disorder, a history of alcohol or substance abuse in the past six months, a neuropsychiatric comorbidity or use of central nervous system-affecting medications were excluded. Also, those with any contraindications for TMS were also excluded [14].

The volunteers were asked to abstain from alcohol and coffee consumption in the 24 hrs preceding the test, and from drinking and eating 6 hrs before starting the evaluation. After consenting, the volunteers started the evaluation undergoing a basic clinical assessment, in which they answered the questionnaires, and a blood sample was collected. Then, the cortical excitability parameters were determined, and after that the psychophysical pain testing (Quantitative Sensory Testing) was performed.

### *Sample Size calculation*

Considering that BDNF has been associated to pain threshold with an estimated Pearson correlation coefficient of 0.62 [34], tolerating an alpha error of 0.05 and power 0.90 a total sample size of 19 was estimated. Because we further recruited 20 subjects, a *Post hoc* sample size calculation showed that this sample would detect an effect size ( $f^2$ ) for correlations of 0.42 given power of 82% and an alpha of 5%, allowing for two predictors [15].

### *Dependent variables*

The psychophysical assessments included the heat pain threshold (HPT), defined as the minimal amount of temperature that evokes pain, and the pain reduction during a standard thermal stimulus while simultaneously receiving a heterotopic noxious stimulation (CPM-TASK).

### *Quantitative Sensory Testing*

The method of limits with a computer Peltier-based device thermode (30x30 mm) was used to assess HPT [16]. The thermode was attached to the skin on the ventral aspect of the mid-forearm, and the temperature was increased at a rate of 1°C/sec, from 30°C to a maximum of 52°C, which primarily stimulates C-nociceptive afferents [17]. Participants were asked to press a button as soon as the sensation of heat began at the heat detection threshold (HDT) and as soon as the stimulation became painful (HPT). An average of three assessments for each threshold test was considered (interstimulus interval of 40 sec, each one with a slight repositioning of the thermode to avoid the sensitization of skin receptors) [18]. The same equipment was used to determine the maximum tolerated temperature, when volunteers pressed a button to stop temperature to increase. If 52°C was achieved before reporting pain, the device cooled-down automatically and the pain threshold was considered unknown. Next, to determine the temperature that was to be used during the CPM-TASK, subjects were asked to stop the temperature rise when experiencing a pain intensity of 6 (HPT60, in °C) in the Numerical Rating Scale (from 0 to 10) (NRS<sub>0-10</sub>). Then, that same temperature was applied and subjects were asked to rate their pain on the NRS<sub>0-10</sub> (NRS<sub>0-10</sub> before CPM-TASK).

The CPM-TASK activates the diffuse noxious inhibitory control-like effect (CPM) because it is a strong nociceptive stimulus over a lengthy span of time [19] and a large body surface area [18]. The CPM-TASK consisted of immersing the non-dominant hand in cold water (zero to 1°C) for 1 min while simultaneously applying the temperature HPT60 over the right forearm (dominant forearm). Subjects were asked to rate their pain in the dominant forearm again (NRS<sub>0-10</sub> during CPM-TASK). The CPM-TASK was calculated subtracting the NRS<sub>0-10</sub> “before” to “during” CPM-TASK (CPM-TASK=during - before) [20].

### *Independent Variables*



The cortical excitability parameters assessed by transcranial magnetic stimulation (TMS) indexed intracortical facilitation (ICF), short intracortical inhibition (SICI), cortical silent period (CSP) and motor-evoked potential (MEP). TMS of the left motor cortex (M1) was performed using a MagPro X100 stimulator (MagVenture Company, Lucernemarken, Denmark) through a figure-eight coil (MagVenture Company). The coil was placed tangentially to the scalp over the left M1, with an angle of 45° to the sagittal line to identify the motor “hot spot”. The “hot spot” is the coil position in which the lowest Motor Threshold (MT) intensity was required to elicit an acceptable response in at least 50% of the evoked potentials of the resting First Dorsal Interosseus (FDI) [21]. The “hot spot” was marked with a soft-tipped pen to ensure a constant placement of the coil throughout the experiment. First, the motor threshold (MT) was determined, which was defined as the lowest stimulus intensity sufficient to elicit a response of at least five of 10 evoked potentials with minimum amplitude of 50  $\mu$ V in the resting FDI [21]. Then, single-pulse measures, including the MEP and CSP, were recorded at an intensity of 130% of the MT. The MEP value was the mean of 10 consecutive trials with a minimum amplitude peak-to-peak of 1 mV. To assess the CSP, subjects were instructed to perform isometric contractions of the FDI with approximately 10% of the maximal force. The CSP was considered the transient silence in isometric voluntary EMG activity preceded by the MEP [21]. A mean of 10 consecutive trials was considered for each subject. To assess the SICI (interstimulus interval of 2 ms) and the ICF (interstimulus interval of 12 ms), the first sub-threshold stimulus was set at 80% of the MT, and the second supra-threshold stimulus was set at 130%. Thirty recordings (10 for each SICI, ICF, and test stimuli) were made in random order with an interval of 8 sec between each pulse. Paired-pulse measures were analyzed calculating their individual indexes (Mean SICI/Mean test stimuli; Mean ICF/Mean of test stimulus). The same MT value was used to elicit the MEP, CSP, SICI and ICF. To reduce the variability, the same researcher performed all TMS assessments.

The serum BDNF concentration was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Chemicon/Millipore, catalog no. CYT306, lower detection limit of the kit=7.8 pg/mL) according to the manufacturers' instructions. Samples were gathered in plastic tubes and centrifuged for 10 min at 4500 rpm and 4°C. The serum was frozen at -80°C until assays were performed.

Pain catastrophizing thinking was assessed using the validated Brazilian-Pain Catastrophizing Scale (B-PCS) [22]. Depression symptoms were screened using the Beck Depression Inventory (BDI) [23]. Demographic data were gathered using a standardized questionnaire. Anxiety was measured with the State-Trait Anxiety Inventory (STAI), adapted to Brazilian Portuguese [24]. State-anxiety (a situation-driven transient anxiety) and trait-anxiety (stable personality disposition reflecting general level of fearfulness) were evaluated. Higher scores denote higher levels of anxiety.

### *Statistical Analyses*

Conventional descriptive statistics were used to summarize the main features of the sample. The normality was tested using skewness-kurtosis tests. After verifying the corresponding assumptions, a linear regression analysis model using the stepwise method was used [25] to identify the possible parameters of cortical excitability parameters (MEP, ICF, ICI, CSP) associated with the dependent variables (HPT and pain during CMP-TASK). The parameters of cortical excitability retained in the models were the ICF and the MEP. Then, these parameters were included in the final multiple regression model that assessed the association between the main independent variable of interest, BDNF and the outcomes (HPT and CPM-TASK). The analyses were performed using SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL).

## **RESULTS**

Twenty-two participants were included, and the two participants reporting a BDI higher than 12 were excluded. Participants' clinical, psychophysical testing and cortical excitability characteristics are summarized in **Table 1**.

-----Insert table 1-----

In order to assess the neural correlates of BDNF and acute experimental pain response we fitted a multivariate linear regression model having as dependent variables the HPT and the CPM-TASK (dependent variables) and, as independent variables, the cortical excitability parameters (MEP, ICF) and BDNF (**Table**

2). This multivariate analysis showed that a BDNF was correlated to HPT ( $P=0.03$ ) and CPM-TASK ( $P=0.04$ ), and that the ICF was also associated to the HPT ( $P=0.01$ ). That is, those with lower HPT had higher BDNF and ICF, and that the efficiency of the corticospinal system was reduced for modulating the pain evoked by QST during CPM-TASK when the serum BDNF was higher.

The model revealed a significant relationship between the serum BDNF, ICF, CPM-TASK and pain measures during HPT ( $F_{4, 16} = 5.71$ ,  $P<0.005$ , Wilks'  $\lambda = 0.34$ , partial  $\eta^2 = 0.66$ ). The *pos-hoc* power calculation of this analysis was 0.90.

-----Insert table 2-----

## **DISCUSSION**

*This study confirms the notion that BDNF levels are associated with acute experimental pain responses; it also shows that this relationship is inverse, indicating that higher BDNF levels are associated with increased pain response. Furthermore this association is also correlated with ICF and with the CPM; suggesting that BDNF may index cortical neuroplasticity as well as subcortical circuits associated with descending inhibitory pain modulation. Taken together, these results suggest that BDNF levels may index cortical circuits plasticity and their effects on nociceptive pathways.*

Although the underlying mechanisms of BDNF modulation in nociception are not completely clear, some *in vitro* and *in vivo* studies of neuronal networks provide relevant insights. An *in vitro* study showed that neuronal activity induced BDNF production, favoring the activity of inhibitory networks, whereas reduced neuronal activity was accompanied by decreased BDNF production and increased excitability [26], which possibly involves GABA<sub>A</sub> circuits [27] mediated at cortical rather than subcortical structures [28, 29].

The excitability assessments using TMS reflect not only cortical but also subcortical circuits as well. Depending on the parameters analyzed, it is possible to make the differentiation between intracortical vs. cortico-subcortical excitability modulation. The primary motor cortex, the main area of assessment for TMS excitability, seems to be a reliable neural target to assess pain-related cortical neuroplasticity. It has been

demonstrated that the stimulation of M1 reduces pain-related responses in the somatosensory cortex [30, 31], and it modulates intracortical inhibitory processes [28, 31, 32]. Additionally, the ICF has been shown as a robust measure of intracortical excitability as it indexes glutamatergic synaptic transmission [21, 33]. Although the underlying mechanism is not clear, several neurobiological processes may explain these findings, as follows. The ICF originates from excitatory postsynaptic potentials (PSPs) mainly mediated by glutamatergic NMDA receptors [34]. Pharmacological studies support such observation, as NMDA receptor antagonists (i.e. dextromethorphan) decrease ICF [35]. Likewise, GABA-A agonists like benzodiazepines (e.g. Lorazepam) and barbiturates decrease the ICF. On the other hand, GABA-B agonists (e.g. Baclofen) increase ICF [36]. It has been hypothesized and shown that an increase in subcortical pain-related activation leads to increased ICF and decreased ICI; likely reflecting a compensatory mechanism. Given this potential mechanism, it is possible that increased BDNF levels reflecting increased M1 plasticity would thus decrease pain processing and also homeostatically decrease activation of M1 as reflected by decreased ICF.

This mechanism addresses the importance of considering the *in vivo* function of the serum BDNF because it appears to have a crucial role in the homeostatic regulation of cortical excitability by selectively modifying excitation and inhibition within these networks [26]. However, our cross-sectional study design does not enable us to determine the temporal relationship between the increases of BDNF secretion, the glutamatergic activity and the reduced pain threshold.

Interestingly we showed that BDNF levels are associated with CPM response, indicating that neuroplasticity associated with integration of descending inhibitory response is likely to be reflected by BDNF levels. In our sample, the noxious heterotopic stimulation reduced the pain during CPM-TASK by 43.53% [from 4.64 (1.27) to 2.02 (0.78)] (**Table 1**), which is in line with previous literature reports [37]. Although the descending pain inhibition underlying the CPM response is based on a spinal-bulbar-spinal loop [38, 39] involving serotonergic and noradrenergic neurotransmission[40-42], it also involves the encephalic endogenous analgesia system [43]. This finding provides evidence of the relationship between the BDNF and the descendent pain modulator system, which (among other psychophysical factors) might predict the efficacy of pain treatments[40[9]].

Overall, these findings suggest that in healthy subjects, BDNF serum levels are mainly correlated with pain processing at the cortical level, corroborating the idea of BDNF's role modifying the excitatory/inhibitory balance in the CNS and amplifying the pain response [44, 45]. These findings might have important clinical implications to advance in the lab-to-clinic perusal of pain modulation and treatment. Although we aimed to understand further the neural basis of the relationship between BDNF and pain modulation, the technique we used to assess cortical plasticity – TMS – although reliable, can only assess motor cortex excitability. Further studies should also use other neurophysiological tools.

These findings support that serum neuroplasticity mediators have an association with the cortical excitability pattern and its response to acute experimental pain in healthy males, clinically supporting the existence of a role in the pain modulation process which is possibly involved in the descending pain inhibitory system.

## **ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURE**

**The present research was supported by the following Brazilian agencies:**

**Research grant:** National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Dr. I.L.S. Torres and Dr. W. Caumo, JA Dussan-Sarria).

Post-doctoral grant: Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES - PNPd/CAPES.

**Brazilian agencies:** The Foundation of Support of Research at Rio Grande do Sul (FAPERGS), National Council for Scientific and Technological Development – CNPq and Committee for the Development of Higher Education Personnel (Gabriela Laste).

## REFERENCES

1. Latremoliere A, Woolf CJ: **Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity.** *J Pain* 2009, **10**(9):895-926.
2. Woolf CJ, Ma Q: **Nociceptors--noxious stimulus detectors.** *Neuron* 2007, **55**(3):353-364.
3. Binder DK, Scharfman HE: **Brain-derived neurotrophic factor.** *Growth Factors* 2004, **22**(3):123-131.
4. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H: **Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise.** *Exp Physiol* 2009, **94**(10):1062-1069.
5. Racine M, Tousignant-Laflamme Y, Kloda LA, Dion D, Dupuis G, Choiniere M: **A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and experimental pain perception - part 1: are there really differences between women and men?** *Pain* 2012, **153**(3):602-618.
6. Stefani LC, Torres IL, de Souza IC, Rozisky JR, Fregni F, Caumo W: **BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects.** *Neurosci Lett* 2012, **514**(1):62-66.
7. Brunoni AR, Bensenor IM, Alves TC: **Therapeutic interventions for vascular depression: a systematic review.** *Revista brasileira de psiquiatria* 2011, **33**(4):400-409.
8. Brunoni AR, Lopes M, Fregni F: **A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2008, **11**(8):1169-1180.
9. Caumo W, Dall'Agnol L, Deitos A, Torres IL, Brietzke A, Laste G, Souza A, Vieira JL, Fregni F: **Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) increases the corticospinal inhibition and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in chronic myofascial pain syndrome (MPS): an explanatory double-blinded, randomized, sham-controlled trial** In, In press. edn. *The Journal of Pain* 2014.
10. Vanelderen P, Rouwette T, Kozicz T, Roubos E, Van Zundert J, Heylen R, Vissers K: **The role of brain-derived neurotrophic factor in different animal models of neuropathic pain.** *Eur J Pain* 2010, **14**(5):473.e471-479.
11. Volz MS, Medeiros LF, Tarragô MaG, Vidor LP, Dall'Agnol L, Deitos A, Brietzke A, Rozisky JR, Rispolli B, Torres IL *et al*: **The relationship between cortical excitability and pain catastrophizing in myofascial pain.** *J Pain* 2013, **14**(10):1140-1147.
12. Reidler JS, Mendonca ME, Santana MB, Wang X, Lenkinski R, Motta AF, Marchand S, Latif L, Fregni F: **Effects of motor cortex modulation and descending inhibitory systems on pain thresholds in healthy subjects.** *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 2012, **13**(5):450-458.
13. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP: **The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies.** *Journal of Clinical Epidemiology* 2008, **61**(4):344-349.
14. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A, Safety of TMSCG: **Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research.** *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 2009, **120**(12):2008-2039.
15. Preacher KJ, Kelley K: **Effect size measures for mediation models: quantitative strategies for communicating indirect effects.** *Psychol Methods* 2011, **16**(2):93-115.
16. Schestatsky P, Stefani LC, Sanches PR, Silva Junior DP, Torres IL, Dall'Agnol L, Balbinot LF, Caumo W: **Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies.** *Arquivos de neuro-psiquiatria* 2011, **69**(6):943-948.
17. Backonja MM, Attal N, Baron R, Bouhassira D, Drangholt M, Dyck PJ, Edwards RR, Freeman R, Gracely R, Haanpaa MH *et al*: **Value of quantitative sensory testing in neurological and pain**

- disorders: NeuPSIG consensus.** *Pain* 2013, **154**(9):1807-1819.
18. Schestatsky P, Valls-Sole J, Costa J, Leon L, Veciana M, Chaves ML: **Skin autonomic reactivity to thermoalgesic stimuli.** *Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society* 2007, **17**(6):349-355.
  19. Marchand S, Arsenault P: **Spatial summation for pain perception: interaction of inhibitory and excitatory mechanisms.** *Pain* 2002, **95**(3):201-206.
  20. Tesarz J, Gerhardt A, Schommer K, Treede RD, Eich W: **Alterations in endogenous pain modulation in endurance athletes: an experimental study using quantitative sensory testing and the cold-pressor task.** *Pain* 2013, **154**(7):1022-1029.
  21. Paulus W, Classen J, Cohen LG, Large CH, Di Lazzaro V, Nitsche M, Pascual-Leone A, Rosenow F, Rothwell JC, Ziemann U: **State of the art: Pharmacologic effects on cortical excitability measures tested by transcranial magnetic stimulation.** *Brain Stimul* 2008, **1**(3):151-163.
  22. Sehn F, Chachamovich E, Vidor LP, Dall-Agnol L, de Souza IC, Torres IL, Fregni F, Caumo W: **Cross-cultural adaptation and validation of the Brazilian Portuguese version of the pain catastrophizing scale.** *Pain medicine* 2012, **13**(11):1425-1435.
  23. Gomes-Oliveira MH, Gorenstein C, Lotufo Neto F, Andrade LH, Wang YP: **Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample.** *Rev Bras Psiquiatr* 2012, **34**(4):389-394.
  24. Kaipper MB, Chachamovich E, Hidalgo MP, Torres IL, Caumo W: **Evaluation of the structure of Brazilian State-Trait Anxiety Inventory using a Rasch psychometric approach.** *Journal of psychosomatic research* 2010, **68**(3):223-233.
  25. Katz MH: **Multivariable Analysis: a practical guide for clinicians.** New York: Cambridge University Press; 1999.
  26. Rutherford LC, Nelson SB, Turrigiano GG: **BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses.** *Neuron* 1998, **21**(3):521-530.
  27. Ziemann U, Muellbacher W, Hallett M, Cohen LG: **Modulation of practice-dependent plasticity in human motor cortex.** *Brain* 2001, **124**(Pt 6):1171-1181.
  28. Di Lazzaro V, Restuccia D, Oliviero A, Profice P, Ferrara L, Insola A, Mazzone P, Tonali P, Rothwell JC: **Magnetic transcranial stimulation at intensities below active motor threshold activates intracortical inhibitory circuits.** *Exp Brain Res* 1998, **119**(2):265-268.
  29. Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden CD: **Corticocortical inhibition in human motor cortex.** *J Physiol* 1993, **471**:501-519.
  30. Jiang Q, Rice KC, deCosta B, Porreca F: **Effects of oxymorphone on morphine induced-antinociception in mice and rats.** *NIDA Res Monogr* 1990, **105**:384-385.
  31. Xie YF, Huo FQ, Tang JS: **Cerebral cortex modulation of pain.** *Acta Pharmacol Sin* 2009, **30**(1):31-41.
  32. Lefaucheur JP, Hatem S, Nineb A, Ménard-Lefaucheur I, Wendling S, Keravel Y, Nguyen JP: **Somatotopic organization of the analgesic effects of motor cortex rTMS in neuropathic pain.** *Neurology December* 2006, **67**(11):1998-2004.
  33. Schwenkreis P, Liepert J, Witscher K, Fischer W, Weiller C, Malin JP, Tegenthoff M: **Riluzole suppresses motor cortex facilitation in correlation to its plasma level. A study using transcranial magnetic stimulation.** *Exp Brain Res* 2000, **135**(3):293-299.
  34. Nakamura H, Kitagawa H, Kawaguchi Y, Tsuji H: **Intracortical facilitation and inhibition after transcranial magnetic stimulation in conscious humans.** *The Journal of physiology* 1997, **498** ( Pt 3):817-823.
  35. Radhu N, Ravindran LN, Levinson AJ, Daskalakis ZJ: **Inhibition of the cortex using transcranial magnetic stimulation in psychiatric populations: current and future directions.** *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 2012, **37**(6):369-378.
  36. Ziemann U, Lonnecker S, Steinhoff BJ, Paulus W: **Effects of antiepileptic drugs on motor**

- cortex excitability in humans: a transcranial magnetic stimulation study.** *Annals of neurology* 1996, **40**(3):367-378.
37. Pud D, Golan Y, Pesta R: **Hand dominancy--a feature affecting sensitivity to pain.** *Neurosci Lett* 2009, **467**(3):237-240.
  38. Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM: **Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications.** *Pain* 1979, **6**(3):305-327.
  39. Willer JC, Le Bars D, De Broucker T: **Diffuse noxious inhibitory controls in man: involvement of an opioidergic link.** *Eur J Pharmacol* 1990, **182**(2):347-355.
  40. Chitour D, Dickenson AH, Le Bars D: **Pharmacological evidence for the involvement of serotonergic mechanisms in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC).** *Brain Res* 1982, **236**(2):329-337.
  41. Pedersen LH, Nielsen AN, Blackburn-Munro G: **Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain.** *Psychopharmacology (Berl)* 2005, **182**(4):551-561.
  42. Pertovaara A: **Noradrenergic pain modulation.** *Prog Neurobiol* 2006, **80**(2):53-83.
  43. Sprenger C, Bingel U, Buchel C: **Treating pain with pain: supraspinal mechanisms of endogenous analgesia elicited by heterotopic noxious conditioning stimulation.** *Pain* 2011, **152**(2):428-439.
  44. Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DL, Trivedi PM, Dassan P, French J, Shelton DB, McMahon SB, Thompson SW: **Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord.** *J Neurosci* 1999, **19**(12):5138-5148.
  45. Sommer C, Kress M: **Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia.** *Neurosci Lett* 2004, **361**(1-3):184-187.

**Table 1. Clinical, psychophysical testing and cortical excitability characteristics of the healthy male sample. Data are presented as mean (SD) or frequency (percentage) (n=20).**

† *t*-test,  $P < 0.001$

**Table 2. Multivariate regression analysis of cortical excitability, Brain-derived Neurotrophic Factor and Psychophysical pain tests (n=20).**

*Numerical Rating Scale (NRS<sub>0-10</sub>) during CPM-TASK. \*P < 0.05.*

†  $P < 0.05$ .



**Table 1. Clinical, psychophysical testing and cortical excitability characteristics of the healthy male sample. Data are presented as mean (SD) or frequency (percentage) (n=20).**

<b>Clinical Characteristics</b>	
Age (years)	25.52 (5.21)
Education (years)	16.33 (4.68)
Smoking (Yes)	2 (9.55%)
Social alcohol consumption – Less than once/week (Yes)	18 (85.7%)
State-anxiety	20.76 (4.26)
Trait-anxiety	16.80 (3.90)
Beck Depression Inventory score	4.76 (4.04)
Pain catastrophizing scale score (B-PCS)	8.1 (3.32)
B-PCS-rumination	3.33 (3.18)
B-PCS-magnification	2.10 (2.34)
B-PCS-helplessness	2.76 (3.89)
Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (ng/mL)	34.74 (10.92)
<b>Psychophysical pain testing</b>	
Heat detection threshold (HDT) (°C)	33.65 (1.62)
Heat pain threshold (HPT) (°C)	42.96 (3.90)
Heat pain threshold 60% (HPT60) (°C)	43.86 (3.11)

Maximal tolerated heat (°C)	48.87 (2.22)
NRS <sub>0-10</sub> before CPM-TASK	4.64 (1.27)
NRS <sub>0-10</sub> during CPM-TASK	2.02 (0.78)
CPM-TASK (during-before)	-2.62 (1.25)†
<b>Cortical excitability parameters</b>	
Resting motor threshold (rMT, in %)	39.71 (6.28)
Conditioning pulse intensity (80% of RMT)	39.52 (5.92)
MEP amplitude (mV)	1.76 (0.57)
Intra-cortical Facilitation (ICF) (ratio: ICF/MEP)	1.09 (0.29)
Short Intra-cortical Inhibition (SICI) (ratio: SICI/MEP)	0.24 (0.10)
Cortical silent period (ms)	61.44 (21.02)

† *t*-test, *P*<0.001

**Table 2. Multivariate regression analysis of cortical excitability, Brain-derived Neurotrophic Factor and Psychophysical pain tests (n=20).**

Dependent Variable	Type III Sum of Squares	Mean Square	F	<i>P</i>	Partial Eta Squared
Heat Pain threshold (°C)	8.12	8.12	6.70	0.02	0.32
CPM-TASK	7.22	7.22	7.95	0.01	0.36
Dependent Variable	$\beta$	SEM	T	<i>P</i>	Partial Eta Squared
<b>Heat Pain threshold (°C)</b>					
BDNF (ng/dl)	-0.09	0.03	-2.37	0.03†	0.21
Intracortical Facilitation (ratio: ICF/MEP)	-1.11	0.40	-2.74	0.01†	0.33
Motor-Evoked Potential (mV)	-0.81	0.87	-0.93	0.37	0.06
<b>CPM-TASK</b>					
BDNF (ng/dl)	-0.08	0.03	-2.21	0.04†	0.25
Intracortical Facilitation (ratio: ICF/MEP)	-0.15	0.48	-0.30	0.76	0.006
Motor-Evoked Potential (mV)	-0.76	1.03	-0.74	0.47	0.03

† $P < 0.05$ .

## **Homeostatic metaplasticity modulates the effects of melatonin on acute experimental pain: A non-invasive brain stimulation study**

Nádia Regina Jardim da Silva<sup>a</sup>, Gabriela Laste<sup>a</sup>, Alicia Deitos<sup>a</sup>, Luciana Cadore Stefani, MD,<sup>a</sup> Gustavo Cambraia-Canto<sup>a,b,c</sup>, Iraci L.S. Torres, PharmD, PhD<sup>a,b,c</sup>, Andre R Brunoni, MD, PhD, Felipe Fregni, MD, PhD<sup>e</sup>, Wolnei Caumo, MD, PhD<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Post-graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>b</sup>Anesthetist, Pain and Palliative Care Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Laboratory of Pain and Neuromodulation at UFRGS

<sup>c</sup>Associate Professor, Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brazil

<sup>e</sup>Associate Professor of Physical Medicine & Rehabilitation, Associate Professor of Neurology Harvard Medical School. Berenson-Allen Center for Noninvasive Brain Stimulation, Department of Neurology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA.

Service of Interdisciplinary Neuromodulation, Department and Institute of Psychiatry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Running title: Effects of melatonin and tDCS on pain

E-mail address of each author

Nádia Regina Jardim da Silva: [nadia.jardimsilva@gmail.com](mailto:nadia.jardimsilva@gmail.com); (UFRGS);

Gabriela Laste: [gabrielalaste@gmail.com](mailto:gabrielalaste@gmail.com); (UFRGS);

Alicia Deitos: [aliciadeitos@gmail.com](mailto:aliciadeitos@gmail.com); (UFRGS);

Gustavo Cambraia-Canto: [guscanto91@gmail.com](mailto:guscanto91@gmail.com); (UFRGS);

Luciana Stefani: [lustefani@terra.com.br](mailto:lustefani@terra.com.br); (UFRGS);

Iraci Torres: [iracitorres@gmail.com](mailto:iracitorres@gmail.com); (UFRGS);

Andre R Brunoni: [brunoni@usp.br](mailto:brunoni@usp.br); (São Paulo);

Felipe Fregni: [Fregni.Felipe@mgh.harvard.edu](mailto:Fregni.Felipe@mgh.harvard.edu); (Harvard Medical School);

Wolnei Caumo: [caumo@cpovo.net](mailto:caumo@cpovo.net). Responsible for maintaining the study records. ; (UFRGS).

\*Corresponding Author:

Wolnei Caumo MD, PhD

Laboratory of Pain and Neuromodulation

Hospital de Clínicas de Porto Alegre at UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003 Bairro Rio Branco - Porto Alegre – RS.

Phone: (55) 51- 3359.8083

Fax: (55) 51- 3359.8083

E-mail: [caumo@cpovo.net](mailto:caumo@cpovo.net)

**Background:** Transcranial direct current stimulation (tDCS) and melatonin can effectively treat pain. Given their potentially complementary mechanisms of action, their combination could have a synergistic effect. Thus, we tested the hypothesis that compared to the control condition and melatonin alone, tDCS combined with melatonin would have a greater effect on cortical excitability, and on the serum BDNF level. Furthermore, active-(a)+tDCS, it would have a greater pain modulatory effect, as assessed by quantitative sensory testing (QST) and by the pain level using the CPM-task. **Methods:** Healthy males (aged 18 to 40 years), in a blinded, placebo-controlled, crossover, clinical trial, were randomized into three groups: sublingual melatonin (0.25 mg/kg)+ a-tDCS, melatonin (0.25 mg/kg)+sham-(s)-tDCS, or sublingual placebo+sham-(s)-tDCS. Anodal stimulation (2 mA, 20 min) was applied over the primary motor cortex. **Results:** There was a significant difference in the heat pain threshold (°C) for melatonin+a-tDCS vs. placebo+s-tDCS (mean difference: 4.86, 95% confidence interval [CI]: 0.9 to 8.63) and melatonin+s-tDCS vs. placebo+s-tDCS (mean: 5.16, 95% CI: 0.84 to 8.36). There was no difference between melatonin+s-tDCS and melatonin+a-tDCS (mean difference: 0.29, 95% CI: -3.72 to 4.23). The melatonin+a-tDCS reduced significantly cortical excitability (assessed by MEP amplitude), while melatonin alone did not significantly affect cortical excitability, CPM task result, and serum BDNF level. **Conclusions:** The melatonin effectively reduced pain; however, its association with a-tDCS did not present an additional modulatory effect on pain. Melatonin effects did not seem to be mediated by cortical or spinal centers given the lack of results from the cortical excitability and descending pain control systems. These findings may have implications for improving the understanding of the neurophysiological mechanisms underlying new therapies that use hormone effects as a tool to treat pain.

**Keywords:** tDCS, TMS; CPM; pain threshold; melatonin; clinical trial.

## Introduction

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is capable of modulating pain systems. Several studies have shown that tDCS applied on the primary motor cortex (M1) and/or the prefrontal cortex (among others) shows clinically significant pain reduction [1–8], which has been associated to its cortical and subcortical modulation [9]. Nevertheless, these effects are variable and in some cases modest.

One strategy explored to improve tDCS effects involves its combination with pharmacological interventions [10], which has shown advantages such as the augmentation of its clinical effects, as was observed when combined with sertraline for major depression [11]. In pain, a case report of tDCS combined with D-cycloserine (an *N*-methyl-D-aspartate agonist) suggested its beneficial clinical effects [12].

Pre-clinical evidence have demonstrated melatonin effects on inflammatory [13] and neuropathic pain [14], and clinical trials in acute [15, 16] and chronic human pain [17–20]. Melatonin modulates pain systems such as the gamma-aminobutyric acid (GABAergic) and opioidergic systems [14, 21]. Its long-term use in endometriosis and fibromyalgia improves pain and decreases the levels of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [18, 22]. Furthermore, an experimental study showed that melatonin constrained the synaptic plasticity in a concentration-dependent manner ( $\geq 1\text{nM}$ ) [23], affecting networks that are not directly influenced by tDCS, such as subcortical pain circuits. The concurrent use of tDCS and conditioned pain modulation (CPM), which modulates the descending pain control systems, also show a synergistic effect [24]; thus, it is conceivable that such a combination would potentiate melatonin's effects on pain.

Plasticity in both excitatory and inhibitory circuits in the human motor cortex is regulated by homeostatic metaplasticity [25]. Therefore, in this explanatory trial, we tested the hypothesis that compared to the control condition and melatonin alone, tDCS combined with melatonin would have a greater effect on cortical excitability and on the serum BDNF level. Furthermore, the combined treatment would have a greater pain modulatory effect, as assessed by quantitative sensory testing (QST) and by the pain level during the CPM-task.

## **Material and methods**

### ***Study design, setting, and participants***

All volunteers provided written informed consent before participating in this study, and the protocol was approved by the Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Institutional Review Board IRB -13-0155) according to the Declaration of Helsinki. The volunteers were recruited from the general population by advertisement postings in the universities, on the internet, and in public places in the Porto Alegre area. Subjects were considered eligible to participate if they were male, right-handed, and between 19 and 40 years of age, and were screened for eligibility by phone. They answered a structured questionnaire that assessed the following variables: current acute or chronic pain conditions, use of analgesics in the past week, rheumatologic disease, clinically significant or unstable medical or psychiatric disorder, history of alcohol or substance abuse in the past 6 months, neuropsychiatric comorbidity, and use of psychotropic drugs. Patients responding affirmatively to any of these questions, and those with contraindications for TMS [26] were excluded. Subjects with Beck Depression Inventory (BDI) [27] scores higher than 13 were also excluded [28]. We include males only to exclude the influence of the cyclical fluctuation of gonadal steroids during the menstrual cycle on pain threshold and in the cortical excitability parameters [29, 30].

### ***Sample size***

The number of subjects in each study group was determined according to a previous study [31]. An a priori estimate indicated that in a superiority test from a cross-over design, a sample size of 50 divided into three groups with a 2:2:1 ratio achieves 80% power at a 5% significance level when the true difference between the means is  $2.5 \pm$  [mean SD  $3^{\circ}\text{C}$ ] for the heat pain threshold (HPT), the variation coefficient is 0.5, and the superiority margin is 0.22. The estimative was determined using the Power Analysis and Sample Size Software PASS version 13 (NCSS Statistical Software, Kaysville, Utah).

### ***Interventions***

The intervention involved one dose of sublingual melatonin (Sigma Chemical, Germany; batch-by-batch certificates of analysis for authenticating the purity of each batch provided): 0.25 mg/kg (maximum dose 20 mg), or placebo [32]. This solution was combined with 0.5 mL of 10% glucose solution. The placebo was an equivalent volume of 10% glucose solution.

tDCS is a therapeutic tool that is relatively inexpensive, non-invasive, painless, safe, its shape can be simulated (sham) and used efficiently for double-blinded studies. In this study, the anode was positioned over the left M1, and the cathode was positioned on the right supraorbital region. The rubber electrodes were inserted into a 35-cm<sup>2</sup> sponge (moistened with NaCl). The current was 2 mA, and the attachment of electrodes to the scalp was maintained by an elastic band [33]. The stimulation time was 20 min, consistent with previous studies [4, 34]. For the sham conditions, the device was turned off after 30 seg of starting the stimulation, which is a reliable blinding method [10], capable of mimicking the common adverse effects induced by the real stimulation [35]. The evaluators and patients were blinded to the treatment; contact between participants was avoided to enhance study blinding.

### ***Randomization***

The randomization was generated by a computer with a fixed block size of 5. Ten subjects (5 in each cohort) were randomly allocated to receive three sequences of treatment (melatonin+active(a)-tDCS, melatonin+sham(s)-tDCS, and s-tDCS+placebo). An allocation of 2:2:1 in favor of the melatonin treatment was used to maximize allocation to the experimental group and to improve the experimental power. Before the recruitment phase, opaque envelopes containing the protocol materials were prepared. Each opaque envelope was sealed and numbered sequentially. The opaque envelopes were opened by the nurse who administered the medications only after gaining subjects' informed and signed consent.

### ***Blinding***



To control for possible measurement bias participants were instructed to discuss all aspects related to their tDCS treatment only with their treating physician (rather than the research personnel). During the sham stimulation, subjects underwent tDCS experiences that were comparable to the active stimulation. Individuals other than those responsible for administering the interventions were blinded to the allocated interventions. Further, to assess whether blinding was effective, at the end of the experiment we asked participants to guess whether they had received active or sham tDCS and to rate their confidence on the answer on a Likert scale with five categories (no confidence to completely confident) [36].

### ***Outcomes***

The primary outcomes were the HPT as assessed by QST, and the excitability of the cortical spinal system indexed by motor-evoked potentials (MEPs). The secondary outcomes were pain reduction on the Numerical Pain Scale (NPS<sub>0-10</sub>) during the CPM task, and other cortical excitability parameters (intra-cortical facilitation [ICF], current silent period [CSP], intra-cortical inhibition [ICI]), and serum BDNF.

The method of limits with a computer Peltier-based device thermode (30×30 mm) was used to assess the HPT [37]. The thermode was attached to the skin on the ventral aspect of the mid-forearm, and the temperature was increased at a rate of 1°C/s, from 32°C to a maximum of 52°C, which primarily stimulates C-nociceptive afferents [38]. Participants were asked to press a button as soon as the sensation of heat began (heat detection threshold) and as soon as the stimulation became painful (HPT). Three assessments were performed with an inter-stimuli interval of 40 seconds [37]. Each subject's HPT was defined as the mean painful temperature of the three assessments. The position of the thermode was slightly altered between trials (although it remained on the left ventral forearm) to avoid either sensitization or response suppression of the cutaneous heat nociceptors [39]. The same equipment was used to determine the maximum tolerated temperature, where volunteers pressed a button to stop the temperature increase. If 52°C was achieved before reporting pain, the device cooled down automatically and the pain threshold was considered

unknown. The QST during cold water immersion (QST+CPM) was assessed raising the temperature to the point at which subjects felt 6/10 pain on the NPS ranging from 0 (no pain) to 10 (the worst pain imaginable) (HPT60). Subjects immersed their non-dominant hands into cold water (zero to one Celsius degree) for one minute. The QST procedure was performed after 30 seconds of the cold-water immersion. Differences between the average pain rating before (HPT0) and after (HPT1) cold-water immersion was defined as the CPM. This test was applied after measuring the cortical excitability parameters.

Cortical excitability parameters were registered through surface electromyography recordings, which were gathered at the contralateral right first dorsal interosseous muscle using Ag/AgCl electrodes. First, the resting motor threshold (RMT) was determined by obtaining five MEPs with a peak-to-peak amplitude of 50  $\mu$ V out of 10 consecutive trials using the minimum output of the TMS device. Next, 10 MEPs were recorded with an intensity of 130% of the individual RMT. The CSPs were assessed during muscle activity measured by a dynamometer to be approximately 20% of the maximal force. Accordingly, 10 CSPs were recorded using an intensity of 130% of the RMT. The short-interval ICI (SICI), using an inter-stimulus interval of 2 ms was also assessed. The first conditioning stimulus was set at 80% of the RMT, whereas the second test stimulus was set at 100% of the individual MEP intensity. The ICF was assessed with an inter-stimulus interval of 12 ms. Paired-pulse TMS was conducted in a randomized order for a total of 30 trials (10 for each SICI, ICF, and control stimuli). Off-line analyses included collecting the amplitudes of all MEP, SICI, and ICF values, as well as the duration of the CSPs. The corresponding units for these parameters are mV for MEP, ratio to MEP for SICI and ICF, and ms for CSP [40].

The serum BDNF concentration was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (Chemicon/Millipore, catalog n<sup>o</sup> CYT306). The serum was frozen at  $-80^{\circ}$  C until the assays were performed.

## ***2.7 Other instruments and assessments***

Pain catastrophizing thinking was assessed using the validated Brazilian-Pain Catastrophizing Scale [41]. Depression symptoms were screened using the BDI [27]. Demographic data were gathered using a

standardized questionnaire. Anxiety was measured with the State-Trait Anxiety Inventory, adapted to Brazilian Portuguese [42]. The clinical assessment of sedation was determined by simultaneous recording using a visual analogue scale (VAS<sub>0-10</sub>) ranging from zero (sleepiness) to 10 (completely awake). To assess safety, we used the Systematic Assessment for Treatment with tDCS questionnaire based on previously reported adverse events [10].

## **2.8 Statistical analyses**

The differences among the sequence cohort were examined with the analysis of variance (ANOVA) for parametric variables, and categorical outcomes were examined by chi-square or Fisher's tests.

The results were evaluated using the absolute mean variation for HPT of delta values (post-treatment minus pre-treatment). We analyzed the data using a mixed ANOVA model in which the independent variables were the cohort (time), treatment (placebo+s-tDCS, melatonin+s-tDCS, and melatonin+a-tDCS), the interaction term time vs. the treatment group, and subject identification.

The results were evaluated using the absolute mean variation for MEPs of the percentage of variation  $[(\text{post-treatment} - \text{pre-treatment})/\text{post-treatment}] \times 100$ . The HPT was adjusted using the VAS<sub>0-10</sub> for sleepiness. All analyses were performed with two-tailed tests at the 5% significance level. Analyses were conducted in the intention-to-treat sample according to the last observation carried forward through the time points. Missing data were considered to be at random. The analyses were performed with SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL).

## **Results**

### ***Subject characteristics***

Twenty healthy subjects were randomized, with the ratio of 2:2:1 to the three interventions, in three trails sessions to participate in the three sequences of treatment (Figure 1). The demographic and psychological characteristics of the subjects according to the sequence allocation were comparable and are

shown in Table 1. There were two dropouts: one subject had to discontinue the experiment because of personal problems, and the other because of lack of time to visit the center. There was no carry over effect, tested by comparison of pre-treatment assessments ( $P > 0.05$ ). Although participants correctly guessed their intervention in both the melatonin and tDCS groups, when only individuals who were certain of their assigned intervention group were considered, only melatonin but not tDCS was guessed correctly. A maximum of 23% of the subjects in each group correctly guessed the active-tDCS condition; the level of confidence in the intervention was moderate to high in more than 75% of the individuals in all groups, and the percentages of answers between groups, for each item were similar without statistically significant differences ( $P > 0.05$ , for both measures).

The incidence of reported side effects presented a similar distribution between groups. Headache, neck and scalp pain, skin redness, mood changes, and difficulties in concentration were reported by <15% of subjects. Burning and itching were reported by more than 25% of the subjects. Tingling was the most common side effect reported, with an incidence higher than 30%. The scores on the VAS<sub>0-10</sub> for sleepiness showed that placebo induced more sleepiness than the active arms (melatonin+a-tDCS  $5.62 \pm 1.31$ ; melatonin+s-tDCS  $5.93 \pm 1.43$ ; placebo+s-tDCS groups  $9.62 \pm 0.52$ ;  $P < 0.01$  for each comparison vs. placebo+s-tDCS), although there was no difference between the two active tDCS groups ( $P = 0.9$ ). The VAS<sub>0-10</sub> scores for sleepiness vs. group comparison did not demonstrate a significant interaction [ $F(2, 46) = 0.18$ ;  $P = 0.84$ ]. Additionally, there was no statistically significant effect of sleepiness score on HPT ( $\beta = 0.31$ ,  $t = 1.16$ ; 95% confidence interval [CI]:  $-0.23$  to  $0.85$ ;  $P = 0.25$ ).

***Treatment effects on the HPT (primary outcome) and on the descending modulatory system (secondary outcome)***

In the incomplete factorial analysis, there were two factors: (a-tDCS and s-tDCS) and melatonin (real or placebo). The analysis showed no significant interaction between tDCS and melatonin on HPT [ $F(2, 46) =$

0.3;  $P = 0.95$ ], but a significant main effect for treatment was observed ( $F=(2, 46)=3.94$ ;  $P = 0.02$ ]; (Table 2). The differences mean in the HPT tests are presented in (Figure 2).

The function of the descending modulatory system was assessed using the CPM task. Although all the interventions improved the pain reduction during the CPM task, there were no differences in their effectiveness between them ( $P > 0.05$ ). The reduction in pain scores on the NPS0-10 during the CPM task was 48.41% (HPT0=5.04±1.06; HPT1=2.60±1.27) in the melatonin+active-tDCS group, 37.88% (HPT0=4.25±1.37; HPT1=2.64±1.55) in the melatonin+sham-tDCS group, and 33.74% (HPT0=4.83±1.06; HPT1=3.2±1.42) in the placebo+sham-tDCS group. These results reveal that the interventions did not change the descending modulatory system as assessed by the CPM task.

***Effect on the neurophysiological outcomes, as indicated by the TMS cortical excitability parameters: MEPs (primary), ICI, ICF, CSP, and BDNF (secondary)***

Similar analyses showed significant main effects of the intervention group for MEPs [ $F(2, 46)=11.55$ ;  $P=0.03$ ]. There was no significant difference in MEP amplitude between the treatment group melatonin+a-tDCS and the melatonin+s-tDCS group (-16.58%±19.1 vs. -1.36%±8.73.91; mean difference: -17.66%, 95% CI: -42.44 to 7.12;  $P = 0.24$ ). However, there was a significant difference in MEP amplitude between the treatment group melatonin+a-tDCS and the placebo+s-tDCS group (-16.58%±19.1 vs. 3.61%±10.48; mean difference: -20.37%, 95% CI: -39.68 to -1.2;  $P = 0.03$ ). The differences between the groups in the percentage of variation before and after treatment are shown in Figure 3.

The MEP differences (mean ± SD) before and after treatment, irrespective of the sequence trails, are presented in Table 2. Melatonin alone did not result in any significant MEP changes.

The effects of the interventions on the secondary outcomes related to cortical excitability are presented in Table 3. The interventions did not induce significant changes on the other cortical excitability parameters (ICF, ICI, and CSP). No significant difference between the treatment groups was observed for the serum BDNF levels at baseline, which had great variability (Table 1). From the baseline level, the serum

BDNF level demonstrated a mean decrease of 10.96% in the placebo+s-tDCS group, whereas the melatonin+s-tDCS and melatonin+a-tDCS groups presented mean reductions of 12.79% and 6.09%, respectively (Figure 4).

## Discussion

The main findings of this study confirm that melatonin significantly affects the pain pathways, which are not changed by the concurrent tDCS stimulation. Furthermore, this effect does not seem to be associated with changes in cortical excitability. This finding contrasts to our initial hypothesis that melatonin combined with tDCS would improve pain control, considering that treatment with tDCS or melatonin alone demonstrated an effect on pain in pre-clinical [43, 44], experimental [32], and clinical studies [15–18, 45, 46]. One possible explanation for this result is that melatonin induced maximum homeostatic control to modulate the painful stimuli via neurobiological systems that are common targets for both interventions (i.e., melatonin induced a ceiling effect on pain). This hypothesis is biologically plausible and is supported by pre-clinical evidence indicating that the GABAergic [47], opioid, and glutamatergic systems [48] act as targets for both melatonin and tDCS [49]. Additionally, it has been demonstrated that the increased excitability of GABAA and GABAB circuits in M1 increase the inhibitory tone, which is responsible for the general occlusion of the subsequent induction of long-term potentiation- and long-term depression-like plasticity [50–52]. Accordingly, the tonic depression of the nociceptive threshold may result from the activation of pro-nociceptive areas of the brain or from inhibition of the endogenous pain inhibitory system [53].

Another explanation for the lack of an effect when tDCS was combined with melatonin may be that melatonin blocked the effects of tDCS. It has been shown that pharmacological agents [54] such as benzodiazepines, are capable of partially blocking the clinical effects of tDCS [11]. Thus, it is plausible that the fail to add an effect of a-tDCS+melatonin is explained by similar a response, because the melatonin's action on GABA-A receptor may be direct [55, 56]. Additional support for this hypothesis comes from the limited effects tDCS and melatonin had on the cortical excitability parameters in the present study. It is also possible that the lack of interaction effects is a result of metaplasticity, i.e., when two plasticity protocols are

used together, the effect of the first one modulates that of the second [25]. Also, depotentiation may play a role, which refers to two protocols that when used alone do not induce changes in the excitability, but when used together cancel out the effect of a preceding potentiation protocol to achieve homeostasis [57–59].

Furthermore, we have shown that melatonin has no effect on M1 corticospinal excitability as indexed by TMS, or on the descending inhibitory pain systems as indexed by the CPM task. Although M1 excitability is a reliable marker for indexing the effects of interventions on pain [17, 60, 61], this marker seems to be more specific for chronic pain than for acute experimental pain. It also suggests that melatonin modulation on pain does not involve a direct effect on M1, while tDCS does [24, 34].

In addition, we have shown that melatonin's effect on pain is not mediated by descending pain control systems. In fact, in this study, using the CPM task, the pain score on the NPS<sub>0-10</sub> was reduced by more than 30% in all of the treatment groups including the control group. This is consistent with previous studies demonstrating an approximated CPM effect of 29% [62, 63]. The conditioning stimulus used in this study (hand placed in water at 0–1°C for at least 30 s) was a strong, painful stimulus that depresses the nociceptive messages elicited from remote localized body areas. Here, ceiling effects were also possible, *i.e.*, the CPM responses were at their maximum effect given the intensity of the conditioning stimulus used. However, other studies have shown that it is possible to modulate CPM using melatonin, if used in the long-term [22], or with tDCS alone [24]. These results, namely the lack of melatonin-induced M1 modulation and descending inhibitory pain system involvement, support to some extent the notion that acute melatonin after-effects may have limited impact on cortical and spinal systems, thus suggesting that melatonin may modulate subcortical centers. However, this hypothesis needs to be confirmed in further trials with other neurophysiological techniques, such as TMS, electroacupuncture.

The a-tDCS effect on the corticospinal system is related to increased MEP amplitude (Table 2), an effect that is consistent with previous studies that the anodal tDCS over the M1 induced an enhancement of the corticospinal excitability [64]. The tDCS effect on the cortico-subcortical networks is also supported by recent evidence of a functional coupling increase on the thalamo-cortical circuits following anodal stimulation over the motor cortex [65]. We speculate that the not site-limited cortical excitability increase

could be determined by a decrease of the contralateral hemisphere inhibition, mediated, at least partially, by the anodal tDCS-induced reduction of GABA concentration [66]. Also, the tDCS might induce an increased cortical evoked response with a probable concurrent involvement of the NMDA receptors [67, 68]. Thus, these findings suggest that the modulatory effects produced by a-tDCS were not limited to the targeted cortical area but also occur at distant interconnected sites including spinal tract. Given the results, it is likely that the tDCS does not have a direct excitatory or inhibitory effect but mostly a modulation role, presumably expressed as to changes in the excitability of cortical circuits.

The present findings showed that the use of melatonin alone or with tDCS did not induce changes in the serum BDNF levels. Although it is widely distributed in the CNS, the BDNF has been used as a possible neuroplasticity marker that is modulated by rTMS [61], tDCS [69], or melatonin treatment [18, 22], particularly when assessed in the long-term treatment of chronic pain. However, in this study, serum BDNF was measured in healthy subjects and only a short time after one intervention session. Another possible explanation of the lack of changes in serum BDNF in the present study is that the intervention effect was not sufficient to induce a level of neuroplasticity detectable on serum BDNF. These hypotheses are plausible considering that BDNF is produced in the CNS and transported through the blood-brain barrier via saturable systems [70–72]. Although the study demonstrated that the CNS contributes to 70–80% of the circulating BDNF [73], this measure may underestimate its real level in the CNS, since it was demonstrated that in healthy subjects it can be 14-fold the BDNF level in the plasma [74].

The strengths of this trial are that it was conducted according to the CONSORT guidelines and that we used the Delphi List (a list of criteria for the quality assessment of randomized controlled trials); thus, our trial can be considered strong because our study scored positively on all eight items in this scale [75]. Additionally, these findings are important for understanding the physiological mechanisms and the pharmacological and non-pharmacological substrates of the combined effect of melatonin and active-tDCS on pain.

## **Conclusion**



In summary, melatonin effectively reduced pain; however, its association with a-tDCS did not present an additional modulatory effect on pain. Melatonin effects did not seem to be mediated by cortical or spinal centers given the lack of results from the cortical excitability and descending pain control systems. These findings may have implications for improving the understanding of the neurophysiological mechanisms underlying new therapies that use hormone effects as a tool to treat pain.

### **Acknowledgments and disclosures**

*The present research was supported by the following Brazilian agencies:*

Research grant: National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (I.L.S. 302345/2011-6 Torres and W. Caumo WC-301256/2013-6)

Brazilian Innovation Agency (FINEP) process number - 1245/13.

Post-doctoral grant: Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES - PNPd/CAPES, GL, process number (No: 71/2013).

Assistance, medicines, equipment, and administrative support: Postgraduate Research Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Number: 13-0155.

The institutions (HCPA, UFRGS) received support from the following governmental

Brazilian agencies: The Foundation of Support of Research at Rio Grande do Sul (FAPERGS), National Council for Scientific and Technological Development-CNPq, and Committee for the Development of Higher Education Personnel.

*Declaration of interests:*

We affirm that we did not have support from any other organization for the submitted work.



## Figure legends

Figure 1. Randomization and follow-up of the study participants ( $n = 20$ ). Ten subjects were randomly selected to participate in the three-trials.

Figure 2. Heat pain threshold scores before and after intervention presented as delta values (post- minus pre-treatment ). Crossover design;  $n = 20$  trials in the a-tDCS treatment groups and  $n = 10$  trials in the placebo+s-tDCS group. Error bars indicate the standard error of the mean. The letter *b* indicates a significant difference between the melatonin+a-tDCS group and the melatonin+s-tDCS and placebo+s-tDCS groups ( $P < 0.02$ ). All comparisons were performed using a mixed analysis of variance model, followed by the Bonferroni correction for multiple *post hoc* comparisons. tDCS = transcranial direct current stimulation.

Figure 3. Motor-evoked potential (MEP) changes from baseline presented as percentages (post intervention minus pre-intervention). Crossover design;  $n = 20$  in the active treatment groups and  $n = 10$  in the placebo+sham-group. A letter *b* indicates a significant difference between the melatonin+a-tDCS group and the melatonin+s-tDCS and placebo+s-tDCS groups ( $P < 0.05$ ). All comparisons were performed using a mixed analysis of variance model, followed by the Bonferroni correction for multiple *post hoc* comparisons. tDCS = transcranial direct current stimulation.

Figure 4. Mean serum brain-derived neurotropic factor (BDNF) (ng/ml) levels before and after the interventions in the three experimental groups. Error bars indicate the standard error of the mean (SEM). All comparisons between before, after the intervention, and between the three treatment groups are  $P > 0.05$ . All comparisons were performed using a mixed analysis of variance model, followed by the Bonferroni correction for *post hoc* multiple comparisons. tDCS = transcranial direct current stimulation.

**Table 1.** Characteristics of the study sample. Values are given as the mean ( $\pm$ SD) or as a frequency according to the sequence cohort (n = 20).

	Sequence trails		
	First	Second	Third
Age (years)	25.37 (5.39)	25.67 (5.39)	25.60 (5.27)
Education (years)	16.33 (4.68)	16.56 (4.67)	16.56 (4.65)
Smoking (yes/no)	1 (yes: 5.26%)	1 (yes: 5.55%)	1 (yes: 5.26%)
Social alcohol consumption – not more than once a week (yes/no)	8 (yes: 42.05%)	8 (yes: 44.44%)	4 (yes: 43.44%)
Body mass index	25.38 (3.89)	25.78 (3.24)	25.48 (3.22)
State-anxiety	19.84 (4.02)	19.89 (3.55)	19.87 (3.87)
Trait-anxiety	15.92 (3.46)	16.17 (3.91)	15.98 (3.22)
Depressive symptoms on the Beck Inventory	3.79 (3.38)	2.94 (3.10)	3.02 (3.45)
Pain Catastrophizing Scale – total score	5.84 (6.82)	7.67 (9.15)	6.44 (7.78)
Brain-derived neurotrophic factor (ng/ml) before intervention			
Melatonin+a-tDCS	50.0 (15.02)	45.21 (11.71)	46.34 (13.04)
Melatonin+s-tDCS	50.69 (16.02)	43.9 (11.95)	46.87 (13.04)
Placebo+s-tDCS	48.78 (15.04)	46.38 (7.89)	47.58 (10.78)
Psychophysical pain testing			
Heat pain threshold (HPT) (°C)	42.98 (4.07)	42.7 (3.93)	43.0 (2.77)
Heat pain threshold 60% (HPT60) (°C)	44.48 (3.19)	45.02 (3.20)	44.75 (1.98)
Maximal tolerated heat (°C)	44.38 (3.26)	44.97 (3.24)	44.75 (1.89)

SD = standard deviation, tDCS = transcranial direct current stimulation.



**Table 2.** Primary outcomes. The mean delta score (SD) (post-treatment values minus pre-treatment values) of the heat pain thresholds and motor-evoked potentials (n = 20).

	Before intervention	After intervention	Mean difference (post-intervention – pre-intervention, 95% CI)	% (SD) <sup>a</sup>
<b>Heat Pain Threshold (°C)</b>				
Placebo+s-tDCS	43.0 (2.77)	42.46 (2.97)	-0.53 (-1.83 to 0.77)	-1.21 (3.52)
Melatonin+s-tDCS	42.67 (3.39)	44.34 (3.94)	1.67 (0.7 to 2.64)	3.94 (4.81)
Melatonin+a-tDCS	43.0 (3.90)	43.84 (4.28)	1.50 (0.57 to 2.45)	3.65 (5.54)
<i>P</i> value <sup>b</sup>	0.02			
<b>Motor-evoked potential (mV)</b>				
Placebo+s-tDCS	1.39 (0.19)	1.45 (0.22)	0.06 (-0.36 to 0.22)	4.31 (3)
Melatonin+s-tDCS	1.76 (0.28)	1.65 (0.43)	-0.08 (-0.16 to 0.02)	-4.54 (5.35)
Melatonin+a-tDCS	1.84 (0.4)	1.52 (0.5)	-0.32 (-0.22 to -0.39)	-17.39 (25)
<i>P</i> value <sup>b</sup>	0.003			

SD = standard deviation, CI = confidence interval, tDCS = transcranial direct current stimulation.

<sup>a</sup>percentage represents the percent change, calculated as [(post-intervention – pre-intervention)/post-intervention] × 100.

<sup>b</sup>*P* value represents the results from the mixed-model analysis of variance × group interaction (for the main analysis) and for the factorial analysis.

**Table 3.** Secondary outcomes related to cortical excitability (n = 20).

Melatonin+active-tDCS		Melatonin+sham-tDCS		Placebo+sham-tDCS	
Before	After	Before	After	Before	After
mean (SD)	mean (SD)	mean (SD)	mean (SD)	mean (SD)	mean (SD)
Dependent variable: resting motor-threshold					
39.11 (6.72)	40.05 (6.20)	41.56 (6.54)	42.56 (5.65)	41.10 (5.70)	40.07 (5.83)
Dependent variable: cortical silent period					
62.08 (21.25)	63.02 (23.38)	64.51 (20.13)	65.65 (20)	64.16 (9.8)	71.95 (10.76)
Dependent variable: intra-cortical facilitation					
1.08 (0.33)	1.05 (0.24)	1.03 (0.17)	1.07 (0.20)	1.07 (0.20)	0.99 (0.20)
Dependent variable: intra-cortical inhibition					
0.23 (0.10)	0.25 (0.11)	0.26 (0.15)	0.29 (0.12)	0.22 (0.19)	0.21 (0.09)

SD = standard deviation, tDCS = transcranial direct current stimulation.

All comparisons between the melatonin+tDCS, melatonin+sham-tDCS, and placebo+sham-tDCS groups were performed using a mixed analysis of variance model ( $P > 0.05$  for all comparisons).

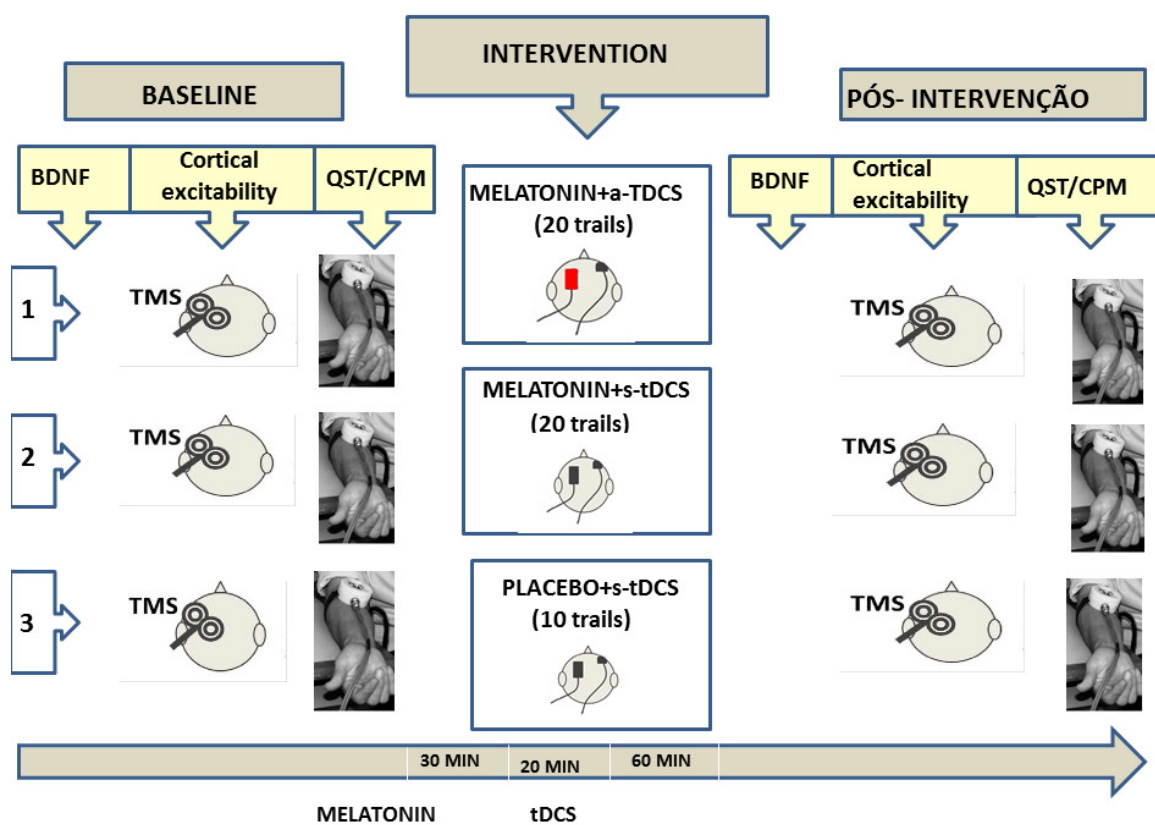


Figure 1.



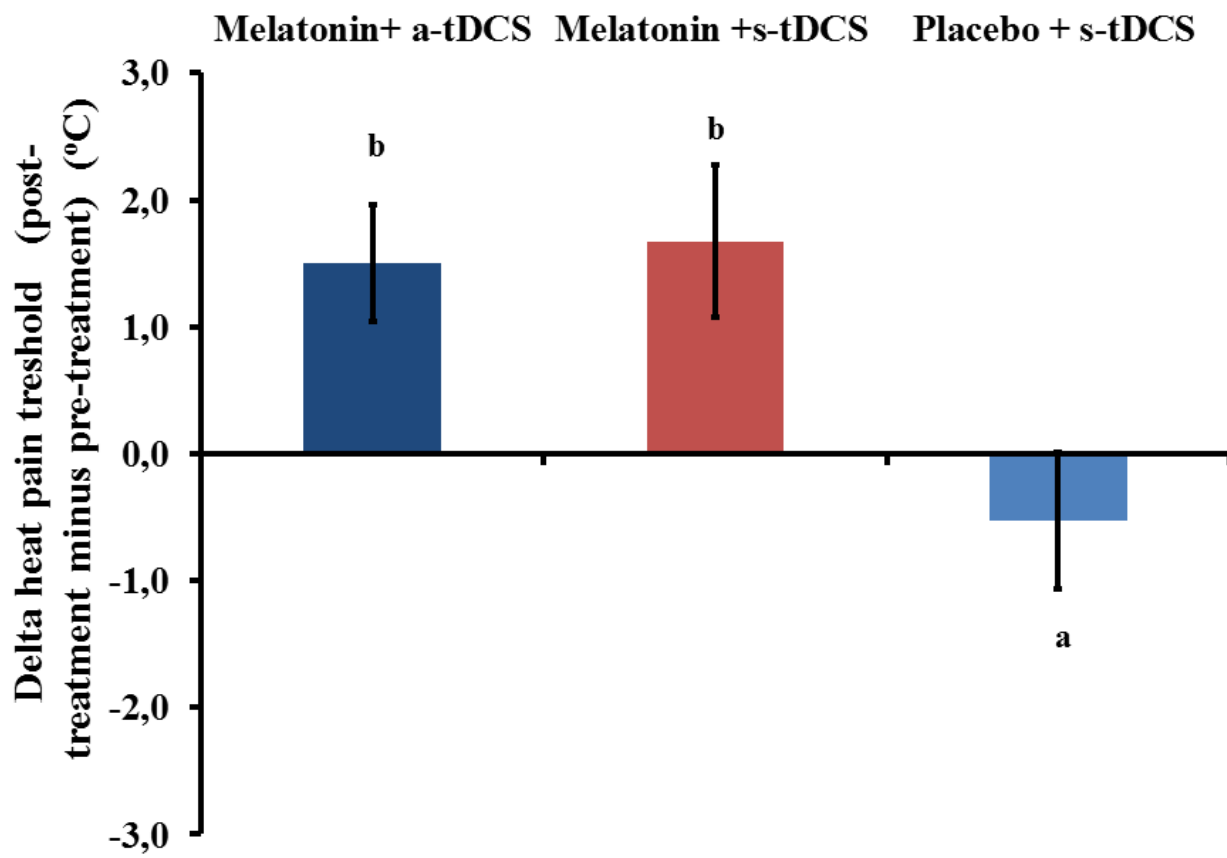


Figure 2.

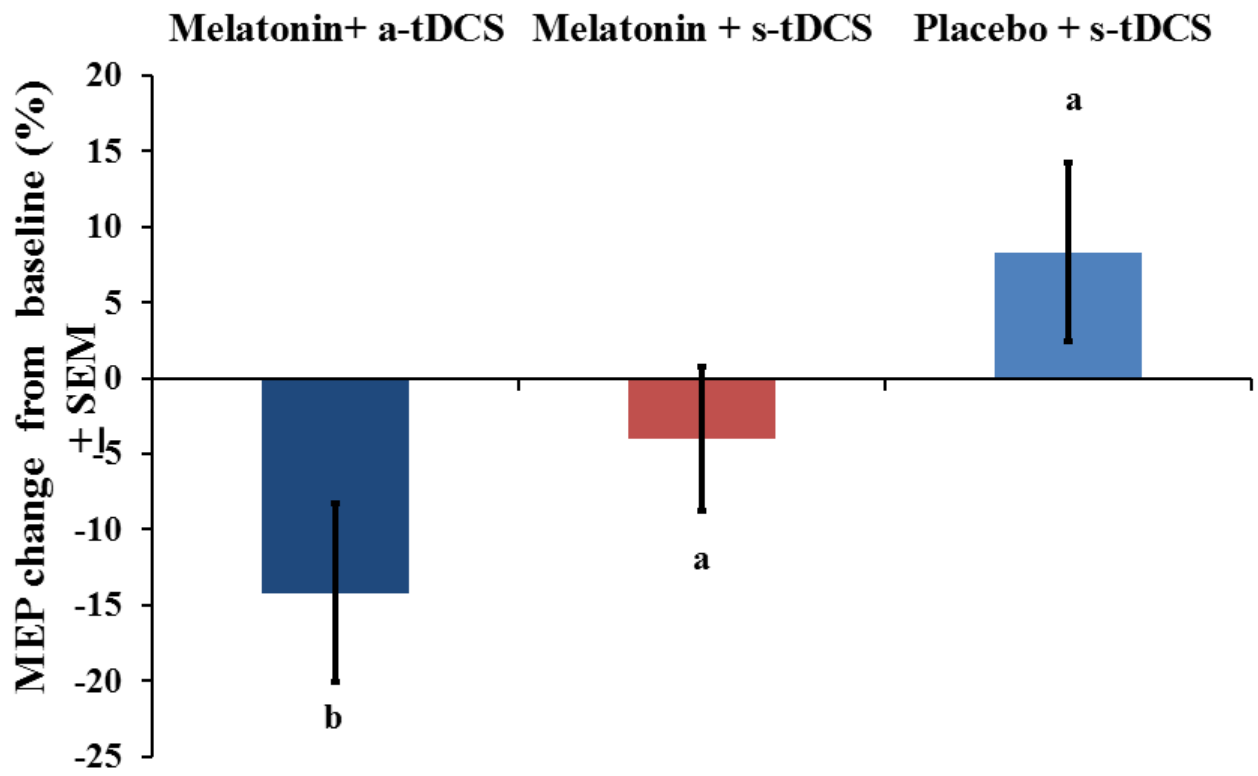
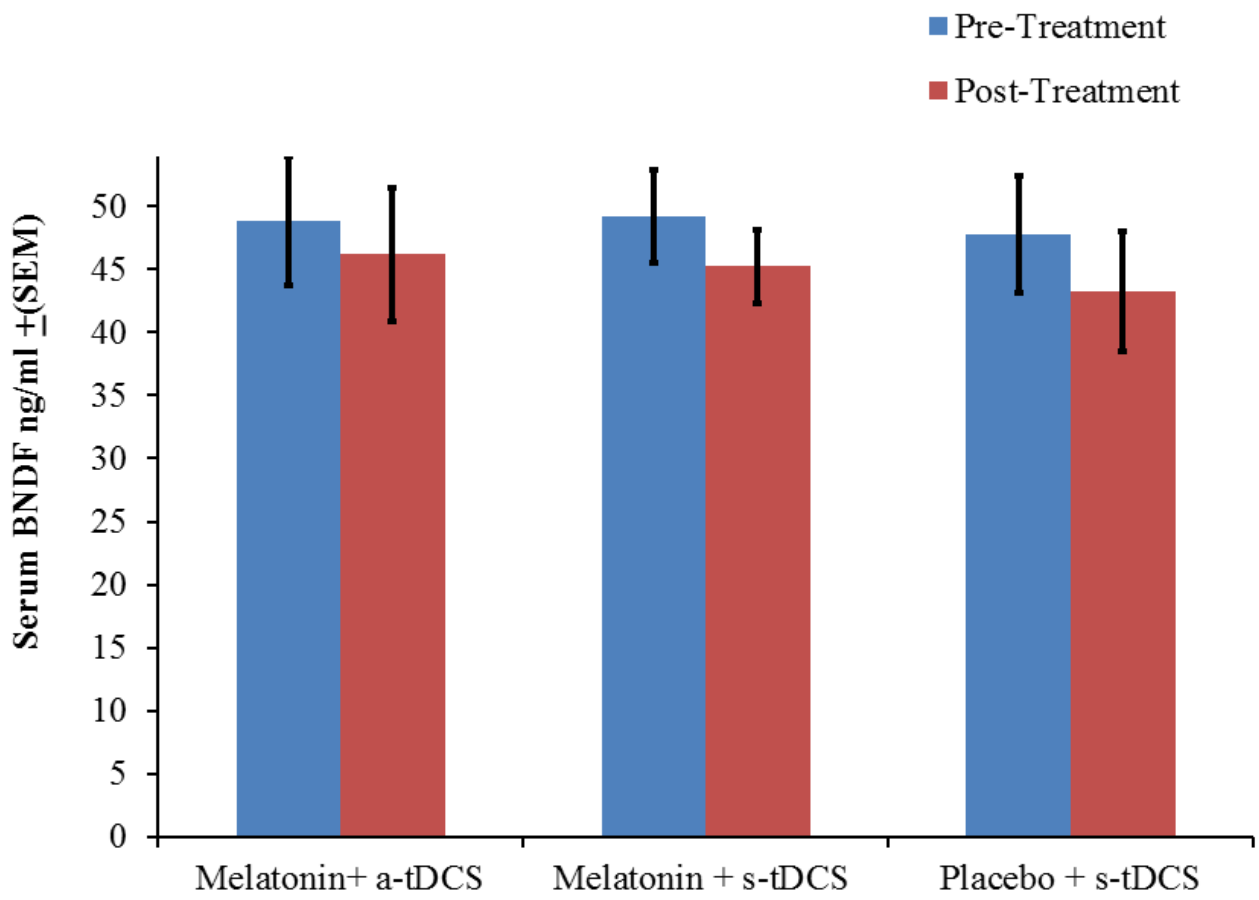


Figure 3.



**Figure 4.**

## References

1. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJL, Rocha RR, Natalle L, Bravo R, Rigonatti SP, Freedman SD, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Boggio PS: **A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:3988–98.
2. Boggio PS, Zaghi S, Lopes M, Fregni F: **Modulatory effects of anodal transcranial direct current stimulation on perception and pain thresholds in healthy volunteers.** *Eur J Neurol* 2008, **15**:1124–30.
3. Lefaucheur J-P, Antal A, Ahdab R, Ciampi de Andrade D, Fregni F, Khedr EM, Nitsche M, Paulus W: **The use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS) to relieve pain.** *Brain Stimul* 2008, **1**:337–44.
4. Valle A, Roizenblatt S, Botte S, Zaghi S, Riberto M, Tufik S, Boggio PS, Fregni F: **Efficacy of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) for the treatment of fibromyalgia: results of a randomized, sham-controlled longitudinal clinical trial.** *J Pain Manag* 2009, **2**:353–361.
5. Mendonca ME, Santana MB, Baptista AF, Datta A, Bikson M, Fregni F, Araujo CP: **Transcranial DC stimulation in fibromyalgia: optimized cortical target supported by high-resolution computational models.** *J Pain* 2011, **12**:610–7.
6. Mylius V, Borckardt JJ, Lefaucheur J-P: **Noninvasive cortical modulation of experimental pain.** *Pain* 2012, **153**:1350–63.
7. O’Connell NE, Wand BM, Marston L, Spencer S, Desouza LH: **Non-invasive brain stimulation techniques for chronic pain.** *Cochrane database Syst Rev* 2010:CD008208.
8. Vaseghi B, Zoghi M, Jaberzadeh S: **Does anodal transcranial direct current stimulation modulate sensory perception and pain? A meta-analysis study.** *Clin Neurophysiol* 2014.
9. Simis M, Reidler JS, Duarte Macea D, Moreno Duarte I, Wang X, Lenkinski R, Petrozza JC, Fregni F: **Investigation of Central Nervous System Dysfunction in Chronic Pelvic Pain Using Magnetic Resonance Spectroscopy and Noninvasive Brain Stimulation.** *Pain Pract* 2014.
10. Brunoni AR, Benseñor IM, Alves TC de TF: **Therapeutic interventions for vascular depression: a systematic review.** *Rev Bras Psiquiatr* 2011, **33**:400–9.

11. Brunoni AR, Valiengo L, Baccaro A, Zanão TA, de Oliveira JF, Goulart A, Boggio PS, Lotufo PA, Benseñor IM, Fregni F: **The sertraline vs. electrical current therapy for treating depression clinical study: results from a factorial, randomized, controlled trial.** *JAMA psychiatry* 2013, **70**:383–91.
12. Antal A, Paulus W: **A case of refractory orofacial pain treated by transcranial direct current stimulation applied over hand motor area in combination with NMDA agonist drug intake.** *Brain Stimul* 2011, **4**:117–21.
13. Laste G, Vidor L, de Macedo IC, Rozisky JR, Medeiros L, de Souza A, Meurer L, de Souza ICC, Torres ILS, Caumo W: **Melatonin treatment entrains the rest-activity circadian rhythm in rats with chronic inflammation.** *Chronobiol Int* 2013, **30**:1077–88.
14. Ambriz-Tututi M, Granados-Soto V: **Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors.** *Pain* 2007, **132**:273–80.
15. Caumo W, Torres F, Moreira NL, Auzani JAS, Monteiro CA, Londero G, Ribeiro DFM, Hidalgo MPL: **The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy.** *Anesth Analg* 2007, **105**:1263–71, table of contents.
16. Caumo W, Levandovski R, Hidalgo MPL: **Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study.** *J Pain* 2009, **10**:100–8.
17. Vidor LP, Torres ILS, Medeiros LF, Dussán-Sarria JA, Dall’agnol L, Deitos A, Brietzke A, Laste G, Rozisky JR, Fregni F, Caumo W: **Association of anxiety with intracortical inhibition and descending pain modulation in chronic myofascial pain syndrome.** *BMC Neurosci* 2014, **15**:42.
18. Schwertner A, Conceição Dos Santos CC, Costa GD, Deitos A, de Souza A, de Souza ICC, Torres ILS, da Cunha Filho JSL, Caumo W: **Efficacy of melatonin in the treatment of endometriosis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** *Pain* 2013, **154**:874–81.
19. Citera G, Arias MA, Maldonado-Cocco JA, Lázaro MA, Rosemffet MG, Brusco LI, Scheines EJ, Cardinali DP: **The effect of melatonin in patients with fibromyalgia: a pilot study.** *Clin Rheumatol* 2000, **19**:9–13.
20. Hussain SA-R, Al-Khalifa II, Jasim NA, Gorial FI: **Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia.** *J Pineal Res* 2011, **50**:267–71.

21. Zurowski D, Nowak L, Machowska A, Wordliczek J, Thor PJ: **Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. The role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism.** *J Physiol Pharmacol* 2012, **63**:641–7.
22. De Zanette SA, Vercelino R, Laste G, Rozisky JR, Schwertner A, Machado CB, Xavier F, de Souza ICC, Deitos A, Torres ILS, Caumo W: **Melatonin analgesia is associated with improvement of the descending endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: a phase II, randomized, double-dummy, controlled trial.** *BMC Pharmacol Toxicol* 2014, **15**:40.
23. Wang LM, Suthana NA, Chaudhury D, Weaver DR, Colwell CS: **Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation.** *Eur J Neurosci* 2005, **22**:2231–7.
24. Reidler JS, Mendonca ME, Santana MB, Wang X, Lenkinski R, Motta AF, Marchand S, Latif L, Fregni F: **Effects of motor cortex modulation and descending inhibitory systems on pain thresholds in healthy subjects.** *J Pain* 2012, **13**:450–8.
25. Murakami T, Müller-Dahlhaus F, Lu M-K, Ziemann U: **Homeostatic metaplasticity of corticospinal excitatory and intracortical inhibitory neural circuits in human motor cortex.** *J Physiol* 2012, **590**(Pt 22):5765–81.
26. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A: **Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research.** *Clin Neurophysiol* 2009, **120**:2008–39.
27. Warmenhoven F, van Rijswijk E, Engels Y, Kan C, Prins J, van Weel C, Vissers K: **The Beck Depression Inventory (BDI-II) and a single screening question as screening tools for depressive disorder in Dutch advanced cancer patients.** *Support Care Cancer* 2012, **20**:319–24.
28. Beck AT, Steer RA, Ball R, Ranieri W: **Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients.** *J Pers Assess* 1996, **67**:588–597.
29. Stefani LC, Torres IL da S, de Souza ICC, Rozisky JR, Fregni F, Caumo W: **BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects.** *Neurosci Lett* 2012, **514**:62–6.
30. Smith MJ, Adams LF, Schmidt PJ, Rubinow DR, Wassermann EM: **Effects of ovarian hormones on human cortical excitability.** *Ann Neurol* 2002, **51**:599–603.
31. Stefani LC, Torres IL da S, de Souza ICC, Rozisky JR, Fregni F, Caumo W: **BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects.** *Neurosci Lett* 2012, **514**:62–6.

32. Stefani LC, Muller S, Torres ILS, Razzolini B, Rozisky JR, Fregni F, Markus R, Caumo W: **A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Dose-Response Trial of the Melatonin Effect on the Pain Threshold of Healthy Subjects.** *PLoS One* 2013, **8**:e74107.
33. Vandermeeren Y, Jamart J, Ossemann M: **Effect of tDCS with an extracephalic reference electrode on cardio-respiratory and autonomic functions.** *BMC Neurosci* 2010, **11**:38.
34. Knotkova H, Nitsche MA, Cruciani RA: **Putative physiological mechanisms underlying tDCS analgesic effects.** *Front Hum Neurosci* 2013, **7**:628.
35. Brunoni AR, Amadera J, Berbel B, Volz MS, Rizzerio BG, Fregni F: **A systematic review on reporting and assessment of adverse effects associated with transcranial direct current stimulation.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2011, **14**:1133–45.
36. Likert R: **A technique for the measurement of attitudes.** *Arch Psychol* 1932, **22**.
37. Schestatsky P, Stefani LC, Sanches PR, Silva Júnior DP da, Torres ILS, Dall-Agnol L, Balbinot LF, Caumo W: **Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies.** *Arq Neuropsiquiatr* 2011, **69**:943–8.
38. Backonja MM, Attal N, Baron R, Bouhassira D, Drangholt M, Dyck PJ, Edwards RR, Freeman R, Gracely R, Haanpaa MH, Hansson P, Hatem SM, Krumova EK, Jensen TS, Maier C, Mick G, Rice AS, Rolke R, Treede R-D, Serra J, Toelle T, Tugnoli V, Walk D, Walalce MS, Ware M, Yarnitsky D, Ziegler D: **Value of quantitative sensory testing in neurological and pain disorders: NeuPSIG consensus.** *Pain* 2013, **154**:1807–19.
39. Schestatsky P, Valls-Solé J, Costa J, León L, Veciana M, Chaves ML: **Skin autonomic reactivity to thermoalgesic stimuli.** *Clin Auton Res* 2007, **17**:349–55.
40. Pascual-Leone A, Valls-Solé J, Wassermann EM, Hallett M: **Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex.** *Brain* 1994, **117** ( Pt 4):847–58.
41. Sehn F, Chachamovich E, Vidor LP, Dall-Agnol L, de Souza ICC, Torres ILS, Fregni F, Caumo W: **Cross-cultural adaptation and validation of the Brazilian Portuguese version of the pain catastrophizing scale.** *Pain Med* 2012, **13**:1425–35.
42. Kaipper MB, Chachamovich E, Hidalgo MPL, Torres IL da S, Caumo W: **Evaluation of the structure of Brazilian State-Trait Anxiety Inventory using a Rasch psychometric approach.** *J Psychosom Res* 2010, **68**:223–33.

43. Laste G, Caumo W, Adachi LNS, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PRM, Partata WA, Fregni F, Torres ILS: **After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation.** *Exp brain Res* 2012, **221**:75–83.
44. Laste G, de Macedo IC, Ripoll Rozisky J, Ribeiro da Silva F, Caumo W, Torres IL: **Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats.** *J Pain Res* 2012, **5**:359–62.
45. Vidor LP, Torres ILS, Custódio de Souza IC, Fregni F, Caumo W: **Analgesic and sedative effects of melatonin in temporomandibular disorders: a double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled study.** *J Pain Symptom Manage* 2013, **46**:422–32.
46. Caumo W, Schmidt AP, Schneider CN, Bergmann J, Iwamoto CW, Adamatti LC, Bandeira D, Ferreira MBC: **Preoperative predictors of moderate to intense acute postoperative pain in patients undergoing abdominal surgery.** *Acta Anaesthesiol Scand* 2002, **46**:1265–71.
47. Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter RJ, Rosenberg J, Gögenur I: **Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies.** *J Pineal Res* 2011, **51**:270–7.
48. Mantovani M, Kaster MP, Pertile R, Calixto JB, Rodrigues ALS, Santos ARS: **Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice.** *J Pineal Res* 2006, **41**:382–9.
49. Rakofsky JJ, Holtzheimer PE, Nemeroff CB: **Emerging targets for antidepressant therapies.** *Curr Opin Chem Biol* 2009, **13**:291–302.
50. Castro-Alamancos MA, Donoghue JP, Connors BW: **Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex.** *J Neurosci* 1995, **15**(7 Pt 2):5324–33.
51. Castro-Alamancos MA, Borrell J: **Contribution of NMDA and nonNMDA glutamate receptors to synchronized excitation and cortical output in the primary motor cortex of the rat.** *Brain Res Bull* 1995, **37**:539–543.
52. Hess G, Aizenman CD, Donoghue JP: **Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex.** *J Neurophysiol* 1996, **75**:1765–78.
53. Burkey AR, Carstens E, Jasmin L: **Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception.** *J Neurosci* 1999, **19**:4169–79.



54. Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W: **Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability.** *Brain* 2002, **125**(Pt 10):2238–47.
55. Coloma FM, Niles LP: **Melatonin enhancement of [3H]-gamma-aminobutyric acid and [3H]muscimol binding in rat brain.** *Biochem Pharmacol* 1988, **37**:1271–4.
56. Niles LP, Peace CH: **Allosteric modulation of t-[35S]butylbicyclophosphorothionate binding in rat brain by melatonin.** *Brain Res Bull* 1990, **24**:635–8.
57. Yashiro K, Philpot BD: **Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity.** *Neuropharmacology* 2008, **55**:1081–94.
58. Müller-Dahlhaus F, Ziemann U: **Metaplasticity in Human Cortex.** *Neuroscientist* 2014.
59. Froc DJ, Chapman CA, Trepel C, Racine RJ: **Long-term depression and depotentiation in the sensorimotor cortex of the freely moving rat.** *J Neurosci* 2000, **20**:438–45.
60. Volz MS, Medeiros LF, Tarragô M da G, Vidor LP, Dall’Agnol L, Deitos A, Brietzke A, Rozisky JR, Rispolli B, Torres ILS, Fregni F, Caumo W: **The relationship between cortical excitability and pain catastrophizing in myofascial pain.** *J Pain* 2013, **14**:1140–7.
61. Dall’Agnol L, Medeiros LF, Torres ILS, Deitos A, Brietzke A, Laste G, de Souza A, Vieira JL, Fregni F, Caumo W: **Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the corticospinal inhibition and the brain-derived neurotrophic factor in chronic myofascial pain syndrome: an explanatory double-blinded, randomized, sham-controlled trial.** *J Pain* 2014, **15**:845–55.
62. Niesters M, Aarts L, Sarton E, Dahan A: **Influence of ketamine and morphine on descending pain modulation in chronic pain patients: a randomized placebo-controlled cross-over proof-of-concept study.** *Br J Anaesth* 2013, **110**:1010–6.
63. Pud D, Golan Y, Pesta R: **Hand dominance--a feature affecting sensitivity to pain.** *Neurosci Lett* 2009, **467**:237–40.
64. Pellicciari MC, Brignani D, Miniussi C: **Excitability modulation of the motor system induced by transcranial direct current stimulation: a multimodal approach.** *Neuroimage* 2013, **83**:569–80.
65. Polanía R, Paulus W, Nitsche MA: **Reorganizing the intrinsic functional architecture of the human primary motor cortex during rest with non-invasive cortical stimulation.** *PLoS One* 2012, **7**:e30971.

66. Stagg CJ, Best JG, Stephenson MC, O'Shea J, Wylezinska M, Kincses ZT, Morris PG, Matthews PM, Johansen-Berg H: **Polarity-sensitive modulation of cortical neurotransmitters by transcranial stimulation.** *J Neurosci* 2009, **29**:5202–6.
67. Nitsche MA, Liebetanz D, Antal A, Lang N, Tergau F, Paulus W: **Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation--technical, safety and functional aspects.** *Suppl Clin Neurophysiol* 2003, **56**:255–76.
68. Islam N, Aftabuddin M, Moriwaki A, Hattori Y, Hori Y: **Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain.** *Brain Res* 1995, **684**:206–8.
69. Brunoni AR, Machado-Vieira R, Zarate CA, Vieira ELM, Vanderhasselt M-A, Nitsche MA, Valiengo L, Benseñor IM, Lotufo PA, Gattaz WF, Teixeira AL: **BDNF plasma levels after antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation: results from a factorial, randomized, sham-controlled trial.** *Eur Neuropsychopharmacol* 2014, **24**:1144–51.
70. Asmundson GJ, Norton PJ, Norton GR: **Beyond pain: the role of fear and avoidance in chronicity.** *Clin Psychol Rev* 1999, **19**:97–119.
71. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ: **Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier.** *Neuropharmacology* 1998, **37**:1553–61.
72. Poduslo JF, Curran GL: **Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF.** *Brain Res Mol Brain Res* 1996, **36**:280–6.
73. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen M V, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H: **Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise.** *Exp Physiol* 2009, **94**:1062–9.
74. Yoshimura R, Kishi T, Hori H, Katsuki A, Sugita-Ikenouchi A, Umene-Nakano W, Atake K, Iwata N, Nakamura J: **Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor at 4 Weeks and Response to Treatment with SSRIs.** *Psychiatry Investig* 2014, **11**:84–8.
75. Tetzlaff JM, Moher D, Chan A-W: **Developing a guideline for clinical trial protocol content: Delphi consensus survey.** *Trials* 2012, **13**:176.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estudo demonstra que a resposta nociceptiva, em homens saudáveis, está correlacionada de maneira inversa com o limiar de dor ao calor, com o nível de facilitação intracortical e com a capacidade de modulação do sistema descendente da dor. No global, tais achados sugerem que maiores níveis de BDNF estão associados com maior excitabilidade do sistema nociceptivo, num contexto de dor aguda experimental, o que sugere que essa neurotrofina possa ter um papel diagnóstico do estado funcional do sistema

nociceptivo. Também pode ter relevância no contexto clínico como medida auxiliar na avaliação do processo de sensibilização e do efeito da terapêutica modulatória no processo de neuroplasticidade.

O estudo também mostra que a melatonina eleva o limiar nociceptivo e a potência do sistema modulador descendente da dor. No entanto, sua associação com a tDCS não determinou efeito aditivo ou sinérgico na resposta ao estímulo nociceptivo. Por outro lado, somente a tDCS ativa reduziu a amplitude do MEP, sugerindo que reduziu a excitabilidade corticoespinal.

É lícito concluir que estes achados podem ter importância no cenário clínico, por melhorarem a compreensão dos mecanismos neurofisiológicos num contexto experimental controlado.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS:**

A literatura mostra que estruturas cerebrais e vias neurais participam de maneira conexas e intrincadas no processo nociceptivo, os quais podem apresentar alterações morfofuncionais e neuroquímicas. O conhecimento gerado por este estudo auxilia na compreensão dos complexos mecanismos neurofisiológicos da dor aguda em sujeitos do sexo masculino saudáveis. Sobretudo, contribuem na investigação de novas terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas, bem como colaboram na investigação de mecanismos implicados na capacidade de resposta do sistema em atividade. Uma adição importante deste estudo é o limite fisiológico da capacidade de resposta de um sistema neurobiológico aos estímulos sucessivos, auxiliando na construção do conceito de metaplasticidade e depotenciação. Constitui-se num modelo que permite estudar e compreender como terapêuticas combinadas podem não incrementar o efeito de resposta

do sistema. Sobretudo, este resultado motiva testar se este tipo de resposta com limite de efeito ocorre em sistema disfuncional assim como se essa resposta se mantém em tratamentos crônicos.

Este trabalho faz parte da linha de pesquisa sobre neuroplasticidade e sistema nociceptivo do Laboratório de Dor e Neuromodulação do HCPA, que vem gerando novos conhecimento no campo da neurociência, tendo como eixo central o estudo da Dor.

## **8. ANEXOS**

### **8.1. TCLE**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### NOME DO ESTUDO: EFEITO DA MELATONINA À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCRANIANA DE CORRENTE CONTINUA NA NEUROPLASTICIDADE E NO LIMIAR DE DOR EM SUJEITOS SAUDÁVEIS

Número do protocolo: \_\_\_\_\_  
 Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre- HCPA  
 Pesquisador Responsável: Dr. Wolnei Caumo – 9981-3977  
 Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA: (51) 3359-8304

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir e retirado todas as suas dúvidas sobre a pesquisa, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

#### 1. OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo do estudo é avaliar o efeito da estimulação transcraniana de corrente contínua (TDCs) que é um tratamento para dor em que o estímulo é realizado na cabeça (Figura 1). No entanto, o efeito desta estimulação será avaliado combinado a uma substância chamada de melatonina, que regula o sono e também tem demonstrado efeito na dor. O efeito deste tratamento será avaliado por exames de sangue, funções dos nervos avaliados por estímulos leves que produzem as sensações de calor. Haverá perguntas sobre os seus sentimentos, nível de dor e pensamentos que lhe aparece na cabeça durante o tratamento.

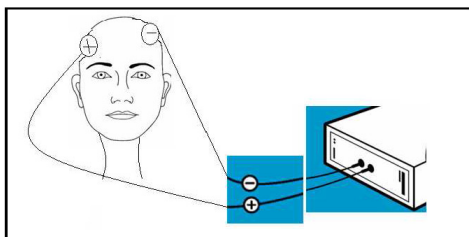


Figura 1

#### 2. EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Ao participar da pesquisa é necessário responder a várias perguntas antes e durante o exame. Será necessário coletar quatro amostras de sangue, o volume é de 10 ml a cada coleta, o equivalente a duas colheres de sopa. As amostras de sangue serão coletadas antes de iniciar o estudo, ao final da primeira intervenção, antes de iniciar a segunda intervenção e ao final da mesma.

#### 3. TRATAMENTOS

Neste estudo, as sessões do tratamento com TDCs serão realizadas conforme o protocolo de duas sessões com o uso de eletrodos de borracha que serão colocados na sua cabeça, através dos quais vão passar uma eletricidade fraca que pode no máximo causar uma leve coceira. Serão aplicados dois tipos de tratamento. Será feito um sorteio, você receberá tanto o tratamento ativo como o placebo, com uma semana de intervalo entre os dois. No tratamento placebo os equipamentos não emitirão nenhum estímulo. Se concordar em participar do estudo, terá que cooperar em todas as etapas do mesmo. Nem o senhor nem a enfermeira que lhe aplicará os questionários saberão qual tratamento o senhor receberá.

O senhor receberá melatonina sublingual 0,25 mg/kg (dose máxima de 20mg), antes de iniciar o TDCs, esta é uma substância que regula o sono.

#### 4. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

Um possível desconforto poderá ser sentido, por algumas pessoas, na coleta de sangue. Durante a aplicação da estimulação poderá ocorrer vermelhidão, sensações de coceira, leve formigamento no local

onde serão colocados os eletrodos. O senhor também poderá sentir sonolência, dor de cabeça, náuseas ou tonturas.

#### 5. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESTES ESTUDOS

O tratamento que será realizado visa avaliar o limite para a dor. Com os resultados deste estudo poderemos obter informações importantes sobre o quanto estes tratamentos poderão beneficiar outros pacientes com quadros de dor.

#### 6. DIREITO DE DESISTÊNCIA

O Senhor poderá desistir de participar a qualquer momento da pesquisa. Sua decisão de não participar ou de deixar a pesquisa depois de iniciada não o prejudicará.

#### 7. PRIVACIDADE

Todas as informações obtidas deste estudo poderão ser publicas com finalidades científicas, preservando os dados de identificação.

#### 8. CONTATO DOS PESQUISADORES

Caso o Senhor tenha alguma dúvida poderá entrar em contato com os pesquisadores através dos telefones: Prof<sup>o</sup> Dr. [Wolnei Caumo](#) 9981-3977 (2º andar do HCPA Laboratório de Neuromodulação - sala 2201E – telefone 3359-8083) ainda com o Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas. Este é um órgão composto por profissionais de diferentes áreas de conhecimento e por representantes da comunidade, são responsáveis pela avaliação ética e metodológica dos projetos de pesquisa que envolva seres humanos - telefone 3359-8304.

#### 9. RESSARCIMENTO DE DESPESAS

O Senhor não terá despesas com a sua participação na pesquisa.

#### 10. ARMAZENAMENTO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

O sangue coletado será avaliado no Laboratório de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Este material não será armazenado nem utilizado em pesquisas futuras.

#### 11. CONSENTIMENTO

Este termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecido uma via para o sujeito da pesquisa e uma via será arquivada pelo pesquisador, sendo as duas vias assinadas e rubricadas todas as páginas por ambos.

Declaro ter lido – ou me foi lido – as informações acima antes de assinar este formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento, torno-me parte, voluntariamente, do presente estudo.

Nome do sujeito da pesquisa: \_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito da pesquisa: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador : \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador : \_\_\_\_\_



## **8.2. QUESTIONÁRIOS E ESCALAS**

## 8.2.1 IDATE

DOR E NEUROMODULAÇÃO – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0)

Nome: \_\_\_\_\_ No banco: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_ Entrevistador: \_\_\_\_\_ Testagem: \_\_\_\_\_



**IDATE – INENTÁRIO DE ANSIEDADE TRAÇO-ESTADO**  
**QUESTIONÁRIO DE AUTO-AVALIAÇÃO**

**IDATE (PARTES I e II)**

Idade: \_\_\_\_ a \_\_\_\_ m Data do nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Estado civil: \_\_\_\_\_ Nível de instrução: \_\_\_\_\_

Profissão \_\_\_\_\_ Ocupação atual \_\_\_\_\_

**INSTRUÇÕES**

Nas páginas seguintes há dois Questionários para você responder. Trata-se de algumas afirmações que têm sido usadas para descrever sentimentos pessoais. Não há respostas certas ou erradas. Leia com toda atenção cada uma das perguntas da Parte I e assinale com um círculo um dos números (1, 2, 3 ou 4), à direita.

**PARTE I – IDATE ESTADO**

Leia cada pergunta e faça um círculo ao redor do número à direita da afirmação que melhor indicar como você se sente agora, neste momento. Não gaste muito tempo numa única afirmação, mas tente dar uma resposta que mais se aproxime de como você se sente neste momento.

**AVALIAÇÃO**

	Muitíssimo-----4	Um pouco-----2
	Bastante-----3	Absolutamente não----1
1 – Sinto-me calmo.....	1	2 3 4
2 – Sinto-me seguro.....	1	2 3 4
5 – Sinto-me à vontade.....	1	2 3 4
6 – Sinto-me perturbado.....	1	2 3 4
7 – Estou preocupado com possíveis infortúnios.....	1	2 3 4
8 – Sinto-me descansado.....	1	2 3 4
11 – Sinto-me confiante.....	1	2 3 4
13 – Estou agitado.....	1	2 3 4
14 – Sinto-me uma pilha de nervos.....	1	2 3 4
16 – Sinto-me satisfeito.....	1	2 3 4
17 – Estou preocupado.....	1	2 3 4
18 – Sinto-me confuso.....	1	2 3 4
19 – Sinto-me alegre.....	1	2 3 4
* Os itens demarcados em vermelhos são as perguntas de caráter positivo do IDATE-estado.		

## PARTE II – IDATE TRAÇO

Leia cada pergunta e faça um círculo em redor do número à direita que melhor indicar como você geralmente se sente.

Não gaste muito tempo numa única afirmação, mas tente dar a resposta que mais se aproximar de como você se sente geralmente.

### AVALIAÇÃO

Quase sempre-----4	Às vezes-----2
Freqüentemente-----3	Quase nunca-----1

1. Sinto-me bem.....	1	2	3	4
2. Canso-me facilmente.....	1	2	3	4
5. Perco oportunidades porque não consigo tomar decisões rapidamente.....	1	2	3	4
7. Sou calmo, ponderado e senhor de mim mesmo.....	1	2	3	4
8. Sinto que as dificuldades estão se acumulando de tal forma que não as consigo resolver.....	1	2	3	4
9. Preocupo-me demais com as coisas sem importância .....	1	2	3	4
10. Sou feliz.....	1	2	3	4
12. Não tenho muita confiança em mim mesmo.....	1	2	3	4
16. Estou satisfeito.....	1	2	3	4
17. Idéias sem importância me entram na cabeça e ficam me preocupando .....	1	2	3	4
18. Levo os desapontamentos tão a sério que não consigo tirá-los da cabeça.....	1	2	3	4
20. Fico tenso e perturbado quando penso em meus problemas do momento.....	1	2	3	4

\* Os itens marcados em vermelhos são as perguntas de caráter positivo do IDATE-traço.

## 8.2.2 Escala de Pensamento Catastrófico sobre Dor

### Escala de Pensamento Catastrófico sobre a Dor

**Instruções:**

**Listamos 13 declarações que descrevem diferentes pensamentos e sentimentos que podem lhe aparecer na cabeça quando sente dor. Indique o *GRAU* destes pensamentos e sentimentos quando está com dor**

	0	1	2	3	4
1 A preocupação durante todo o tempo com a duração da dor é	Mínima	leve	Moderada	Intensa	Muito intensa
2 O sentimento de não poder prosseguir (continuar) é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
3 O sentimento que a dor é terrível e que não vai melhorar é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
4 O sentimento que a dor é horrível e que você não vai resistir é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
5 O pensamento de não poder mais estar com alguém é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
6 O medo que a dor pode se tornar ainda pior é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
7 O pensamento sobre outros episódios de dor é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
8 O desejo profundo que a dor desapareça é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
9 O sentimento de não conseguir tirar a dor do pensamento é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
10 O pensamento que ainda poderá doer mais é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
11 O pensamento que a dor é grave porque ela não quer parar é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
12 O pensamento de que não há nada para fazer para diminuir a intensidade da dor é	Mínimo	leve	Moderado	Intenso	Muito intenso
13 A preocupação que alguma coisa ruim pode acontecer por causa da dor é	Mínima	leve	Moderada	Intensa	Muito intensa

## 8.2.3 Questionário Efeitos Adversos - tDCS

<b>QUESTIONÁRIO EFEITOS ADVERSOS – tDCS</b>
---

Sessão: \_\_\_\_\_

Você sentiu algum dos sintomas ou efeitos adversos citados abaixo?	Coloque nos espaços abaixo valores de 1 a 4: 1 – ausente 2 – leve 3 – moderado 4 – severo	Se algum destes sintomas estiver presente: isto está relacionado com a aplicação do tDCS? 1 – não 2 – após algum tempo da aplicação 3 – possivelmente sim 4 - provavelmente sim 5 – definitivamente, sim	Observações
Dor de Cabeça			
Dor no Pescoço			
Dor no Couro Cabeludo			
Formigamento			
Coceira			
Sensação de queimação			
Vermelhidão			
Sonolência			
Dificuldade de concentração			
Mudança de humor de forma Aguda			
Outro (especifique):			

## 8.2.4 Validação do Cegamento

DOR E NEUROMODULAÇÃO – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0)

Nome: \_\_\_\_\_ No banco: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_ Entrevistador: \_\_\_\_\_ Testagem: \_\_\_\_\_



### Validação Cegamento

**1. Qual tipo de tratamento você recebeu?**

estimulação placebo

estimulação ativa

**2. Qual o grau de confiança no tratamento que você recebeu?**

1, não sinto confiança

2. Pouco confiança

3. Confiança moderada

4 confiante

5, totalmente confiante



## 8.2.5 Pittsburg - qualidade de sono

DOR E NEUROMODULAÇÃO - HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0)

Nome: \_\_\_\_\_ No banco: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_ Entrevistador: \_\_\_\_\_ Testagem: \_\_\_\_\_



### Questionário sobre Qualidade de Sono

As seguintes questões são relacionadas ao seu hábito de sono na maioria dos dias e noites do **último mês**. Suas respostas devem indicar o mais fielmente o que ocorreu na maioria dos dias e noites do último mês.

1. Durante o último mês, quantas vezes você teve problemas com seu sono, por que...	Nenhum episódio no último mês	Menos do que 1 vez na semana	1 ou 2 vezes na semana	3 ou mais vezes na semana
(a) ... não conseguiu pegar no sono durante 30 min	0	1	2	3
(b) ... acordou no meio da noite ou muito cedo pela manhã	0	1	2	3
(c) ... teve de ir ao banheiro	0	1	2	3
(d) ... Não conseguiu respirar direito	0	1	2	3
(e) ... Tosse ou ronco alto	0	1	2	3
(f) ... Sentiu muito frio	0	1	2	3
(g) ... sentiu muito calor	0	1	2	3
(h) ... Teve pesadelos	0	1	2	3
(i) ... Sentiu dor	0	1	2	3
(j) ... outro motivo Por favor, descreva o motivo:	0	1	2	3
2. Durante o mês passado, como você classificaria a qualidade do seu sono?	Não tem sido um grande problema = 0	Às vezes tem sido um problema pequeno = 1	Na maioria das vezes tem sido um problema = 2	Tem sido um grande problema = 3
3. Durante o mês passado, quantas vezes você...	Nenhum episódio no último mês	Menos do que 1 vez na semana	1 ou 2 vezes na semana	3 ou 4 vezes na semana
(a) ... Tomou remédio, chá devido ao seu problema de sono? Descrever o que tomou: _____	0	1	2	3
(b) ... Teve problema para ficar acordado enquanto dirigia, comia ou estava envolvido com atividades sociais?	0	1	2	3
4. Durante o último mês, quanto o seu problema de sono atrapalhou, diminuindo seu entusiasmo para fazer coisas?	Não tem sido um grande problema = 0	Às vezes tem sido um problema pequeno = 1	Na maioria das vezes tem sido um problema = 2	Tem sido um grande problema = 3

NUMERO: \_\_\_\_\_



## 8.2.6 contra-indicações ao TMS

DOR E NEUROMODULAÇÃO – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00–0)  
 Nome: \_\_\_\_\_ No banco: \_\_\_\_\_



Data: \_\_\_\_\_ Entrevistador: \_\_\_\_\_ Testagem: \_\_\_\_\_

Questionário rTMS	
1. Você tem epilepsia ou teve convulsão?	( )1. Sim ( )2. Não
2. Você teve desmaio ou síncope? Se sim, descrever a ocasião	( )1. Sim ( )2. Não
3. Teve trauma de crânio grave (seguido de perda de consciência)?	( )1. Sim ( )2. Não
4. Tem problema de audição ou zumbido nos ouvidos?	( )1. Sim ( )2. Não
5. Está grávida ou tem a chance de estar?	( )1. Sim ( )2. Não
6. Tem algo metálico no cérebro/crânio (exceto titânio)? (Ex.: clips, placas, etc.)	( )1. Sim ( )2. Não
7. Tem implante coclear?	( )1. Sim ( )2. Não
8. Tem neuroestimulador implantável (Ex.: epidural, subdural)	( )1. Sim ( )2. Não
9. Tem marca passo cardíaco ou outro metal no corpo?	( )1. Sim ( )2. Não
10. Tem algum dispositivo de infusão no corpo?	( )1. Sim ( )2. Não
11. Está tomando algum remédio? (Por favor liste) Se sim, por favor, liste:	( )1. Sim ( )2. Não
12. Teve alguma cirurgia na medula?	( )1. Sim ( )2. Não
13. Válvula de derivação ventrículo-peritoneal?	( )1. Sim ( )2. Não
14. Já realizou rTMSw	( )1. Sim ( )2. Não
15. Nunca foi submetido (a) à rTMS?	( )1. Sim ( )2. Não