

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

**BDNF E EFEITO DOSE-RESPOSTA DA MELATONINA NO LIMIAR DE
DOR EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

LUCIANA PAULA CADORE STEFANI

Porto Alegre

2012

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

**BDNF E EFEITO DOSE-RESPOSTA DA MELATONINA NO LIMIAR DE
DOR EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

LUCIANA PAULA CADORE STEFANI

Orientador: Prof. Dr. Wolnei Caumo
Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Stefani, Luciana Paula Cadore
BDNF E EFEITO DOSE-RESPOSTA DA MELATONINA NO
LIMIAR DE DOR EM INDIVIDUOS SAUDÁVEIS / Luciana
Paula Cadore Stefani. -- 2012.
131 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, 2012.

1. Limiar de dor. 2. BDNF. 3. Gênero. 4.
Melatonina. 5. Curva dose-resposta. 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).

Aos meus pais Cleide e José, pelo incentivo, amor e presença constante. Foram meus exemplos como profissionais do ensino e os responsáveis pelos alicerces desta trajetória.

Ao meu querido esposo Stephen, por todo o amor, compreensão e apoio, fundamentais nas decisões que me levaram à concretização deste sonho.

Ao Lucca, Bianca e Enrico, meus filhos amados e motivos de minha vida. Que o esforço dispendido para vencer esta etapa sirva de exemplo em algum momento da vida de cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wolnei Caumo, pelo estímulo e pela oportunidade de crescimento constante ao longo desta etapa. Agradeço por acreditar no meu potencial e me estimular nas horas mais árduas desta caminhada. Seu exemplo nos ensina, sua competência nos move e sua dedicação à pesquisa nos contagia.

Ao Grupo de Pesquisa em Dor e Neuromodulação, pela parceria, apoio, auxílio e solidariedade.

Ao grupo da Engenharia Biomédica do HCPA pela construção e assistência de alguns equipamentos fundamentais para a realização dos estudos que compõem esta tese.

Ao grupo de enfermagem do Centro de Pesquisa Clínica do HCPA, pela participação e auxílio nas diferentes etapas do projeto.

As professoras Elaine Aparecida Félix e Helena Maria Arenson Pandikow pelo incentivo, entusiasmo e apoio logístico.

Aos alunos bolsistas Diego Fraga e Bruna Razzolini pelo auxílio e empenho em muitas etapas deste estudo.

Aos voluntários que se submeteram aos diferentes testes, agradeço pela colaboração e participação.

*Na ciência, tão importante quanto obter novos fatos,
é descobrir novas formas de pensar sobre eles.*

William Lawrence Bragg

(1890-1971)

RESUMO

Introdução: A mensuração da dor através de testes psicofísicos, entre eles o teste de quantificação sensitiva, definido como a determinação de limiares a estímulos algícos controlados, possibilita o estudo de inúmeras variáveis que influenciam a percepção final da dor. Entre essas variáveis encontram-se o BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), o gênero e sistemas modulatórios não classicamente descritos como o melatonérgico.

Objetivos: Validar um equipamento para realização do teste de quantificação sensitiva usando amostra de voluntários brasileiros saudáveis e estudar fatores e sistemas neurobiológicos que alteram os limiares nociceptivos como sexo, BDNF e melatonina.

Métodos: O novo equipamento (Heat Pain Stimulator-1.1.10; Brazil) foi utilizado em 20 voluntários saudáveis e em pacientes com neuropatia periférica, em duas sessões separadas, para acessar a reprodutibilidade dos limiares e a concordância com os equipamentos clássicos. Em etapa posterior, os limiares de dor foram medidos em voluntários e correlacionados com o gênero e os níveis de BDNF. Em estudo sucessivo 61 sujeitos foram randomizados em 1 dos 4 grupos: placebo, 0,05 mg/kg de melatonina sublingual (SL), 0,15 mg/kg de melatonina SL ou 0,25 mg/kg de melatonina e foram testados quanto aos limiares e tolerância à dor aos estímulos térmico e de pressão no tempo basal e 30 min após a intervenção. A sedação foi quantificada através de escala análogo-visual e pela análise do índice bispectral.

Resultados: Os resultados iniciais mostraram concordância com a literatura e adequada reprodutibilidade dos limiares de dor térmica em indivíduos saudáveis ($44.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$) e em indivíduos com neuropatias de fibras finas ($49.9 \pm 3^{\circ}\text{C}$) em sessões separadas. Quando analisados em modelo de regressão linear multivariada, os limiares de dor térmica e de pressão mostraram um efeito significativo do gênero ($p=0,01$ para ambos os modelos), BDNF ($p<0,04$ para ambos os modelos) e interação entre BDNF e gênero ($<0,001$ para

ambos os modelos). Altos níveis de BDNF foram correlacionados com alto limiar de dor em mulheres e essa relação foi inversa em homens. No estudo com a melatonina, os níveis plasmáticos foram proporcionais à dose administrada, e o modelo de regressão linear mostrou uma relação entre a concentração sérica de melatonina e as modificações nos limiares ($R^2=0,56$ para o limiar de dor ao estímulo térmico e $R^2=0,518$ para o limiar de dor na algometria de pressão). Uma dose única de melatonina igual ou acima de 0,15 mg/kg propiciou um delta médio dos limiares de dor ao estímulo térmico e à pressão maiores que placebo (MANOVA, $p<0,05$ para todas as análises). Além disso, dose igual ou acima que 0,15 mg/kg produziu maior escore de sedação.

Conclusões: O equipamento desenvolvido produz resultados confiáveis para avaliação das vias nociceptivas em voluntários saudáveis e em pacientes com alterações sensitivas. O BDNF está associado a maiores limiares de dor nas mulheres (menos dor), mas tem efeito oposto nos homens, suportando a ideia de que ele modifica o efeito que o gênero exerce sobre os limiares de dor. A melatonina possui efeito analgésico dose-dependente no modelo de dor experimental desenvolvido, havendo correlação entre a concentração plasmática e as alterações nos limiares avaliados. O adequado perfil farmacocinético, e a ausência de efeitos colaterais significativos reforçam a sua consolidação como um fármaco modulador da dor.

Palavras-chave: Limiar de dor, vias da dor, gênero, BDNF, melatonina, modulação da dor, curva dose-resposta.

ABSTRACT

Background: The measurement of pain through psychophysical tests, including quantitative sensory testing, allow for the study of many variables that influence the final perception of pain. Among these variables are BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), in addition to gender and modulatory systems not classically described as melatonergic.

Objectives: To validate a device to perform the quantitative sensory testing in a cohort of Brazilian healthy volunteers in order to study factors and neurobiological systems that alter the nociceptive thresholds including gender, BDNF, and melatonin.

Methods: The new equipment (Heat Pain Stimulator, 01/01/10, Brazil) was tested on 20 healthy volunteers and patients with peripheral neuropathy in two separate sessions to assess the reproducibility of thresholds with the classic features. In later stage, the pain thresholds were measured in volunteers and correlated with gender and levels of BDNF. 61 successive study subjects were randomized into one of four treatment groups: placebo, 0.05 mg / kg of melatonin sublingual (SL), 0.15 mg / kg of melatonin SL or 0.25 mg / kg of melatonin SL, and were tested for thresholds and pain tolerance to thermal and pressure stimuli at baseline and 30 min post intervention. Sedation was quantified by visual analog scale and the bispectral index analysis.

Results: Initial results showed agreement with the literature and adequate reproducibility of thermal pain thresholds in healthy subjects (44.5 ± 2.5 ° C) and in patients with neuropathies of fine fibers (49.9 ± 3 ° C) in separate sessions. When analyzed in a multivariate linear regression model, the thermal and pressure pain thresholds showed a significant effect of gender ($p = 0.01$ for both models), BDNF ($p < 0.04$ for both models) and correlation between BDNF and gender (< 0.001 for both models). High levels of BDNF were correlated with high pain threshold in women and this relationship was reversed in men. In the study with melatonin, plasma levels were proportional to dose, and linear regression model showed a

relationship between serum melatonin and changes in thresholds ($R^2 = 0.56$ for pain threshold to thermal stimulation and $R^2 = 0.518$ for the threshold of pain on pressure algometry). A single dose of melatonin at or above 0.15 mg / kg led to a delta average pain thresholds to thermal stimulation and a pressure greater than placebo (MANOVA, $p < 0.05$ for all analyzes). Furthermore, a dose equal to or greater than 0.15 mg / kg produced the highest score of sedation.

Conclusion: The heat pain stimulator produces reliable results for assessment of nociceptive pathways in healthy volunteers and in patients with sensory changes. BDNF has a facilitatory effect on pain thresholds in women, but has the opposite effect in men, supporting the idea that it modifies the effect gender has on the threshold of pain. Melatonin has a dose-dependent analgesic effect in the experimental pain model developed, there was no correlation between plasma concentration and changes in the thresholds evaluated. The appropriate pharmacokinetic profile, and the absence of significant side effects reinforce its consideration as a pain modulator drug.

Keywords: Pain threshold, pain pathway, gender, BDNF, melatonin, pain modulation, dose-response curve.

LISTA DE TABELAS

Revisão da literatura

Tabela 1. Modelos de dor em humanos e suas respectivas vias de ativação	32
Tabela 2. Sumário dos estudos com administração central ou periférica de doses supra-fisiológicas de melatonina ou análogos em modelos animais de dor aguda, inflamatória e neuropática.	45
Tabela 3. Efeito da melatonina como pré-medicação no controle da dor aguda pós-operatória.....	50

Artigo 1 (publicado nos Arquivos de Neuropsiquiatria 2011;69:943-948)

Table. Mean and standard deviation values for thermoalgesic thresholds and correlation coefficients between quantitative sensory testing sessions.....	80
--	----

Artigo 2 (publicado em Neuroscience Letters 2012;514:62-66)

Table 1. Characteristics of the sample (n = 49).....	96
Table 2. Multivariate linear regression of the interaction between BDNF and pain thresholds by gender (n = 47).....	97

Artigo 3 (submetido ao British Journal of Clinical Pharmacology)

Table 1. Demographic data and psychological profiles (n=61).....	118
Table 2. The mean delta score (SD) (post-treatment values minus pre-treatment values) of the pressure and heat pain threshold, the pressure pain tolerance (PPTo) and the heat pain tolerance (HPTo) tests or sedation score (n=61).	119

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam esta tese.	24
Figura 2. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam a primeira seção desta tese.....	24
Figura 3. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam a segunda seção desta tese.....	25
Figura 4. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam a terceira seção desta tese.....	25
Figura 5. Distintos nociceptores detectam diferentes tipos de dor.	28
Figura 6. Diagrama as variáveis envolvidas entre a execução e os desfechos medidos nos estudos experimentais em animais, em humanos e em estudos clínicos.....	31
Figura 7. Genes envolvidos na transdução, percepção e modulação da dor.	35
Figura 8. Potencialização da transmissão glutamatérgica pelo BDNF.....	40
Figura 9. Modulação da neurotransmissão inibitória no corno dorsal da medula mediada pelo BDNF.	41
Figura 10. Mecanismos antinociceptivos da melatonina:	48
Figura 11. Marco Teórico	52

Artigo 1 (publicado nos Arquivos de Neuropsiquiatria 2011;69:943-948)

Fig 1. The most common quantitative sensory testing abnormalities in different clinical conditions.....	74
Fig 2. Quantitative sensory testing devices: [A] Thermode; [B] Position of the thermode in the arm; [C] Electronic visual analogue scale.....	75
Fig 3. The quantitative sensory testing set up scheme.	76

Fig 4. Thermal thresholds in normal subjects [A] and patients with small fiber disease [B]. Note higher thresholds for warm and pain sensation in a illustrative patient.	78
Fig 5. Thermography recording after heat pain stimulation. Note the size of the thermode imprinting in the skin and the actual achieved temperature.	79
Fig 6. Long painful stimulation. Note the lower thermal thresholds of illustrative patient [B] in comparison with a control subject [A]. Also, note the persistency pain perception (black arrow) even after the stimulus has ceased.....	79

Artigo 3 (submetido ao British Journal of Clinical Pharmacology)

Figure 1. Flow and number of patients in each phase of the study	121
Figure 2. Comparison of the mean concentration achieved 30 min following sublingual doses of 0.05, 0.15 or .25 mg/kg (n=61).	122
Figure 3 (A and B). The effect on pain pressure and the heat threshold expressed as the delta mean pain threshold (post-melatonin minus pre-melatonin) of all of the volunteers (n = 61).	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
AMPcíclico	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ASICs	<i>Acid-sensing ion channel 2</i>
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CIDN	Controle inibitório difuso nociceptivo
COMT	Catechol-O- methyl transferase
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CREB	<i>AMPC response element-binding</i>
EAV	Escala análogo-visual
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
HIOMT	Hydroxyindole-O-methyltransferase
i.c.v.	Intracerebroventricular
iNOS	Óxido-sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratecal
LTP	<i>long-term potentiation</i>
IM	Intramuscular
MAP-quinase	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MEK	(MAPK/ERK kinase) – <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
MT	Receptor melatonérgico
NAT	Serotonina-N-acetyl transferase
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	N-metil-D-aspartato

OPRM	Gene do receptor Mu-opioide
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
POMC	Pró-opiomelanocortina
QST	<i>Quantitative Sensory Testing</i>
SL	Sublingual
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo genético de base única
TQS	Teste de Quantificação Sensitiva
TrkB	<i>Tropomyosine receptor kinase B</i>
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
TRPV8	<i>Cold and menthol receptor 8</i>
v.o.	Via oral
5-LOX	5-lipoxigenase

TERMOS E DEFINIÇÕES

Abaixo estão descritos alguns termos que serão usados com frequência nesta tese.

- **Alodinia:** dor provocada por um estímulo normalmente inócuo (1).
- **Estímulo supra limiar:** É aquele de intensidade maior que o limiar cujas respostas são mais intensas, pelo fato de ser capaz de despolarizar maior número de fibras nervosas do que o estímulo limiar (2).
- **Hiperalgisia:** um aumento na percepção da dor provocada por um estímulo doloroso (1).
- **Limiar de Dor:** a mínima energia necessária para atingir a percepção da dor (3).
- **Método Psicofísico:** mensuração da dor baseada na experiência subjetiva, medida em escalas ou limiares e dependente da cooperação dos sujeitos (4).
- **Neuromatriz:** múltiplas áreas cerebrais implicadas nas respostas afetivas, cognitivas e avaliativas da dor (5, 6).
- **Nociceptores:** subpopulação de neurônios localizados na pele, músculos, vísceras, articulações e vasos, sensíveis a estímulos agressores térmicos, químicos ou mecânicos. Em tecidos normais os nociceptores são inativos até que sejam estimulados por energia suficiente para suplantar seu potencial de repouso (7).
- **Somação Temporal:** Ocorre quando estímulos repetidos de mesma intensidade se tornam progressivamente mais dolorosos (2).
- **Teste de Quantificação Sensitiva:** método constituído por uma série de testes psicofísicos aplicados em diferentes tecidos para acessar a função sensitiva e as viasnociceptivas (8).
- **Tolerância a Dor:** quantidade de energia (mecânica, térmica) diante da qual a dor se torna insuportável (2).

- **Transdução:** processo pelo qual os nociceptores convertem diferentes formas de estímulo (mecânico, calor, químico, frio) em atividade elétrica (potenciais de ação). Os nociceptores, ao detectar um estímulo, geram potenciais de ação que resultam na percepção da dor (1).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	23
2.2 Mensuração psicofísica da dor	26
2.2.1 A dor além da experiência psicofísica	26
2.2.2 Aspectos fisiológicos da transdução da resposta aos estímulos álgicos padronizados	26
2.2.3 O papel do estudo psicofísico da dor	30
2.2.4 Quantitative Sensory Testing (QST).....	32
2.3 Parâmetros biológicos relacionados ao limiar de dor	34
2.3.1 Parâmetros biológicos não-modificáveis: genética, gênero	34
2.3.2 BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) e sua influência no limiar nociceptivo	38
2.4 Modulação da nocicepção e sistema melatonérgico	42
2.4.1 A nocicepção como parte integrante de múltiplos sistemas.....	42
2.4.2 Melatonina: um neurohormônio que modula o processo nociceptivo	42
2.4.3 Evidências pré-clínicas do efeito antinociceptivo da melatonina.....	43
2.4.4 Evidências clínicas do efeito analgésico da melatonina.....	49
3 MARCO TEÓRICO	52
4 JUSTIFICATIVA	53
5 OBJETIVOS	54
5.1 Objetivo geral.....	54
5.2 Objetivos específicos.....	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO	55
7 ARTIGOS	71
7.1 Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies (Arquivos de Neuropsiquiatria 2011;69:943-948)	71
7.2 BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects (Neuroscience Letters 2012;514:62-66)	84

7.3 A phase II, randomized, double-blind, placebo controlled, dose-response trial of melatonin on the pain threshold in healthy subjects(submetido ao British Journal of Clinical Pharmacology)	103
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
8.1 Conclusão.....	130
8.2 Perspectivas	130
9 ANEXOS.....	133
9.1 Consentimento informado.....	133
9.2 Protocolo.....	134

1 INTRODUÇÃO

A dor não é um evento estático, e sim um processo plástico e dinâmico com inúmeros pontos de ativação e modulação. Em indivíduos saudáveis, a dor aguda é um sinal do dano tecidual que reduz o limiar aos estímulos e aumenta sua responsividade na área injuriada. Essa hipersensibilidade é expressão da plasticidade neural adaptativa.

A mensuração da dor é bastante complexa visto os múltiplos eventos biológicos que interferem nos processos sucessivos de transdução, transmissão, modulação e percepção. No contexto clínico, variáveis inerentes à doença de base, como reações sistêmicas diversas, uso de múltiplos fármacos, além de fatores psicológicos, cognitivos e sociais que fazem parte do sofrimento global do paciente contribuem para a percepção final desse fenômeno (2).

Nas últimas duas décadas, vimos um imenso progresso em direção à elucidação dos mecanismos implicados na gênese e manutenção da dor, tanto na área de experimentação animal como em estudos clínicos. E, juntamente com esses avanços, perguntas há muito tempo objeto de inúmeras discussões, começaram a ser respondidas: como podemos mensurar este fenômeno? como podemos tornar essa medida mais objetiva a ponto de contribuir para esclarecer ainda mais os seus complexos mecanismos e respostas terapêuticas?

Enquanto a pesquisa básica busca respostas tentando desvendar os mecanismos envolvidos na nocicepção e seus múltiplos passos até o processamento da dor em nível espinhal e central, a pesquisa clínica visa à integração desses processos com os possíveis alvos e estratégias terapêuticas para modificação de desfechos relacionados à dor. No entanto, sabemos que os dados sobre nocicepção oriundos de modelos animais têm limitações à transposição para o cenário clínico. Embora os experimentos em animais permitam avaliar a atividade nociceptiva neuronal e respostas comportamentais, a avaliação da dor *per se* envolve aspectos multidimensionais e subjetivos decorrentes da ativação da neuromatriz da dor (múltiplas áreas cerebrais implicadas nas respostas afetivas, cognitivas e

avaliativas da dor) (5, 6). E foram essas limitações que impulsionaram o surgimento dos modelos de dor experimental em humanos. Esses modelos, através da ativação de diferentes nociceptores, podendo evocar a dor por variados mecanismos, buscam avaliar vias específicas da condução nociceptiva. Eles precedem a aplicação clínica, visto que o estudo de fármacos em condições reproduzíveis, controlado para grande parte dos confundidores, em pessoas saudáveis, torna mais próxima a compreensão desse fenômeno multifacetado e mais transparente a interpretação e detecção dos seus efeitos (9).

Os desfechos obtidos nesses tipos de estudos englobam respostas psicofísicas (baseadas na experiência subjetiva da dor, medidas em escalas ou através de limiares e dependentes da cooperação dos sujeitos) ou neurofisiológicas (medidas involuntárias, como reflexos de retirada ou potenciais evocados cerebrais) (4).

Dentre as tecnologias acessíveis para as mensurações psicofísicas, o Teste de Quantificação Sensitiva (*Quantitative Sensory Testing- QST*), conjunto constituído por uma série de testes psicofísicos aplicados em diferentes tecidos e usado para acessar a função sensitiva e as vias nociceptivas constitui o padrão atual dos estudos que incorporam alguma forma de avaliação nociceptiva (10). Ele permite, através de técnicas sistematizadas, identificar fatores implicados na resposta dolorosa, bem como estimar o efeito de novas estratégias terapêuticas (11). Essa tecnologia, no entanto, não se encontra acessível na maior parte dos laboratórios, visto o alto custo agregado.

Apesar da grande evolução do conhecimento na área de avaliação sensorial e do aperfeiçoamento dos desfechos que fornecem uma estimativa integrada da experiência sensitiva, os mecanismos responsáveis pela dor ou pela resposta diferenciada a um tratamento não podem ser identificados usando-se apenas medidas psicofísicas (12). A variabilidade individual relativa à experiência dolorosa é mediada por complexas interações entre a genética e fatores biopsicossociais, como sexo, raça, personalidade, idade, estado de humor, estresse e inúmeros fatores biológicos transitórios (13-15). O avanço da medicina biomolecular aponta uma série de mediadores e circuitos de alta plasticidade, os quais estão sendo tratados como alvos terapêuticos potenciais, antes não reconhecidos como parte do

sistema nociceptivo. Neuromoduladores como BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) têm sido alvo de estudos que buscam entender essa variabilidade já que possuem importante papel na regulação da função, do crescimento e da diferenciação neuronal (16, 17). Além disso, funcionam como moduladores das sinapses, influenciando sua eficiência a curto e longo prazos (18, 19).

Outra substância implicada na regulação de múltiplas funções, muitas não relacionadas a vias nociceptivas classicamente descritas, é a melatonina (20). O grupo de Dor e Neuromodulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, do qual faz parte a autora deste trabalho, demonstrou efeito analgésico desse neuro-hormônio em dose única pré-operatória (21-23), no entanto não se tem conhecimento de seu comportamento em modelos experimentais de dor que permitem avaliar o efeito dose-dependente, cujo conhecimento é essencial para definição de doses de acordo com o efeito clínico observado.

Visando responder algumas questões nesta área, o presente estudo objetivou desenvolver um aparato para avaliar o limiar de dor, estudar parâmetros biológicos relacionados a esse limiar e avaliar a curva dose-resposta da melatonina.

Esta tese originou três artigos:

- O primeiro, referente à validação do equipamento para realização do QST por nós desenvolvido e intitulado: **Validation of a Brazilian Quantitative Sensory Testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies**, foi publicado no Arquivos de Neuropsiquiatria 2011;69(6):943-948;

- O segundo, referente à relação entre BDNF, gênero e limiares de dor e intitulado: **BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects**, foi publicado na Neuroscience Letters 2012; 514:62-66;

- O terceiro, intitulado **A phase II, randomized, double-blind, placebo controlled, dose-response trial of melatonin on the pain threshold in healthy subjects**, submetido à apreciação e possível publicação pela revista British Journal of Clinical Pharmacology.

A estrutura da apresentação deste trabalho 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 as informações

Nesta revisão da literatura, abordamos alguns aspectos sobre o estudo psicofísico da dor e os equipamentos utilizados para medir os limiares de dor, assim como os parâmetros associados aos limiares de dor e o papel antinociceptivo de sistemas modulatórios como a melatonina.

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (*site* PubMed), LILACS, SCIELO, Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações, Portal Domínio Público e portal Cochrane.

As referências bibliográficas dos artigos identificados foram revisadas para localizar outras não contempladas na busca. Também foram utilizados livros-texto. Nos *sites* PubMed, LILACS e SCIELO foram realizadas buscas com palavras-chave, que estão divididas por seções, as quais originaram os três artigos que compõem a presente tese.

Através dos termos “*nociceptive pathway*”, “*psychofysics*”, “*heat pain stimulation*” e “*quantitative sensory testing*” foram realizadas as buscas e os cruzamentos, sendo que dos 56 artigos revisados 20 tratavam especificamente do tema abordado na seção 2.2: Mensuração Psicofísica da Dor.

Usando os termos “*pain threshold*”, “*pain modulation*”, “*gender*” e “*BDNF*” foram realizadas as buscas e os cruzamentos, sendo que, dos 99 artigos revisados, 52 se relacionavam especificamente ao tema tratado na seção 2.3: Parâmetros Biológicos Relacionados ao Limiar de Dor.

E, finalmente, cruzando-se os termos “*pain*”, “*melatonin*”, “*pain threshold*”, “*clinical trial*” e “*dose-response-curve*”, obtivemos 345 artigos. Desse total apenas 60 tratavam especificamente do tema desenvolvido na seção 2.4: Melatonina e o processo nociceptivo, sendo subdivididos em 11 artigos de revisão, 40 estudos experimentais (pré-clínicos) e 9 ensaios clínicos.

Do banco de teses da CAPES, foram localizada seis teses com o tema melatonina e dor e uma tese com o tema limiar de dor e melatonina. Para apresentar o tema, usamos a revisão sistemática esquematizada nas figuras 1, 2, 3 e 4.

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

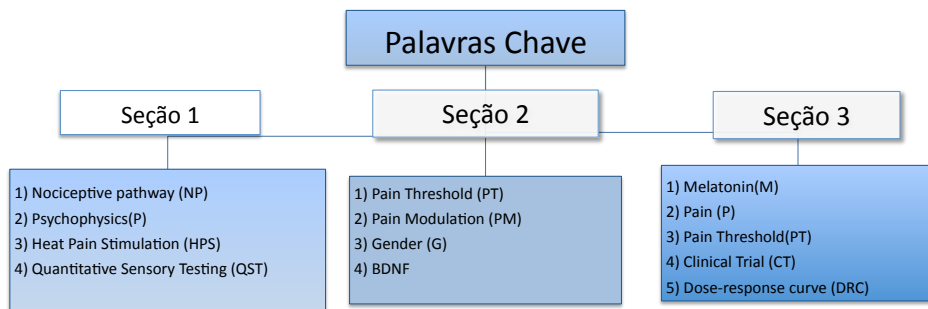


Figura 2. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam a primeira seção desta tese.

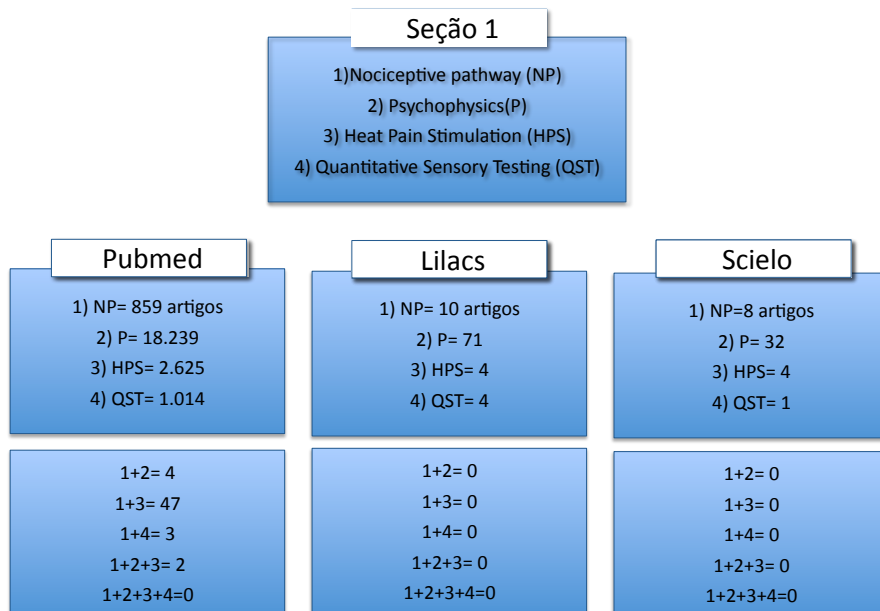


Figura 3. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam a segunda seção desta tese.

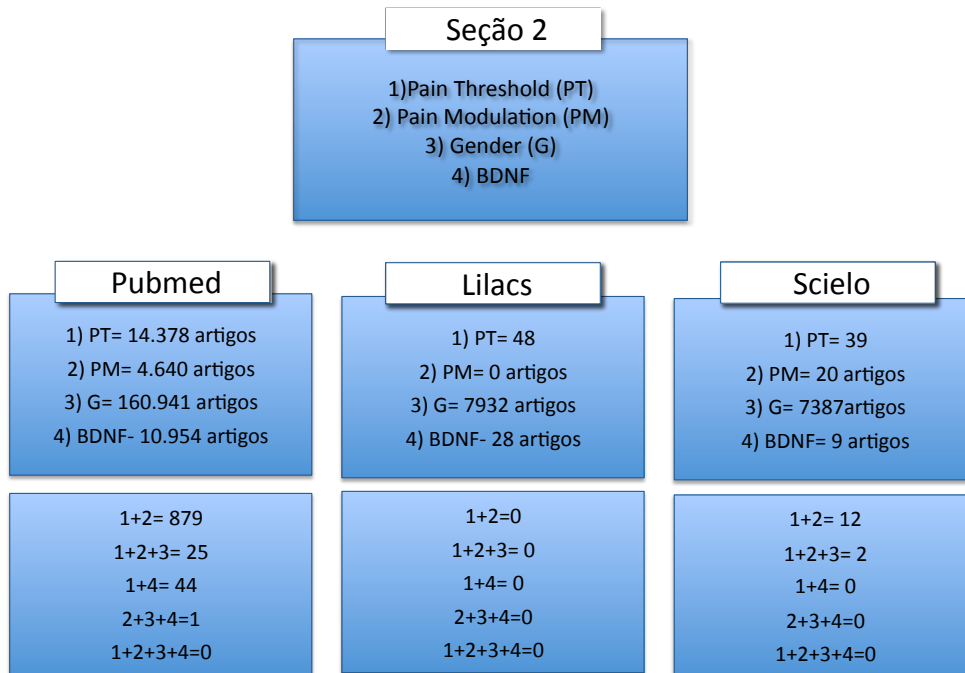
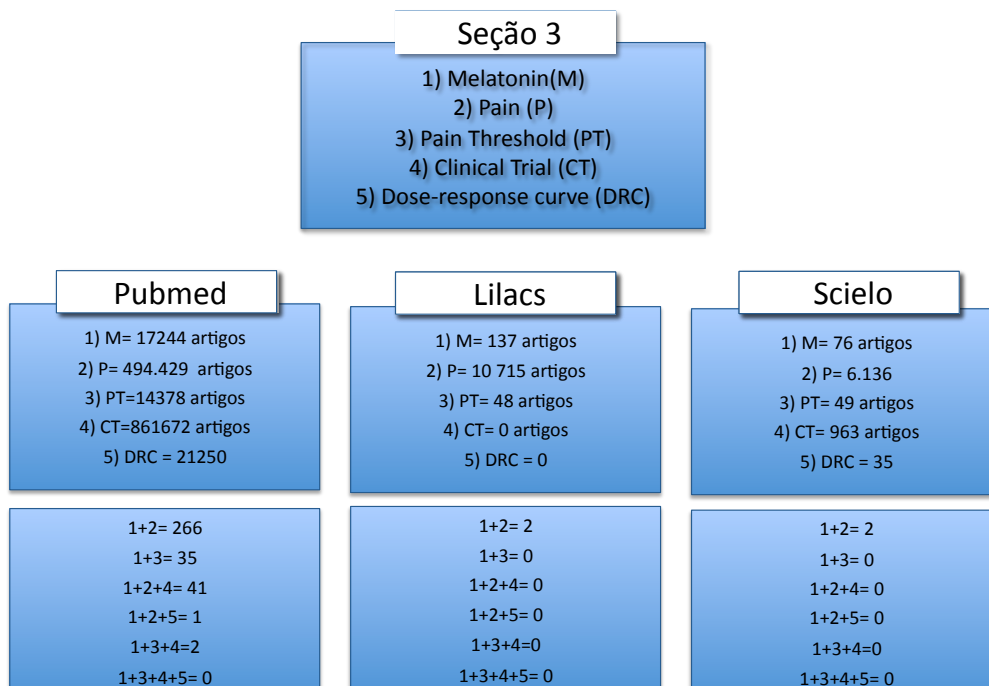


Figura 4. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam a terceira seção desta tese.



2.2 Mensuração psicofísica da dor

2.2.1 A dor além da experiência psicofísica

A dor não tem definição simples. A visão simplista clássica proposta por Descartes de que a injúria ativa receptores específicos que levam informação até o sistema nervoso central (SNC) muito foi aprimorada, e assume-se atualmente que nem sempre a dor é proporcional ao dano. Melzack e Wall (24), com a teoria do portão e a sua ênfase nos mecanismos de modulação, propiciaram a contribuição mais revolucionária para o entendimento da dor. Essa teoria consagrou o cérebro como um sistema ativo que filtra, seleciona e modula as aferências nociceptivas. A medula espinhal também deixou de ser vista como elemento de transmissão passiva, sendo alvo de intensa modulação dinâmica de todo o processo. A segunda grande contribuição de Melzack (5) ocorreu em 1999 quando lançou a teoria na neuromatriz, segundo a qual o processo doloroso ativa múltiplas áreas cerebrais. Estudos de imagem identificaram regiões constantemente ativadas no processo nociceptivo agudo, como córtex somatossensorial primário e secundário, córtex insular, córtex pré-frontal, cíngulo anterior e tálamo. Essas regiões estão envolvidas em outras funções fisiológicas, como cognição, emoção e motivação e têm papel na modulação da experiência nociceptiva (25).

Sabemos também que uma experiência dolorosa pode ocorrer sem aferência nociceptiva primária tornando evidente que o processamento central pode ser independente da relação psicofísica entre a injúria e a dor (26).

Portanto, a dor depende de amplas redes neurais cerebrais e deve ser vista como um processo de percepção associado à consciência, influenciado por memórias, emoções, doenças e fatores genéticos e cognitivos (25).

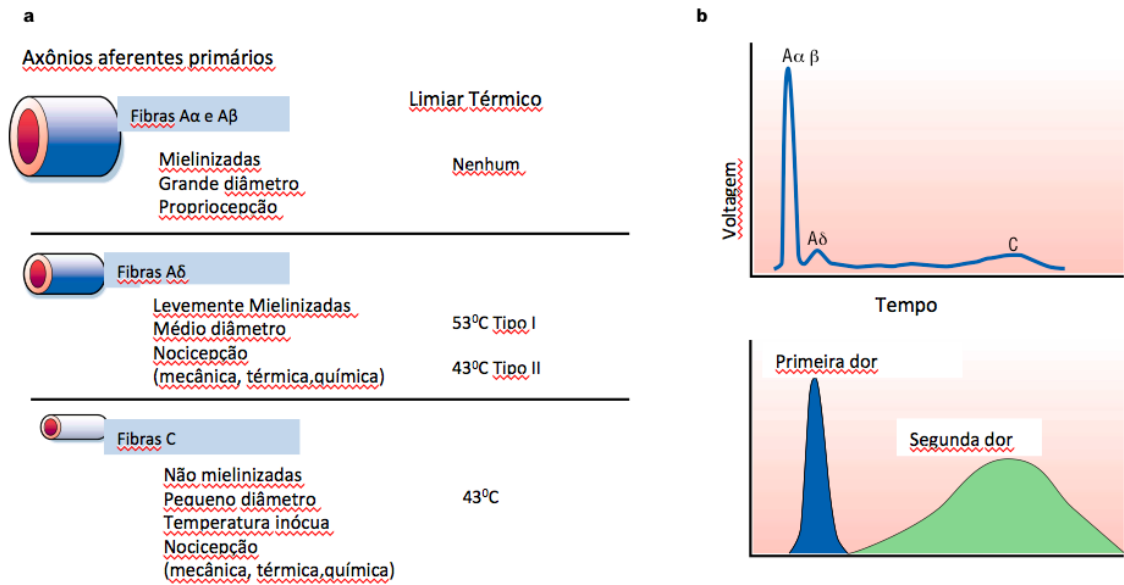
2.2.2 Aspectos fisiológicos da transdução da resposta aos estímulos algícos padronizados

A mensuração da dor através de testes padronizados objetiva ativar diferentes nociceptores, evocar a dor em diferentes tecidos e ativar vias específicas da condução

sensitiva (4). O resultado final desse processo, aferido em respostas supostamente objetivas, como os limiares e tolerância, reflete uma cascata de eventos que inicia na sinalização nociceptiva. E o conhecimento das bases moleculares que constituem essa etapa tem avançado através de métodos eletrofisiológicos, farmacológicos e genéticos que objetivam tornar mais claro os mecanismos de conversão dos diversos estímulos em sinais eletroquímicos.

O complexo aparato de transdução dos neurônios nociceptivos primários, através da ativação de receptores específicos, permite que a célula integre informações e responda a alterações complexas do meio (27). O conceito de que diferentes classes de fibras nervosas periféricas conduzem sinais dolorosos foi formulado primeiramente por Sherrington (28) em 1906, e desde então várias classes de fibras nervosas têm sido descritas. As duas maiores classes de nociceptores incluem fibras de médio diâmetro, mielinizadas (A δ), que medeiam a dor aguda e bem localizada, conhecida como primeira dor, e pequenas fibras não mielinizadas C, as quais respondem a estímulos variados, são mais lentas e transmitem a dor surda, dolente, a segunda dor (27). Ambas as fibras são heterogêneas, sendo as do subtipo A δ subdivididas em: tipo I, as quais respondem a estímulos mecânicos e químicos, têm limiares relativamente altos ao calor (>50°C) e breve latência, e tipo II, que possuem limiar térmico mais baixo e alto limiar mecânico, sendo sua atividade responsável pela primeira dor aguda ao estímulo térmico (figura 5). A maioria das fibras C são também polimodais, isto é, respondem a estímulos variados (29), ou desenvolvem a capacidade de responder dependendo do meio (dano tecidual) (30).

Figura 5. Distintos nociceptores detectam diferentes tipos de dor.



a) Nervos periféricos são compostos por fibras aferentes mielinizadas de pequeno (Aδ) e maior diâmetro (Aα, β). b) O potencial de ação de um nervo periférico ilustra a relação entre a velocidade de condução e o diâmetro da fibra. A maioria dos nociceptores são fibras Aδ ou C e as suas respectivas velocidades de condução ($6-25$ e $1,0 \text{ m s}^{-1}$) são responsáveis pela primeira (rápida) e segunda (lenta) resposta à dor.

Fonte: Figura adaptada de Julius e Basbaum (27)

A caracterização neuroanatômica desses nociceptores confirma a heterogeneidade particularmente das fibras C que podem ser divididas em peptidérgicas (liberam peptídeos como substância P) e não peptidérgicas, que expressam receptores específicos de neurotrofinas e de purinas (31).

Além disso, os nociceptores são diferenciados de acordo com a expressão dos canais que conferem sensibilidade ao calor (*transient receptor potential vanilloid 1-TRPV1*), ao frio (*cold and menthol receptor 8-TRPV8*), meio ácido (*acid-sensing ion channel 2 - ASICs*) e a irritantes químicos (*transient receptor potential - TRPA1*). Essa heterogeneidade funcional e molecular dos nociceptores está associada à detecção de modalidades distintas de dor (27). Foi a identificação molecular do receptor para capsaicina, ingrediente picante da pimenta, que produz dor em queimação pela despolarização de subtipos de nociceptores C e Aδ através da ativação de receptores específicos TRPV1, que permitiu o avanço do

conhecimento no campo da transdução térmica (32). O fato de o TRPV1 ser expresso na maioria dos nociceptores termossensíveis suporta a hipótese de que esse é um transdutor endógeno do estímulo térmico doloroso. Entretanto, outros subtipos de canais TRPV, incluindo 2, 3, e 4, acompanham a atividade dos TRPV1 e são candidatos a transdutores de outras intensidades de estímulos, como temperaturas superiores a 50°C e inferiores a 30°C (27).

Essa multiplicidade de receptores explica, ao menos em parte, a ativação diferencial que o mesmo estímulo, em intensidade diferente, pode provocar. E isso é potencialmente visto quando há um estímulo térmico ascendente, pois a velocidade de aquecimento determina o tipo de fibra a ser ativado (6).

Quando a velocidade de ascensão da temperatura é alta (6,5°C/seg), ocorre ativação preferencial das fibras A- δ sentida dentro de 0,4 seg após o estímulo (33), correspondendo essa sensação à primeira dor; quando a velocidade de ascensão é mais lenta (1°C /seg), a ativação é de fibras C preferencialmente, e ocorre a sensação conhecida como dor secundária (9). A dor provocada por estímulos de intensidade superior ao limiar é mediada por nociceptores C e A- δ (34) ao passo que provavelmente apenas as fibras C são estimuladas quando se detecta o limiar, pois sua unidade-limiar é menor do a das fibras A- δ (35).

As projeções dessas fibras nociceptivas primárias ao corno dorsal da medula são organizadas em lâminas distintas, sendo que das lâminas I e V saem as principais vias ascendentes: os tratos espinotalâmico e espinoreticular, que levam informações ao tálamo e ao tronco respectivamente (36). Essas regiões, antes consideradas apenas passagem do estímulo, são alvo de importantes sistemas modulatórios. No entanto, apenas quando o estímulo atinge o córtex ocorre a experiência definitiva da dor. Por essa razão, o termo nocicepção difere do termo dor, o qual engloba a complexa rede cortical e subcortical de vários centros que constituem a neuromatriz, ativada após a injúria. Essa denominação não compreende uma região estática e sim um substrato ativamente modulado por várias regiões cerebrais, responsável, ao menos em grande parte, pela experiência dolorosa.

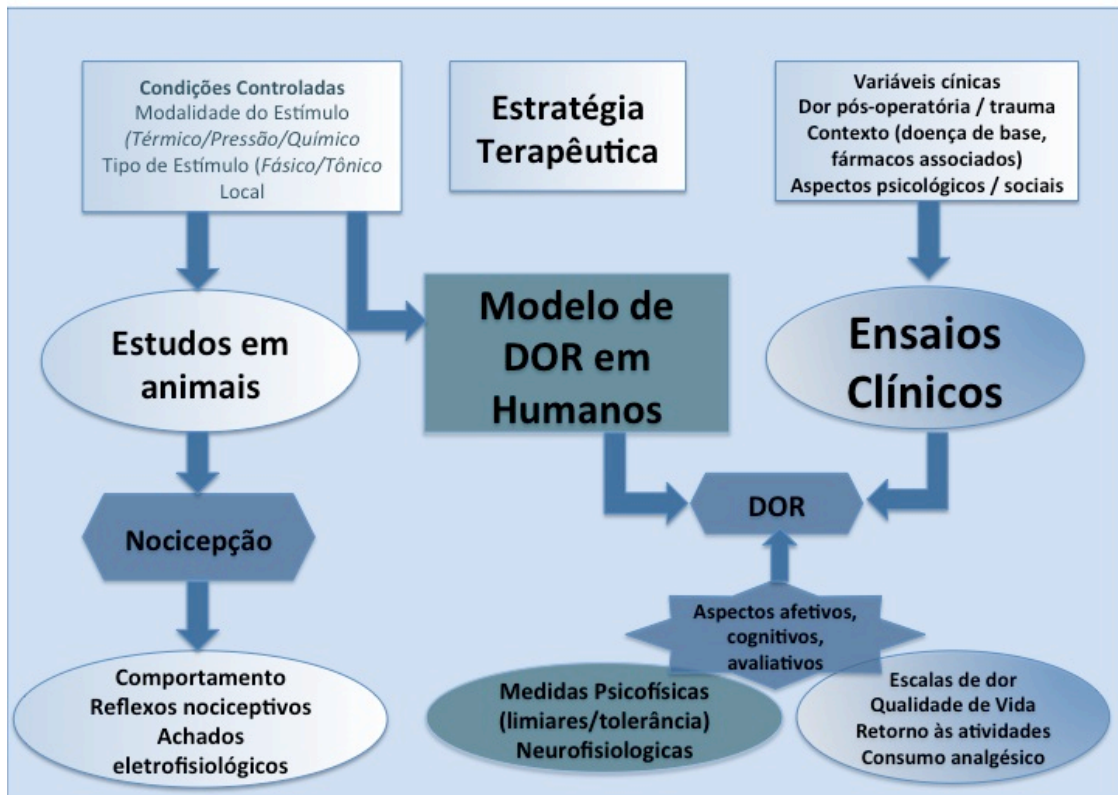
Contudo, mais do que atribuir rótulos a regiões específicas, o que se busca é entender o comportamento diferencial dessa ativação em cada indivíduo (*pain signature*) (25).

2.2.3 O papel do estudo psicofísico da dor

Sabemos que a experiência individual relativa a dor varia intensamente, mesmo em situações nas quais a severidade da injúria é bastante similar. No entanto, o aperfeiçoamento dos estudos clínicos, e a implementação de desfechos mais consistentes que permitem a adequada quantificação da dor e de desfechos a ela relacionados, levaram à sofisticação na metodologia dos ensaios. A integração dos modelos de dor experimental como parte do estudo de fármacos e estratégias terapêuticas consolidou novos paradigmas no estudo da dor (10, 37). Com esses modelos pode-se controlar a dor induzida experimentalmente (tipo de estímulo, local, intensidade, frequência e duração), selecionar os indivíduos e estabelecer os desfechos. Esses englobam respostas psicofísicas (baseadas na experiência subjetiva da dor, medidas em escalas ou através de limiares e dependentes da cooperação dos sujeitos) ou neurofisiológicas (medidas involuntárias como reflexos de retirada ou potenciais evocados cerebrais) (4).

Inúmeras vantagens são obtidas com esses modelos, que têm funcionado como passo intermediário entre a pesquisa em animais e os ensaios clínicos: *i*) possibilitam a realização de investigação sobre mecanismos de ação dos analgésicos e permitem estudar parâmetros farmacológicos como curva dose-resposta; *ii*) permitem quantificar efeitos adversos; *iii*) suprimem os vieses inerentes aos estudos clínicos, como alterações dos estados psicológicos, cognitivos e sociais, assim como reações sistêmicas relacionadas às doenças; *iv*) possibilitam o estudo de fármacos que apresentam grandes diferenças entre as espécies (por exemplo: efeito significativo em ratos e ausência de efeito em estudos clínicos) (10) (figura 6).

Figura 6. Diagrama as variáveis envolvidas entre a execução e os desfechos medidos nos estudos experimentais em animais, em humanos e em estudos clínicos.



Entretanto, há grande variabilidade entre os modelos utilizados. Estudos em animais mostram que certos testes são mais adequados para detectar atividade e eficácia clínica de alguns fármacos ou classes de fármacos. Por exemplo, o teste de retirada da cauda ao estímulo térmico é um teste de comportamento defensivo usado para avaliar efeito dos opioides, mas não é responsivo aos anti-inflamatórios. Por isso é recomendada a realização de múltiplos testes sempre que possível (38). E esse preceito se estende aos testes de dor em humanos. O modelo de dor ideal em humanos deve ativar diferentes nociceptores e evocar dor através de diferentes tecidos, ativando vias e mecanismos específicos (4) (tabela 1). No entanto, nem sempre isso é factível, razão pela qual a escolha do modelo deve se adequar aos objetivos do estudo, englobando possíveis vias ativadas ou moduladas pelos fármacos ou estratégias terapêuticas em questão.

Tabela 1. Modelos de dor em humanos e suas respectivas vias de ativação (4, 37, 39).

Tipo de estímulo	Modelo	Mecanismo proposto	Respostas Avaliadas
Mecânico	Toque	Fibras A β	Percepção normal ou abolida
	Picada	Fibras A δ	Percepção normal, ↓, abolida
	Algometria de pressão	Fibras C, A δ	Limiar, Tolerância
Térmico	Calor (Termodo Peltier)	Fibras C	Limiar
	Dor (Termodo Peltier)	A δ tipos I e II (aquecimento rápido), C (aquecimento lento), receptores TRPV1 e TRPV2	Limiar, Tolerância, EAV
	Frio	Fibras A δ , C, (receptores TRPV8, TRPA1)	Percepção normal, ↓, abolida
	Água gelada	Ativação do sistema inibitório difuso	Tempo de tolerância, EAV
Elétrico	Estímulo simples	Transpassa os nociceptores, estímulo direto das fibras	Limiar, Tolerância, Reflexo
	Estímulos repetidos (somação temporal)	Avalia sensibilização central	Potenciais cerebrais
Químico	Capsaicina + estímulo térmico	Fibras C	Hiperalgisia e alodinea
	Salina hipertônica IM	Fibras C	EAV, área sob a curva

Canais que conferem sensibilidade ao calor (TRPV1 e TRPV2), irritantes químicos (TRPA1) e frio e menta (TRPV8), IM: intramuscular, EAV: escala análogo-visual

2.2.4 Quantitative Sensory Testing (QST)

Para ser adequado, o estímulo precisa ser quantificável, reproduzível e não invasivo (6, 40). Essas são características dos estímulos produzidos no paradigma do Teste de Quantificação Sensitiva (em inglês: *Quantitative Sensory Testing* – QST). Embora esse

método incorpore informações de fibras grossas avaliadas através de estímulo tátil e vibratório, QST é normalmente usado para avaliação do sistema nociceptivo e das fibras finas através de estímulo térmico controlado. Os resultados do QST representam a percepção subjetiva do estímulo termoalgésico. Se fora dos padrões normais, pode sinalizar disfunção ao longo do sistema nociceptivo, entre os receptores térmicos até áreas corticais.

Apesar da consolidação do QST como um dos principais métodos usados nos modelos experimentais de dor em humanos, os equipamentos que permitem a sua realização são bastante restritos devido a complexa tecnologia e custo que os acompanham (41). Os instrumentos modernos automatizados para avaliar a dor produzida através do estímulo térmico incorporam um módulo termoelétrico que utiliza o princípio de Peltier – quando uma corrente passa através de uma placa metálica ocorre aquecimento ou resfriamento dependendo da direção da corrente. O primeiro equipamento a empregar esse princípio para estudos em animais e em humanos foi desenvolvido por Kenshalo *et al.* (42), seguido por modelos comercializáveis como Marstock Stimulator (mais tarde conhecido como Somedic) desenvolvido por Fruhstorfer *et al.* (43). O mais novo aparato é o Thermal Sensory Analyzer (TSA, Medoc, Ramat Yishay, Israel) desenvolvido para aplicar todos os algoritmos de maneira flexível, incluindo novos métodos de mensuração de dor como estimativas supralimiares e somação temporal (3).

Os equipamentos disponíveis diferem em alguns aspectos - como capacidade de aquecimento, velocidade de alteração de temperatura, tamanho dos termodos e variabilidade nos algoritmos empregados - , mas em geral dois esquemas para determinar os limiares de percepção térmica podem ser aplicados: o método de limites e o método de níveis (8, 44, 45). No primeiro, o sujeito é orientado a indicar o momento de percepção do aumento de temperatura. Esse método é considerado resposta-dependente. No segundo, um estímulo de intensidade definida é apresentado e o sujeito sinaliza se uma resposta pré-determinada foi alcançada. Ambos são aplicáveis, no entanto o método de níveis exige maior tempo e não apresenta vantagens substanciais (46). Apesar de serem amplamente utilizados, os equipamentos baseados no princípio de Peltier, assim como outros que

dependem do contato com a pele, possuem alguns pontos a serem considerados. Eles aquecem os receptores termossensíveis através da propriedade de condução da pele e, devido à necessidade de contato, são ativados receptores de menor limiar que fazem parte do controle inibitório da dor (47, 48). Além disso, a superfície fixa e rígida do termodo limita seu uso, especialmente em pequenas superfícies. Também é necessário considerar que a velocidade de transferência do calor é dependente da qualidade do contato termodo-pele e, conseqüentemente, da pressão de aplicação do termodo – um parâmetro difícil de ser controlado (49).

Em virtude da restrição de tais equipamentos e da necessidade de mensuração da dor de maneira reproduzível e confiável, através de método não invasivo, de fácil execução e aplicável a voluntários hígidos ou doentes dentro do contexto da linha de pesquisa do Laboratório de DOR e Neuromodulação do HCPA, surgiu a proposta de desenvolvimento de um aparato que permitisse a realização dos testes de quantificação sensitiva, através de estímulo térmico controlado .

Desse assunto trata o primeiro artigo que faz parte da primeira seção desta tese, intitulado: *Validation of a Brazilian Quantitative Sensory Testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies*, publicado no Arquivos de Neuropsiquiatria 2011;69(6):943-948.

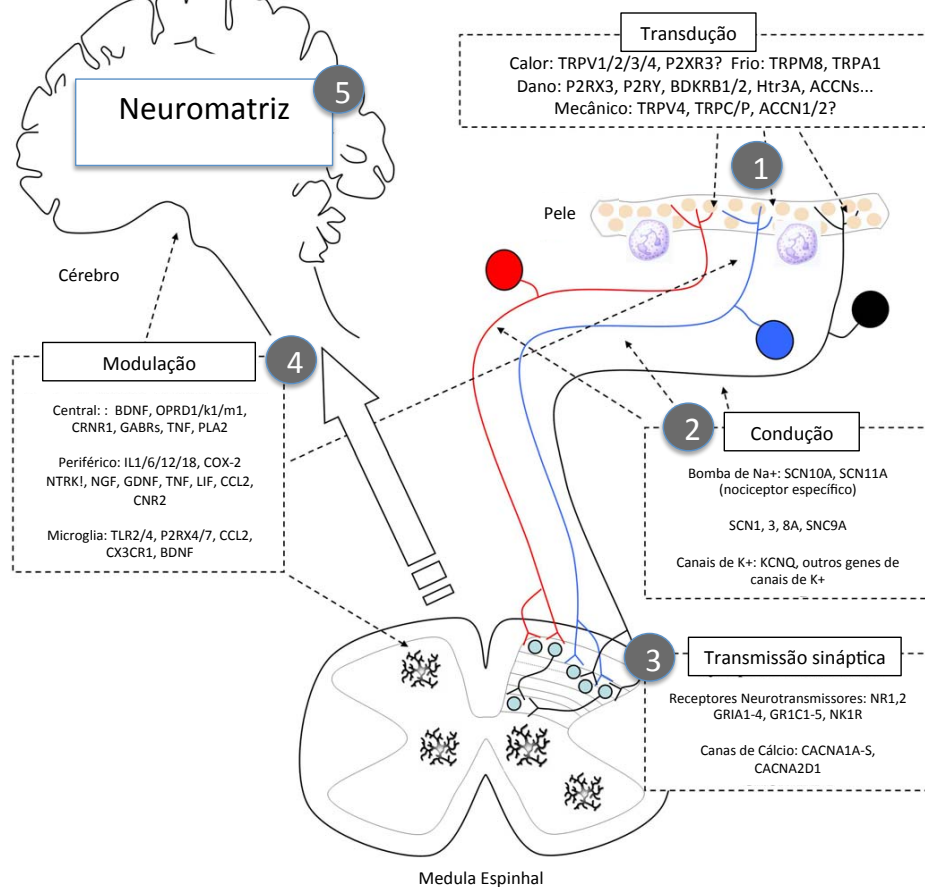
2.3 Parâmetros biológicos relacionados ao limiar de dor

2.3.1 Parâmetros biológicos não-modificáveis: genética, gênero

Há uma grande variabilidade na quantificação da dor em pacientes que apresentam a mesma condição clínica, assim como variam as respostas interindividuais aos mesmos estímulos realizados em ambiente controlado em estudos experimentais (50). Interações de parâmetros biológicos e psicológicos, envolvendo inúmeras proteínas que afetam diferentes estágios do processamento do sinal nociceptivo, desde a transdução até a percepção, estão implicadas nessa multiplicidade de respostas (51, 52). Dentre os parâmetros biológicos

conhecidos, a interação de diferentes genes entre si e com uma diversidade de fatores ambientais pode explicar, ao menos parcialmente, a variabilidade na sensibilidade à dor e na expressão de dor crônica. Em um estudo experimental com gêmeas, por exemplo, 22% a 55% da variabilidade nas respostas do teste quantitativo foram atribuída ao componente genético (53). Os mecanismos implicados na relação percepção de dor / genética parecem ser, ao menos parcialmente, explicados por polimorfismos genéticos. Os polimorfismos genéticos de base única (SNPs) são variações encontradas em inúmeros genes que alteram a expressão de proteínas e receptores implicados na sensibilidade à dor (figura 7). Polimorfismos no gene da COMT (catechol-O-methyltransferase) (50) e no receptor opioide OPRM1, implicado no efeito das endorfinas, são exemplos ligados à variabilidade na dor experimental (54).

Figura 7. Genes envolvidos na transdução, percepção e modulação da dor.



Fonte: Adaptada de Foulkes e Wood (55).

1 Estímulos nociceptivos são detectados por neurônios aferentes primários que inervam a pele, músculo e vísceras. Os corpos celulares desses nociceptores são encontrados nos gânglios da raiz dorsal, sendo comumente divididos em três grupos: fibras C não mielinizadas peptidérgicas (azul, responsivas ao NGF-fator de crescimento do nervo) e não-peptidérgicas (preto, responsivas a GDNF-fator neurotrófico derivado da glia), e fibras A δ -mielinizadas (vermelho, responsivas a NGF). Perfis de expressão gênica diferem entre esses grupos com diferenciação funcional. Receptores especializados, expressos nos terminais periféricos desses neurônios, permitem que os estímulos sofram transdução em impulsos elétricos. Embora a maioria dos nociceptores sejam polimodais (detectam vários estímulos) existem receptores específicos para cada modalidade de estímulo.

2 Canais específicos TRP (transient receptor potential) parecem estar envolvidos na transdução de estímulos térmicos e mecânicos. A despolarização da membrana é transmitida ao longo do axônio por canais de sódio, como NaV1.7 (gene SCN9A) e NaV1.8 (gene SCN10A). A transmissão é modulada pelos canais de potássio que geralmente reduzem a excitabilidade. 3 Nociceptores terminam nas lâminas 1 (fibras A δ) e 2 (fibras C) do corno dorsal, fazendo sinapses com neurônios de projeção ou com neurônios wide dynamics range na lâmina 5. A transmissão sináptica ocorre através de receptores de NMDA, AMPA e cainato além de neuropeptídios e prótons. A liberação de neurotransmissor é controlada por canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes na membrana pré-sináptica. Regulação da intensidade sináptica ocorre através da potencialização a longo prazo (long-term potentiation - LTP), onde estímulos repetidos aumentam as respostas aos estímulos subsequentes. Além disso, a microglia libera Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), fractalkina, e quimiocinas que alteram a excitabilidade dos neurônios espinhais. Vias descendentes do cérebro podem inibir ou facilitar a transmissão nociceptiva. 4 A partir da medula espinhal, a informação é transmitida ao tronco cerebral através de neurônios nociceptivos específicos e de neurônios wide dynamic range. 5 Em seguida, é processada por uma matriz formada por múltiplas regiões cerebrais, resultando na percepção sensório-discriminativo e afetiva da dor.

O gênero, fator não modificável, assim como a genética, sabidamente exerce influência sobre as medidas de dor. Mulheres apresentam mais dor que homens em diferentes estados dolorosos (13, 56, 57), o que é demonstrado pela maior prevalência de algumas dores de origem visceral, como dor pélvica crônica e síndrome do colón irritável (13). Em estudos experimentais, as mulheres apresentam maiores escores de dor

comparadas aos homens para a maior parte das modalidades sendo que a dor à pressão, em particular, parece ser mais sensível às diferenças sexuais (13, 58-60).

Quanto à sensibilidade térmica, a maioria dos estudos incluídos em recente metanálise aponta para menor limiar e tolerância a dor nas mulheres, assim como maior dor em estímulos supralimiais (13) os quais parecem ser mais fidedignos à mensuração algica. Além disso, modelos clinicamente relevantes, recentemente implementados, como somação temporal (61), injeção intramuscular de substâncias algogênicas como glutamato e salina hipertônica (62, 63) e estudos com medidas neurofisiológicas como o reflexo RIII (64, 65) confirmam que o gênero têm influência nas medidas encontradas. Os mecanismos que explicam essa variação nociceptiva parecem ser orquestrados pelas diferenças hormonais entre os gêneros. No entanto, o efeito do ciclo menstrual sobre os níveis de dor apresenta resultados contraditórios, o que pode dever-se a um suposto efeito teto dos hormônios gonadais. Isto é, uma vez que os níveis hormonais já são diferenciados nas mulheres, flutuações pequenas como as que ocorrem no ciclo menstrual seriam insuficientes para influenciar as diferenças nos limiares dolorosos. Todavia, os níveis hormonais parecem exercer influência significativa quando se usam ferramentas psicofísicas avançadas como a avaliação do controle inibitório difuso nociceptivo (CIDN). Recente estudo mostrou que mulheres durante a fase ovulatória apresentaram uma inibição significativamente maior da dor (efetividade do CIDN), em comparação com as fases menstrual e lútea (66).

Diferenças entre os sexos na distribuição, expressão ou sensibilidade dos receptores opioides em várias áreas do SNC envolvidas no processo nociceptivo podem também explicar parte das alterações de sensibilidade vistas entre os gêneros. Ao repouso, mulheres apresentam maior concentração de receptores μ -opioides em várias regiões subcorticais e corticais (67). Estudos experimentais mostram que diferenças na expressão dos receptores são estrógeno-mediadas. Ratas na fase próestro (alta concentração de estrógeno) exibem menor densidade de receptores opioides do que nas fases diestro e metestro, ou do que ratos machos (68). Além disso, ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno diminuem o número de receptores opioides no cérebro, reduzindo o efeito analgésico da morfina (69).

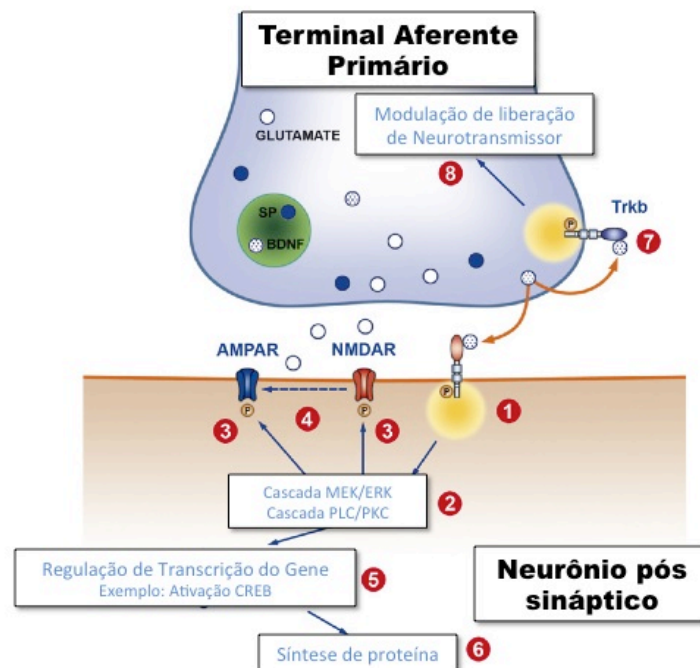
Além disso, foi visto aumento da atividade cerebral em mulheres, secundário a estímulos algícos padronizados, em regiões associadas ao processo doloroso como córtex cingulado (70), pré-frontal, insula e tálamo (71). O aumento da atividade nessas áreas, relacionadas ao componente afetivo/emocional da dor (72), suporta a ideia de que as diferenças relacionadas ao gênero podem ser, ao menos parcialmente, explicadas pela “marca” afetiva associada à sinalização aferente da dor. Outro aspecto a ser considerado diz respeito à ampla distribuição de receptores para estrógenos e andrógenos em regiões centrais envolvidas na dor e na analgesia (substância cinzenta periaquedutal, medula, gânglios da raiz dorsal). A ligação de esteroides a seus receptores nessas regiões provavelmente está envolvida em eventos transcricionais dependentes de ligantes, o que influencia a expressão de diversos neurotransmissores e receptores (73). Por exemplo, os estrógenos aumentam a concentração do fator de crescimento neuronal no gânglio da raiz dorsal (74), induzem a expressão de c-fos no hipocampo e ativam a MAP-quinase (Proteíno-quinases ativadas por mitógenos) um fator de crescimento não relacionado à ativação dos receptores de estrógenos (75). Também foi demonstrado que o estrógeno regula o aumento do RNAm de BDNF em áreas associadas ao processamento nociceptivo, como hipocampo, córtex e medula espinhal (76).

2.3.2 BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) e sua influência no limiar nociceptivo

Essa neurotrofina, liberada pelas fibras nociceptivas aferentes primárias e pela micróglia e codificada pelo gene BDNF, é de nosso particular interesse, pois tem sido fortemente associada à modulação do processo nociceptivo. O BDNF influencia a atividade sináptica a curto e a longo prazo, regulando a atividade neural e a plasticidade relacionada ao receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) em vias nociceptivas ascendentes e descendentes e têm sua ação modulada por inúmeros fatores (77). Marcadores mostram que o BDNF se localiza principalmente nos terminais das lâminas I e II do corno dorsal da medula, onde é armazenado junto com neuropeptídeos como substância P e CGRP (Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (19). Também se encontra em centros integrativos superiores, onde

há abundância de neurônios que expressam BDNF em várias camadas do córtex somatossensorial, e nas vias descendentes relacionadas à modulação supra-espinhal da dor (78, 79). Seu papel na modulação da dor é suportado pela sua liberação basal em nível medular (80) e através do estímulo elétrico de fibras C, com participação de receptores NMDA (81). Em animais, o BDNF e seu receptor estão aumentados em modelo de dor inflamatória (82) e neuropática (83), fato demonstrado pelo aumento de sua concentração em todo corno dorsal após transecção do ciático (80). Em humanos, níveis aumentados de BDNF foram associados com dor na pancreatite crônica (84). Além disso, quando o BDNF é neutralizado por anticorpo anti-BDNF ou receptor seu receptor de alta afinidade TrkB (*tropomyosine receptor kinase B*), ocorre diminuição da alodinia mecânica (85) e da hiperalgesia (86). As figuras mostram a ação pré e pós-sináptica do BDNF, quando liberado no corno dorsal da medula modulando a neurotransmissão excitatória (glutamatérgica) (figura 8) e inibitória (GABAérgica/glicinérgica) (figura 9).

Figura 8. Potencialização da transmissão glutamatérgica pelo BDNF.



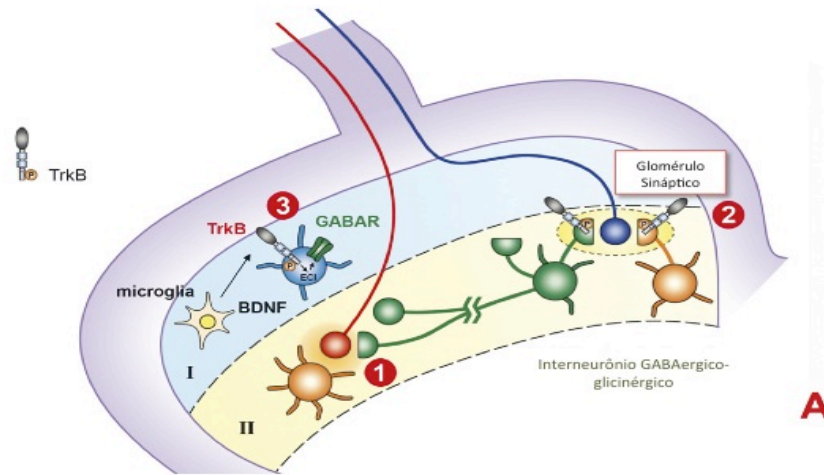
1 BDNF na membrana pós-sináptica, ativa receptores TrkB e 2 desencadeia cascatas do MEK (MAPK/ERK kinase - Extracellular signal-regulated kinases) e PKC/ PLC (Protein Kinase C and Phospholipase C). 3 Segundos mensageiros destas vias fosforilam os receptores NMDA e AMPA modulando sua atividade. 4 Receptores NMDA estão possivelmente envolvidos na potencialização do receptor AMPA induzida pelo BDNF.

5 6 Segundos mensageiros também regulam a transcrição gênica e síntese proteica.

7 8 A ativação trkB pelo BDNF no nível pré-sináptico leva à modulação da liberação do neurotransmissor.

Fonte: Figura modificada de Merigui et al (19).

Figura 9. Modulação da neurotransmissão inibitória no corno dorsal da medula mediada pelo BDNF.



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

Fonte: Figura modificada de Merigui et al (19).

No entanto, vários fatores, entre eles o gênero, parecem influenciar a ação modulatória do BDNF sobre a dor. Em ratas, o BDNF está relacionado com aumento da dor, enquanto em ratos machos o efeito oposto foi observado (87). Além disso, o BDNF foi associado com comportamento depressivo relacionado ao gênero, sugerindo um dimorfismo sexual na sua função. Apesar de existirem evidências de efeito diferencial do BDNF sobre a dor em relação ao gênero em animais, não se tinha conhecimento dessa associação em humanos. Esse questionamento deu origem ao segundo artigo que compõe a segunda seção da presente tese intitulado *BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects*, publicado na *Neuroscience Letters* 2012; 514:62–66.

2.4 Modulação da nocicepção e sistema melatonérgico

2.4.1 A nocicepção como parte integrante de múltiplos sistemas

A compreensão da nocicepção como parte integrante de múltiplos sistemas que interagem respondendo defensivamente ao dano tecidual pode explicar, ao menos em parte, a variabilidade interindividual das respostas à dor.

A lesão tecidual ativa processos neurobiológicos e imunológicos interdependentes, mas que operam de maneira integrada, comunicando-se dinamicamente através de uma linguagem química a qual permite dar uma resposta conjunta ao estímulo estressor (88, 89). Os maiores elementos dessa linguagem são neurotransmissores, peptídeos, endocanabinoides, citocinas e hormônios. E essas substâncias podem exercer ações inibitórias ou excitatórias, pró ou anti-inflamatórias dependendo do contexto, sendo que muitas são de natureza pleiotrópica.

Uma das substâncias que participa da conectividade entre esses vários sistemas é a melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamine). Além de ter sua atividade regulada pelo estímulo simpático, ela coordena ritmos biológicos em múltiplos níveis e participa da regulação da expressão de genes como a POMC (pró-opiomelanocortina). Também apresenta receptores amplamente distribuídos em nível medular e cerebral e tem sua atividade ligada a diversas vias como opióide, gabaérgica e serotoninérgica além de ter uma ação imuno mediada (90).

2.4.2 Melatonina: um neurohormônio que modula o processo nociceptivo

A melatonina é uma indolamina secretada primariamente pela glândula pineal, que apresenta ritmo circadiano endógeno e regula diversos processos fisiológicos como o ciclo sono-vigília (91), funções cardiovasculares (92), reprodutivas (93), neuroendócrinas e imunes (90, 94).

Ela é sintetizada a partir do triptofano, o qual é transformado em serotonina e essa, por sua vez, convertida em melatonina através de um processo que envolve a atividade

sequencial de duas enzimas: a serotonina-N-acetyltransferase (NAT), que é a enzima limitante do processo de síntese e a hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT), tendo ambas alta concentração na glândula pineal (95, 96), O sistema simpático exerce controle sobre essa biossíntese, através do aumento do AMPcíclico (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) nos pinealócitos secundário à ativação dos receptores β -1 adrenérgicos.

Quando formada, a melatonina não é armazenada na glândula pineal; ela se difunde livremente através de todas as membranas biológicas agindo em praticamente todas as células do organismo (97). Algumas ações são mediadas por receptores melatonérgicos de membrana tipos 1 e 2 (MT1 e MT2) acoplados à proteína G (98), enquanto outras são independentes, como a ligação a receptores hormonais nucleares associados à diferenciação celular e regulação de resposta imune (99).

Inúmeros sítios extrapineais, incluindo a medula espinhal, sintetizam melatonina e indicam que esse hormônio pode ter ação parácrina além de sua ação endócrina (97). Além disso, a ampla distribuição de receptores no sistema nervoso central e em estruturas envolvidas na transmissão nociceptiva como as laminae I-V e X da medula espinhal (100), suportam o envolvimento complexo, predominantemente inibitório da melatonina no sistema nociceptivo (101, 102). Adicionalmente, sua natureza altamente lipossolúvel permite que facilmente ela penetre a barreira hematoencefálica. Portanto é provável que a melatonina exerça seu efeito modulatório sobre a nocicepção através de mecanismo central e periférico, dependendo da quantidade de substrato disponível ou administrado.

A seguir revisaremos os principais estudos pré-clínicos e clínicos relacionados ao papel da melatonina no contexto do processo nociceptivo.

2.4.3 Evidências pré-clínicas do efeito antinociceptivo da melatonina

A associação entre dor e melatonina foi inicialmente relatada por Morris *et al* (103) em 1969 num ensaio experimental, seguido por outros estudos os quais demonstraram que durante o escuro, quando os níveis de melatonina são mais elevados, os animais são menos sensíveis a estímulos nociceptivos e mais suscetíveis aos efeitos da morfina (104,

105). Já o efeito antinociceptivo da melatonina exógena intraperitoneal em ratos foi relatado pela primeira vez em 1981, por Lakin (106), que demonstrou também o bloqueio do efeito analgésico pela naloxona, sugerindo o envolvimento do sistema opioide na sua ação. Desde então o efeito antinociceptivo da melatonina tem sido demonstrado através de inúmeros modelos experimentais em camundongos e ratos, os quais reforçam a multiplicidade de mecanismos que podem estar envolvidos. Os principais estudos com administração central ou periférica de doses suprafisiológicas de melatonina ou análogos em modelos animais de dor aguda, inflamatória e neuropática e seus respectivos resultados estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2. Sumário dos estudos com administração central ou periférica de doses supra-fisiológicas de melatonina ou análogos em modelos animais de dor aguda, inflamatória e neuropática.

Animal	Modelo de dor	Dose, via de administração	Efeito na dor	Outros efeitos	Ref
Rato	Hiperálgia visceral	Melatonina 30,45, 60 mg/kg i.p	↓ da resposta a distensão colorretal na dose maior. Ausência de efeito em ratos com lesão espinal (efeito supra-segmentar).	Reversão do efeito da melatonina na resposta visceromotoria pelos antagonistas MT1 e MT2 (luzindole) e antagonista opióide (naltrexona).	(107)
Rato	Teste da formalina	Melatonina 30 µg i.c.v	Efeito antinociceptivo	Reversão do o efeito analgésico pelos antagonistas alfa-1, alfa-2, nicotínico e muscarínico	(108)
Rato	Hiperálgia plantar	Melatonina 25,50, 100 mg/kg i.p.	↓ da hiperálgia induzida por peroxinitrito.	Modulação do efeito da COX, redução da inflamação.	(109)
Rato	Hiperálgia e alodineia	Melatonina 30,60, 120 mg/kg i.p.	↓ da hiperálgia com 120 mg/kg	Efeito potencializado por dextrometorfano	(110)
Rato	Teste da formalina	Melatonina i.c.v	Antinocicepção. Efeito aditivo entre melatonina, clonidina e neostigmina	Efeito antagonizado por luzindole e prazosin.	(111)
Rato	Alodineia mecânica	Melatonina 37.5–300 mg/kg v.o. Melatonin, 3–100µg i.c.v.	Efeito anti-alodinia dose-dependente	Antagonizado por luzindole i.c.v ou oralou por antagonista MT2 (4-P-PDOT) intratecal.	(112)
Rato	Teste da formalina	Melatonina 10-300 mg/kg VO	Efeito anti alodínico e antinociceptivo com dose maior ou igual a 150 mg/kg.	Efeito antagonizado por antagonista MT2 em ratos diabéticos.	(113)
Rato	Retirada da cauda	Melatonina 1, 5, 25 mg/kg i.p. ou 0.25, 0.5, 1 mg/kg i.c.v.	Aumento antinocicepção induzida por agonista de receptor delta-opióide.	Ausência de efeito sinérgico com agonista mu opioide.	(114)
Ratos	Atividade eletromiográfica reflexo de retirada (wind-up)	Melatonina 10,30 e 90 µg i.t.	Depressão da potencialização sináptica a nível medular (wind-up).	Efeito bloqueado por luzindole (antagonista MT2). Interferência na transmissão glutamatérgica.	(101)
Ratos	Hiperálgia mecânica e térmica	Melatonina 10-100 nmol i.t.	Mostrou a presença de transcritores para os receptores MT1 e MT2 a nível espinal.	Melatonina espinal aumentou efeito antinociceptivo da morfina, mas sozinha não inibiu hiperálgia.	(115)
Ratos	Reflexo de retirada e vocalização após estímulo com pressão.	Melatonina 257 mg/ kg, ou tiopental 20 mg/kg, propofol 10 mg kg, ou veiculo.	Efeito antinociceptivo significativo.	Melatonina teve efeito hipnótico similar a propofol e tiopental.	(116)
Ratos	Modelo de dor nociceptiva e inflamatória induzida por carrageenan.	Melatonina 0,5 e 1,0 mg/kg i.p.	↑ do limiar nociceptivo	Aumentou o efeito antiinflamatório da indometacina.	(117)
Ratos	Retirada da cauda e placa quente.	Melatonina 1,5,10,30 e 60 mg/kg i.p.	Efeito antinociceptivo em ambos testes com doses mais elevadas.	Inibiu a produção de radicais livres.	(118)
Ratos	Nocicepção mecânica	2-bromomelatonina 10µg/µl intratecal	Nocicepção mecânica tempo-dependente	Efeito antagonizado por naloxona ou luzindole intratecal.	(119)
Camundongo	Placa quente	Melatonina 20-40 mg i.p.	Efeito antinociceptivo máximo a noite e em 30 min após injeção.	Efeito revertido com flumazenil e naloxona.	(120)
Camundongo	Placa quente	Melatonina 25 mg/kg i.p.	↑ o limiar nociceptivo durante o dia.	Efeito revertido por naloxona e campo magnético.	(121)
Camundongo	Placa quente	Melatonina 30,60, 90 mg/kg	Antinocepção dose-dependente	Efeito bloqueado por naloxona i.p.	(106)
Camundongo	Nocicepção induzida por capsaicina e glutamato	Melatonina 10-100 mg/kg i.p	Antinocicepção dose dependente nos testes de capsaicina e glutamato	Antinocicepção central e periférica inibida por antagonistas opióide, serotoninérgico, dopaminérgico, adrenérgico e L-arginina NO.	(122)
Camundongo	Teste da formalina	25, 50 or 100 mg/kg	Efeito antinociceptivo dose-dendente	Resultados alterados por antagonistas alfa-1 adrenérgicos e serotoninérgico.	(123)

i.p.: intraperitoneal; i.c.v.: intracerebroventricular; i.t.: intratecal; v.o.:via oral, MT1: receptor melatonérgico tipo 1; MT2: receptor melatonérgico tipo 2;

MT3: receptor melatonérgico tipo 3.

Os modelos experimentais apresentados comprovam que a atividade antinociceptiva da melatonina é orquestrada por múltiplos sistemas de neurotransmissão e que essa atividade tem ação dose-dependente (109, 119, 123, 124). Para demonstrar que um sistema de neurotransmissão está envolvido em determinado efeito de outro sistema, a obliteração do sistema neurotransmissor em questão deve modificar significativamente o efeito da melatonina. Adicionalmente, o mesmo sistema deve sofrer alterações dinâmicas devido à administração exógena de melatonina. No entanto, isso não implica necessariamente que o sistema neurotransmissor é uma parte integrante da sequência de eventos desencadeados, todavia, indica um elo de ligação entre os sistemas e os desfechos analisados (125). Esse tipo de relação é que podemos identificar a partir dos inúmeros sistemas envolvidos na ação analgésica da melatonina. Dentre os sistemas testados e relacionados encontram-se o opioide e gabaérgico principalmente.

Nos estudos pré-clínicos a resposta anti-nociceptiva tem sido atribuída à ação do sistema melatonérgico via receptores de membrana ligados à proteína G inibitória e receptores nucleares (126). A ativação de receptores MT1 e MT2 é um dos mecanismos pelo qual se acredita que a melatonina exerce seu papel analgésico (112, 124, 127). Esses receptores são ligados a proteína G_e quando ativados reduzem a concentração de AMPcíclico e modificam a função dos canais iônicos de cálcio e potássio, ação intracelular compartilhada pelos opioides e receptores GABA B (20, 128). Foi demonstrado *in vitro* que a melatonina ativa canais de potássio acoplados a proteína G e inibe o potencial de ação neuronal (129, 130) além de inibir canais de cálcio voltagem-dependentes (131, 132), os quais são associados a dor neuropática e sensibilização neuronal (figura 10).

A relação relevante entre o sistema opioide e melatonérgico, apesar de aparentemente crucial, não está completamente elucidada. Sugeriu-se um mecanismo de *feedback* entre o sistema opioide endógeno e a melatonina em animais e em humanos (100), visto que a naloxona diminui o efeito antinociceptivo da melatonina em vários paradigmas experimentais (120, 121) e que a injeção de agonista opioide aumenta os níveis de melatonina na glândula pineal de ratos (133). No entanto, foi demonstrado que não há

afinidade direta entre agonistas melatonérgicos e receptores opióides, e que o efeito sinérgico entre os sistemas se deve ao aumento de liberação endógena de endorfinas (134).

Os efeitos comportamentais predominantemente inibitórios da melatonina, como sedação, atividade hipnótica, anti-convulsivante e antinociceptiva estão possivelmente relacionados à modulação e potencialização dos sistemas gabaérgico e glicinérgico (115, 127). Concentrações aumentadas de GABA foram demonstradas após a administração de melatonina, além disso, seu efeito analgésico foi revertido com o uso do flumazenil (135, 136).

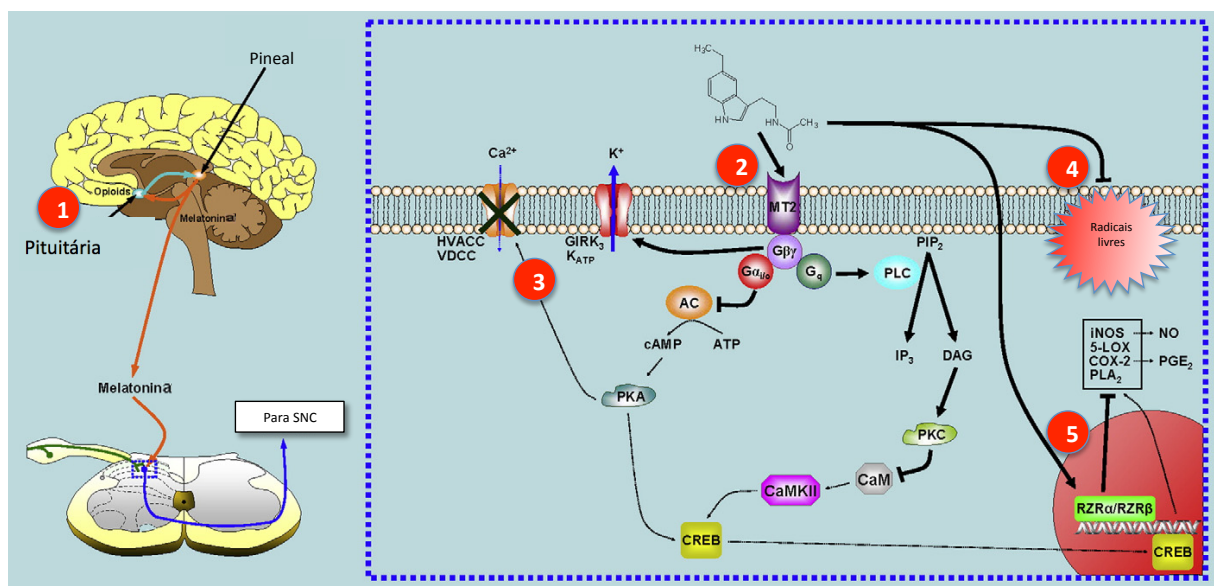
Seguindo-se a linha de multiplicidade de mecanismos de ação analgésica, Mantovani et al (122) demonstraram que vários sistemas, como serotoninérgico, dopaminérgico, adrenérgico e L-arginina óxido-nítrico sintase, estão implicados na antinocicepção detectada nos modelos animais de dor nociceptiva e neurogênica. A alta lipossolubilidade da melatonina pode estar implicada nessa multiplicidade de achados.

Adicionalmente, existem evidências de que a melatonina pode exercer um efeito analgésico através da inibição de citocinas pró-inflamatórias (137, 138) e da inibição da adesão e migração leucocitária às células endoteliais (139). Alguns desses efeitos anti-inflamatórios estão relacionados à ação em receptores nucleares e redução da expressão de proteínas pró-inflamatórias, como iNOS, 5-LOX, COX-2 e fosfolipases A2. (100). Além disso, o fato de inibir diretamente radicais livres (140) e estimular enzimas com atividade antioxidante, como glutathione peroxidase pode contribuir para sua atividade analgésica, sobretudo em situações inflamatórias (141).

Esses possíveis mecanismos de ação acima descritos em animais dificilmente serão elucidados em humanos, e a transposição dos achados não é simples. As medidas de dor acessam o efeito final de uma multiplicidade de sistemas competitivos inibitórios e facilitatórios, sendo difícil, então, identificar se o mecanismo primário da alteração da resposta se deve a uma redução da facilitação ou a um aumento da inibição das respostas álgicas (10). Outro fator que limita a transposição dos achados refere-se às doses muito

elevadas utilizadas em animais, as quais não poderiam ser usadas clinicamente. Isso pode ser atribuído à natureza do teste: estímulo fásico *versus* tônico, sendo que os analgésicos em geral são mais efetivos nos estímulos tônicos (como no teste da formalina, doses menores geralmente são mais efetivas), nos quais a velocidade de condução das fibras periféricas responsáveis pelo estímulo é menor (39).

Figura 10. Mecanismos antinociceptivos da melatonina



- 1 Induz a liberação de opióides endógenos das células pituitárias, produzindo analgesia pela via clássica
- 2 Ativa receptores MT2 que estão localizados na membrana pós-sináptica do neurônio de segunda ordem assim como nas fibras aferentes primárias, modulando negativamente os níveis de AMPc, cálcio e atividade do AMPc response element-binding (CREB) intracelulares.
- 3 Ativa canais de potássio e bloqueia canais de cálcio através da atividade da subunidade Gβγ.
- 4 Age diretamente como scavenger de radicais livres quando entra livremente na célula.
- 5 Ativa receptores nucleares e reduz a expressão de proteínas pró-inflamatórias como iNOS, 5-LOX, COX-2 e fosfolipases A2.

Fonte: Modificado de Ambriz-Tututi et al. (100)

2.4.4 Evidências clínicas do efeito analgésico da melatonina

Em humanos, o efeito analgésico da melatonina tem sido demonstrado em diferentes situações clínicas relacionadas à dor como cefaleia (142), refluxo gastro-esofágico (143), fibromialgia (144) e dor aguda pós-operatória (22, 23, 145-147).

O grupo de Dor e Neuromodulação do HCPA vem contribuindo para a evolução do conhecimento nessa área, sendo que o papel da melatonina no cenário de dor aguda pós-operatória foi investigado em dois estudos. O primeiro evidenciou que, em cada três pacientes submetidas a histerectomia sob anestesia epidural tratadas com melatonina no pré-operatório, evitou-se que uma relatasse dor moderada a intensa. No segundo estudo, demonstramos que os efeitos da melatonina na dor e na ansiólise foram equivalentes ao da clonidina oral em pacientes submetidas a histerectomia. Esses dois ensaios foram recentemente incluídos em uma revisão sistemática que analisou o efeito ansiolítico e analgésico da melatonina no período perioperatório (147). Essa revisão incluiu 10 estudos, sendo que o efeito analgésico da melatonina foi o desfecho primário em 8 deles. As doses variaram entre 3-15 mg; no entanto, conclusões quanto à magnitude do efeito e dose ideal não foram quantificadas devido à heterogeneidade dos dados.

Ismail e Mowafi (148) mostraram que a pré-medicação com 10 mg de melatonina oral em pacientes submetidos à cirurgia de catarata sob anestesia tópica proporcionou efeito ansiolítico e aumentou a analgesia, desfecho evidenciado pela redução da escala análogo-visual e pelo consumo de fentanil no transoperatório. Efeito similar foi visto em estudo com 6 mg de melatonina no dia anterior e 1 hora antes de prostatectomia (145). Houve redução significativa da dor pós-operatória avaliada através do consumo de tramadol e melhor qualidade de sono (tabela 3).

Tabela 3. Efeito da melatonina como pré-medicação no controle da dor aguda pós-operatória

Referência	Contexto	Dose, via de administração	Efeito analgésico	Outros efeitos
Caumo (23) (n= 33)	Pré-medicação em histerectomia abdominal	5 mg VO	Preveniu dor intensa no pós-operatório (NNT 2,2).	Houve maior ansiólise no grupo com dor moderada a intensa.
Mowafi (146)	Pré-medicação em cirurgia de mão sob anestesia	10 mg VO	Aumentou tolerância ao torniquete e tempo para solicitação	Foi associada a menores escores de PAM e FC após torniquete

(n=40)	intravenosa regional		analgésica no pós, reduziu consumo de fentanil e de AINE em 24h.	
Ismail (148) (n= 40)	Pré-medicação em cirurgia de catarata sob anestesia tópica	10 mg VO	Reduziu o consumo de fentanil trans-operatório	Reduziu ansiedade e pressão intra-ocular
Caumo (22) (n= 59)	Pré-medicação em histerectomia abdominal	5 mg VO	Produziu efeito analgésico equivalente a 100 µg clonidina (NNT 1,5).	Houve efeito analgésico mais pronunciado no grupo de maior ansiedade
Borazan (145) (n=52)	Pré-medicação em prostatectomia aberta	6 mg VO	Reduziu consumo de fentanil trans-operatório e de tramadol no pós-operatório.	Reduziu ansiedade, melhorou qualidade de sono e produziu maiores escores de sedação.

Os efeitos analgésicos da melatonina nesses estudos são conjugados aos efeitos ansiolíticos e sedativos, os quais sabidamente influenciam os limiares de dor. Portanto, parece que a ação predominantemente inibitória da melatonina no SNC é a de contribuir para a redução dos escores nociceptivos.

Corroborando os achados nos estudos com dor aguda, recente ensaio com portadoras de fibromialgia (144) mostrou redução nos escores da doença com doses de 3 e 5 mg, combinadas ou não com fluoxetina, durante 8 semanas. Da mesma forma, pacientes com refluxo gastro-esofágico tratados com 3 mg de melatonina, combinada ou não com omeprazol, apresentaram melhora significativa dos sintomas em 8 semanas (143).

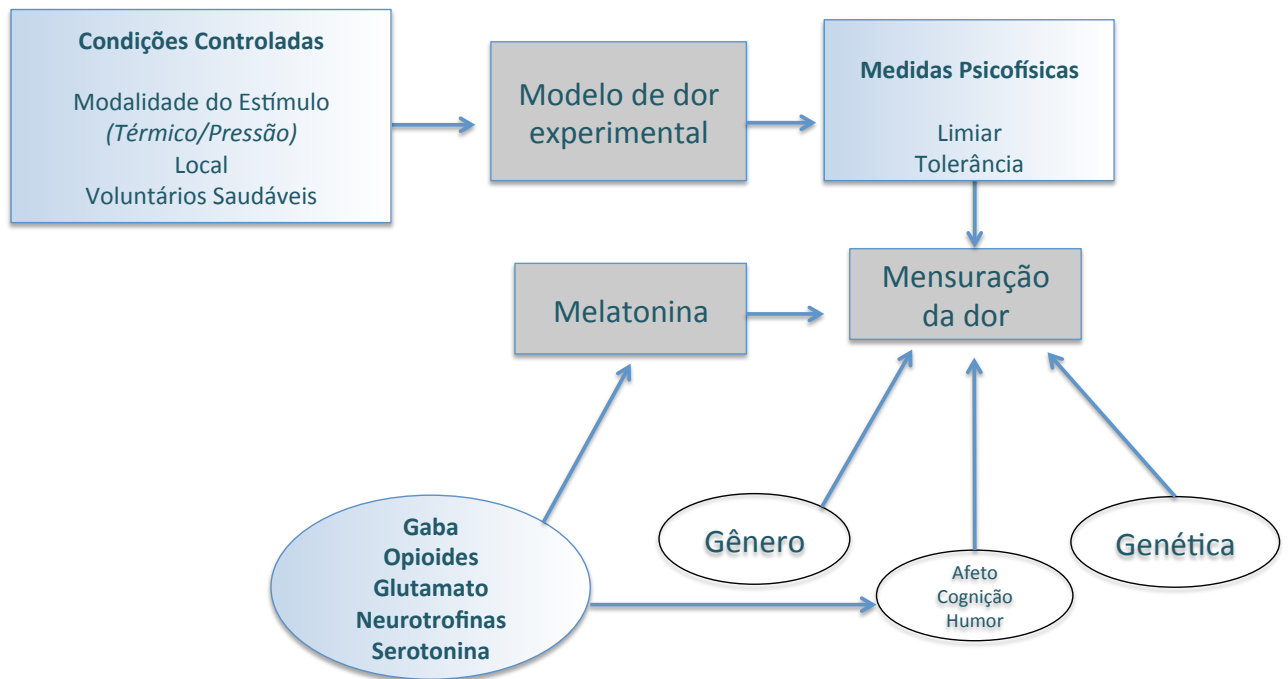
Embora os estudos acima citados tenham evidenciado o papel da melatonina exógena no processo nociceptivo, ainda não se conhecem profundamente os potenciais mecanismos que explicam estas respostas, tampouco se há um efeito tipo dose-resposta. *Nelson et al* (149) demonstraram que a concentração endógena de melatonina salivar diminui após estímulo de dor aguda em modelo de dor em voluntários. No entanto, até o momento, não há conhecimento de como se comportam os limiares de dor em estudos com modelo experimental em humanos após administração de melatonina exógena.

Nesse cenário se insere o último questionamento da terceira seção desta tese que deu origem ao terceiro artigo intitulado **A phase II, randomized, double-blind, placebo controlled, dose-response trial of melatonin on the pain threshold in healthy subjects**, submetido para apreciaçãoe possível publicação pela revista *British Journal of Clinical Pharmacology*.

3 MARCO TEÓRICO

A partir desta base teórica, observa-se que o processo de nocicepção e a expressão do fenômeno clínico dor ocorre pelo envolvimento de inúmeros fatores neurais. Trata-se de uma cascata de eventos complexos, que demanda aparatos especiais e uma melhor compreensão da relação com fatores constitutivos e de neuromodulação. Nesta tese, como apresentado no texto e sumarizado no marco conceitual, contemplamos três questões tratadas nos três estudos que a compõe: *i)* a primeira se refere ao desenvolvimento e à validação do equipamento para realização do teste de quantificação sensitiva (QST); *ii)* a segunda diz respeito a fatores neurobiológicos envolvidos no limiar de dor, mais especificamente a relação entre BDNF, gênero e limiares de dor; *iii)* a terceira e principal questão relaciona-se à definição de uma curva dose-resposta para o efeito analgésico da melatonina em um modelo de dor em voluntários saudáveis.

Figura 11. Marco Teórico



4 JUSTIFICATIVA

Com o avanço no entendimento da fisiopatologia da dor sobreveio a necessidade de aprimoramento na mensuração desse fenômeno. Equipamentos que utilizam estímulo térmico controlado, de maneira reproduzível e confiável, através de método não-invasivo, de fácil execução e aplicável a voluntários hígidos ou doentes são escassos em nosso meio. Dentro do contexto da linha de pesquisa do Laboratório de Dor e Neuromodulação do HCPA, surgiu, portanto, a proposta de desenvolvimento de um aparato que permitisse a realização dos testes de quantificação sensitiva, através de estímulo térmico controlado.

A partir da possibilidade de mensuração mais fidedigna da dor, passamos a estudar a relação entre parâmetros biológicos modificáveis ou não, que afetam diferentes estágios do processamento do sinal nociceptivo. A interação de alguns desses parâmetros, como gênero e BDNF, sobre a dor é conhecida em animais, no entanto, não se sabe se tal associação ocorre em humanos. O estudo dessas variáveis contribuirá para a elucidação das razões das diferenças entre os limiares de dor entre os sexos.

Assim como as neurotrofinas, o sistema melatonérgico inclui-se entre os sistemas modulatórios não tradicionalmente descritos do processo nociceptivo. O compartilhamento de ações predominantemente inibitórias na transmissão neuronal como efeitos ansiolíticos, analgésicos e sedativos em animais e em humanos nos leva a crer que a melatonina faz parte de um sistema que integra, de diferentes maneiras, a transmissão neuronal. No entanto, ainda não se conhecem profundamente os potenciais mecanismos que explicam tais respostas, tampouco se há um efeito analgésico do tipo dose-resposta. Portanto, o estudo da melatonina em modelo de dor em humanos, em diferentes doses, possibilitará a definição mais clara do seu papel analgésico e contribuirá para a sua inserção no arsenal terapêutico da dor nociceptiva.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Desenvolver um aparato para avaliar o limiar de dor, pesquisar parâmetros biológicos relacionados a esse limiar e estudar a curva dose-resposta da melatonina.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Demonstrar a compatibilidade e reprodutibilidade dos limiares de dor ao estímulo térmico em sessões repetidas através do novo equipamento desenvolvido.
- 2) Investigar a influência do gênero em um modelo de dor experimental ao estímulo térmico e de pressão e avaliar se há influência do BDNF nas diferenças encontradas.
- 3) Avaliar a curva dose resposta da melatonina estudando a relação da concentração sérica e efeito antinociceptivo nos limiares de dor e tolerância ao estímulo térmico e mecânico.
- 4) Avaliar os efeitos adversos da melatonina nas diferentes doses administradas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84. Epub 2009/10/20.
2. Staahl C, Reddy H, Andersen SD, Arendt-Nielsen L, Drewes AM. Multi-modal and tissue-differentiated experimental pain assessment: reproducibility of a new concept for assessment of analgesics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;98(2):201-11. Epub 2006/02/01.
3. Yarnitsky D, Sprecher E. Thermal testing: normative data and repeatability for various test algorithms. *J Neurol Sci*. 1994;125(1):39-45. Epub 1994/08/01.
4. Staahl C, Drewes AM. Experimental human pain models: a review of standardised methods for preclinical testing of analgesics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;95(3):97-111. Epub 2004/09/28.
5. Melzack R. Pain--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999;43(9):880-4. Epub 1999/10/16.
6. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 2001;53(4):597-652. Epub 2001/12/06.
7. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3760-72. Epub 2010/11/03.
8. Chong PS, Cros DP. Technology literature review: quantitative sensory testing. *Muscle Nerve*. 2004;29(5):734-47. Epub 2004/04/30.
9. Handwerker HO, Kobal G. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev*. 1993;73(3):639-71. Epub 1993/07/01.
10. Arendt-Nielsen L, Yarnitsky D. Experimental and clinical applications of quantitative sensory testing applied to skin, muscles and viscera. *J Pain*. 2009;10(6):556-72. Epub 2009/04/22.

11. Pavlakovic G, Petzke F. The role of quantitative sensory testing in the evaluation of musculoskeletal pain conditions. *Curr Rheumatol Rep.* 2010;12(6):455-61. Epub 2010/09/22.
12. Woolf CJ, Max MB. Mechanism-based pain diagnosis: issues for analgesic drug development. *Anesthesiology.* 2001;95(1):241-9. Epub 2001/07/24.
13. Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL, 3rd. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain.* 2009;10(5):447-85. Epub 2009/05/05.
14. Webster LR. Pharmacogenetics in pain management: the clinical need. *Clin Lab Med.* 2008;28(4):569-79. Epub 2008/12/09.
15. Diatchenko L, Nackley AG, Slade GD, Fillingim RB, Maixner W. Idiopathic pain disorders--pathways of vulnerability. *Pain.* 2006;123(3):226-30. Epub 2006/06/17.
16. Davies AM. The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol.* 1994;25(11):1334-48. Epub 1994/11/01.
17. Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell.* 1994;77(5):627-38. Epub 1994/06/03.
18. Berninger B, Poo M. Fast actions of neurotrophic factors. *Curr Opin Neurobiol.* 1996;6(3):324-30. Epub 1996/06/01.
19. 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. Epub 2008/06/03.
20. 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. Epub 2011/05/28.
21. Acil M, Basgul E, Celiker V, Karagoz AH, Demir B, Aypar U. Perioperative effects of melatonin and midazolam premedication on sedation, orientation, anxiety scores and psychomotor performance. *Eur J Anaesthesiol.* 2004;21(7):553-7. Epub 2004/08/21.
22. 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. Epub 2008/11/18.
23. 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. Epub 2007/10/26.
 24. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965;150(3699):971-9. Epub 1965/11/19.
 25. Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*. 2007;55(3):377-91. Epub 2007/08/07.
 26. Derbyshire SW, Whalley MG, Stenger VA, Oakley DA. Cerebral activation during hypnotically induced and imagined pain. *Neuroimage*. 2004;23(1):392-401. Epub 2004/08/25.
 27. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10. Epub 2001/09/15.
 28. Raja SD, P. Anatomy and Physiology of Somatosensory and Pain Processing. In: Saunders, editor. *Essentials of Pain Medicine* 3ed2011.
 29. Perl ER. Ideas about pain, a historical view. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(1):71-80. Epub 2006/12/21.
 30. Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci*. 1995;15(1 Pt 1):333-41. Epub 1995/01/01.
 31. Snider WD, McMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*. 1998;20(4):629-32. Epub 1998/05/15.
 32. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24. Epub 1997/12/31 23:16.

33. Hughes AM, Rhodes J, Fisher G, Sellers M, Growcott JW. Assessment of the effect of dextromethorphan and ketamine on the acute nociceptive threshold and wind-up of the second pain response in healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2002;53(6):604-12. Epub 2002/06/06.
34. Torebjork HE, Hallin RG. Perceptual changes accompanying controlled preferential blocking of A and C fibre responses in intact human skin nerves. *Exp Brain Res.* 1973;16(3):321-32. Epub 1973/01/29.
35. LaMotte RH, Thalhammer JG, Torebjork HE, Robinson CJ. Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat. *J Neurosci.* 1982;2(6):765-81. Epub 1982/06/01.
36. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3779-87. Epub 2010/11/03.
37. Curatolo M, Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L. Assessment of regional analgesia in clinical practice and research. *Br Med Bull.* 2004;71:61-76. Epub 2005/02/03.
38. Mogil JS, Ritchie J, Sotocinal SG, Smith SB, Croteau S, Levitin DJ, et al. Screening for pain phenotypes: analysis of three congenic mouse strains on a battery of nine nociceptive assays. *Pain.* 2006;126(1-3):24-34. Epub 2006/07/18.
39. Staahl C, Olesen AE, Andresen T, Arendt-Nielsen L, Drewes AM. Assessing analgesic actions of opioids by experimental pain models in healthy volunteers - an updated review. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;68(2):149-68. Epub 2009/08/22.
40. Beecher HK. The measurement of pain; prototype for the quantitative study of subjective responses. *Pharmacol Rev.* 1957;9(1):59-209. Epub 1957/03/01.
41. Hansson P, Backonja M, Bouhassira D. Usefulness and limitations of quantitative sensory testing: clinical and research application in neuropathic pain states. *Pain.* 2007;129(3):256-9. Epub 2007/04/25.
42. Kenshalo DR, Bergen DC. A device to measure cutaneous temperature sensitivity in humans and subhuman species. *J Appl Physiol.* 1975;39(6):1038-40. Epub 1975/12/01.

43. Fruhstorfer H, Lindblom U, Schmidt WC. Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1976;39(11):1071-5. Epub 1976/11/01.
44. Verdugo R, Ochoa JL. Quantitative somatosensory thermotest. A key method for functional evaluation of small calibre afferent channels. *Brain*. 1992;115 (Pt 3):893-913. Epub 1992/06/01.
45. Dyck PJ, O'Brien PC, Kosanke JL, Gillen DA, Karnes JL. A 4, 2, and 1 stepping algorithm for quick and accurate estimation of cutaneous sensation threshold. *Neurology*. 1993;43(8):1508-12. Epub 1993/08/01.
46. Claus D, Hilz MJ, Neundorfer B. Thermal discrimination thresholds: a comparison of different methods. *Acta Neurol Scand*. 1990;81(6):533-40. Epub 1990/06/01.
47. Nathan PW, Smith MC, Cook AW. Sensory effects in man of lesions of the posterior columns and of some other afferent pathways. *Brain*. 1986;109 (Pt 5):1003-41. Epub 1986/10/01.
48. Svensson P, Rosenberg B, Beydoun A, Morrow TJ, Casey KL. Comparative psychophysical characteristics of cutaneous CO₂ laser and contact heat stimulation. *Somatosens Mot Res*. 1997;14(2):113-8. Epub 1997/01/01.
49. Yarnitsky D, Ochoa JL. Warm and cold specific somatosensory systems. Psychophysical thresholds, reaction times and peripheral conduction velocities. *Brain*. 1991;114 (Pt 4):1819-26. Epub 1991/08/01.
50. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet*. 2005;14(1):135-43. Epub 2004/11/13.
51. Edwards CL, Fillingim RB, Keefe F. Race, ethnicity and pain. *Pain*. 2001;94(2):133-7. Epub 2001/11/03.
52. Fillingim RB, Wallace MR, Herbstman DM, Ribeiro-Dasilva M, Staud R. Genetic contributions to pain: a review of findings in humans. *Oral Dis*. 2008;14(8):673-82. Epub 2009/02/06.

53. Norbury TA, MacGregor AJ, Urwin J, Spector TD, McMahon SB. Heritability of responses to painful stimuli in women: a classical twin study. *Brain*. 2007;130(Pt 11):3041-9. Epub 2007/10/13.
54. Fillingim RB, Kaplan L, Staud R, Ness TJ, Glover TL, Campbell CM, et al. The A118G single nucleotide polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) is associated with pressure pain sensitivity in humans. *J Pain*. 2005;6(3):159-67. Epub 2005/03/18.
55. Foulkes T, Wood JN. Pain genes. *PLoS Genet*. 2008;4(7):e1000086. Epub 2008/07/26.
56. Hurley RW, Adams MC. Sex, gender, and pain: an overview of a complex field. *Anesth Analg*. 2008;107(1):309-17. Epub 2008/07/19.
57. Paller CJ, Campbell CM, Edwards RR, Dobs AS. Sex-based differences in pain perception and treatment. *Pain Med*. 2009;10(2):289-99. Epub 2009/02/12.
58. Ayesch EE, Jensen TS, Svensson P. Somatosensory function following painful repetitive electrical stimulation of the human temporomandibular joint and skin. *Exp Brain Res*. 2007;179(3):415-25. Epub 2006/12/06.
59. Chesterton LS, Barlas P, Foster NE, Baxter GD, Wright CC. Gender differences in pressure pain threshold in healthy humans. *Pain*. 2003;101(3):259-66. Epub 2003/02/14.
60. Riley JL, 3rd, Robinson ME, Wise EA, Myers CD, Fillingim RB. Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: a meta-analysis. *Pain*. 1998;74(2-3):181-7. Epub 1998/03/31.
61. George SZ, Fritz JM, Childs JD, Brennan GP. Sex differences in predictors of outcome in selected physical therapy interventions for acute low back pain. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2006;36(6):354-63. Epub 2006/06/17.
62. Cairns BE, Hu JW, Arendt-Nielsen L, Sessle BJ, Svensson P. Sex-related differences in human pain and rat afferent discharge evoked by injection of glutamate into the masseter muscle. *J Neurophysiol*. 2001;86(2):782-91. Epub 2001/08/10.

63. Falla D, Arendt-Nielsen L, Farina D. Gender-specific adaptations of upper trapezius muscle activity to acute nociceptive stimulation. *Pain*. 2008;138(1):217-25. Epub 2008/05/20.
64. Serrao M, Rossi P, Sandrini G, Parisi L, Amabile GA, Nappi G, et al. Effects of diffuse noxious inhibitory controls on temporal summation of the RIII reflex in humans. *Pain*. 2004;112(3):353-60. Epub 2004/11/25.
65. France CR, Suchowiecki S. A comparison of diffuse noxious inhibitory controls in men and women. *Pain*. 1999;81(1-2):77-84. Epub 1999/06/03.
66. Tousignant-Laflamme Y, Marchand S. Excitatory and inhibitory pain mechanisms during the menstrual cycle in healthy women. *Pain*. 2009;146(1-2):47-55. Epub 2009/07/14.
67. Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, et al. mu-opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. *J Neurosci*. 2002;22(12):5100-7. Epub 2002/06/22.
68. Duncan KAM, A., editor. Sex-linked differences in mu-opiate receptor expression in the rat brain. . 11th world Congress on Pain, International Association for the Study of Pain; 2005; Australia.
69. Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, et al. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci*. 2003;23(29):9529-40. Epub 2003/10/24.
70. Henderson LA, Gandevia SC, Macefield VG. Gender differences in brain activity evoked by muscle and cutaneous pain: a retrospective study of single-trial fMRI data. *Neuroimage*. 2008;39(4):1867-76. Epub 2007/12/11.
71. Paulson PE, Minoshima S, Morrow TJ, Casey KL. Gender differences in pain perception and patterns of cerebral activation during noxious heat stimulation in humans. *Pain*. 1998;76(1-2):223-9. Epub 1998/08/08.

72. Rainville P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. *Curr Opin Neurobiol.* 2002;12(2):195-204. Epub 2002/05/17.
73. Greenspan JD, Craft RM, LeResche L, Arendt-Nielsen L, Berkley KJ, Fillingim RB, et al. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain.* 2007;132 Suppl 1:S26-45. Epub 2007/10/30.
74. Rudick CN, Woolley CS. Estradiol induces a phasic Fos response in the hippocampal CA1 and CA3 regions of adult female rats. *Hippocampus.* 2000;10(3):274-83. Epub 2000/07/21.
75. Toran-Allerand CD, Singh M, Setalo G, Jr. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20(2):97-121. Epub 1999/05/18.
76. Allen AL, McCarson KE. Estrogen increases nociception-evoked brain-derived neurotrophic factor gene expression in the female rat. *Neuroendocrinology.* 2005;81(3):193-9. Epub 2005/07/16.
77. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004;44(1):5-21. Epub 2004/09/29.
78. Akbarian S, Rios M, Liu RJ, Gold SJ, Fong HF, Zeiler S, et al. Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. *J Neurosci.* 2002;22(10):4153-62. Epub 2002/05/23.
79. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci.* 1997;17(7):2295-313. Epub 1997/04/01.
80. Walker SM, Mitchell VA, White DM, Rush RA, Duggan AW. Release of immunoreactive brain-derived neurotrophic factor in the spinal cord of the rat following sciatic nerve transection. *Brain Res.* 2001;899(1-2):240-7. Epub 2001/04/20.
81. Lever IJ, Bradbury EJ, Cunningham JR, Adelson DW, Jones MG, McMahon SB, et al. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *J Neurosci.* 2001;21(12):4469-77. Epub 2001/06/16.

82. Oddiah D, Anand P, McMahon SB, Rattray M. Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNAs in inflamed bladder. *Neuroreport*. 1998;9(7):1455-8. Epub 1998/06/19.
83. Suter MR, Wen YR, Decosterd I, Ji RR. Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biol*. 2007;3(3):255-68. Epub 2008/05/28.
84. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Zimmermann A, Buchler MW. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is upregulated and associated with pain in chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2001;46(8):1633-9. Epub 2001/08/18.
85. Zhou XF, Deng YS, Xian CJ, Zhong JH. Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur J Neurosci*. 2000;12(1):100-5. Epub 2000/01/29.
86. Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J Neurosci*. 2001;21(13):4891-900. Epub 2001/06/27.
87. Li F, Zhang JW, Wei R, Luo XG, Zhang JY, Zhou XF, et al. Sex-differential modulation of visceral pain by brain derived neurotrophic factor (BDNF) in rats. *Neurosci Lett*. 2010;478(3):184-7. Epub 2010/05/18.
88. Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*. 1994;15(11):504-11. Epub 1994/11/01.
89. Chapman CR, Tuckett RP, Song CW. Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. *J Pain*. 2008;9(2):122-45. Epub 2007/12/20.
90. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):11-24. Epub 2005/01/15.
91. Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, Norrie G, Zhdanova I, Ben-Shushan A, et al. Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):41-50. Epub 2005/01/15.

92. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Clinical aspects of melatonin in the acute coronary syndrome. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7(3):367-73. Epub 2009/07/16.
93. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod*. 2009;81(3):445-56. Epub 2009/05/15.
94. Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10(3):467-76. Epub 2001/02/28.
95. Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*. 1960;131:1312. Epub 1960/04/29.
96. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med*. 1997;336(3):186-95. Epub 1997/01/16.
97. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Moscovitch A, Trakht I, Brown GM, et al. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action. *Brain Res Bull*. 2010;81(4-5):362-71. Epub 2009/12/17.
98. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005;27(2):101-10. Epub 2005/10/12.
99. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*. 1994;269(46):28531-4. Epub 1994/11/18.
100. Ambriz-Tututi M, Rocha-Gonzalez HI, Cruz SL, Granados-Soto V. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sci*. 2009;84(15-16):489-98. Epub 2009/02/19.
101. Nosedá R, Hernández A, Valladares L, Mondaca M, Laurido C, Soto-Moyano R. Melatonin-induced inhibition of spinal cord synaptic potentiation in rats is MT2 receptor-dependent. *Neurosci Lett*. 2004;360(1-2):41-4. Epub 2004/04/15.
102. Dubocovich ML. Melatonin receptors in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol*. 1991;294:255-65. Epub 1991/01/01.
103. Morris RW, Lutsch EF. Daily susceptibility rhythm to morphine analgesia. *J Pharm Sci*. 1969;58(3):374-6. Epub 1969/03/01.

104. Lutsch EF, Morris RW. Light reversal of a morphine-induced analgesia susceptibility rhythm in mice. *Experientia*. 1971;27(4):420-1. Epub 1971/04/15.
105. Rosenfeld JP, Rice PE. Diurnal rhythms in nociceptive thresholds of rats. *Physiol Behav*. 1979;23(2):419-20. Epub 1979/08/01.
106. Lakin ML, Miller CH, Stott ML, Winters WD. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci*. 1981;29(24):2543-51. Epub 1981/12/14.
107. Mickle A, Sood M, Zhang Z, Shahmohammadi G, Sengupta JN, Miranda A. Antinociceptive effects of melatonin in a rat model of post-inflammatory visceral hyperalgesia: a centrally mediated process. *Pain*. 2010;149(3):555-64. Epub 2010/04/24.
108. Shin DJ, Jeong CW, Lee SH, Yoon MH. Receptors involved in the antinociception of intrathecal melatonin in formalin test of rats. *Neurosci Lett*. 2011;494(3):207-10. Epub 2011/03/15.
109. Esposito E, Paterniti I, Mazzon E, Bramanti P, Cuzzocrea S. Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. *J Pineal Res*. 2010;49(4):321-31. Epub 2010/07/30.
110. Wang S, Zhang L, Lim G, Sung B, Tian Y, Chou CW, et al. A combined effect of dextromethorphan and melatonin on neuropathic pain behavior in rats. *Brain Res*. 2009;1288:42-9. Epub 2009/07/15.
111. Yoon MH, Park HC, Kim WM, Lee HG, Kim YO, Huang LJ. Evaluation for the interaction between intrathecal melatonin and clonidine or neostigmine on formalin-induced nociception. *Life Sci*. 2008;83(25-26):845-50. Epub 2008/11/13.
112. 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. Epub 2007/03/10.
113. Arreola-Espino R, Urquiza-Marin H, Ambriz-Tututi M, Araiza-Saldana CI, Caram-Salas NL, Rocha-Gonzalez HI, et al. Melatonin reduces formalin-induced nociception and

- tactile allodynia in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;577(1-3):203-10. Epub 2007/10/09.
114. Li SR, Wang T, Wang R, Dai X, Chen Q, Li RD. Melatonin enhances antinociceptive effects of delta-, but not mu-opioid agonist in mice. *Brain Res.* 2005;1043(1-2):132-8. Epub 2005/05/03.
115. Zahn PK, Lansmann T, Berger E, Speckmann EJ, Musshoff U. Gene expression and functional characterization of melatonin receptors in the spinal cord of the rat: implications for pain modulation. *J Pineal Res.* 2003;35(1):24-31. Epub 2003/06/26.
116. Naguib M, Hammond DL, Schmid PG, 3rd, Baker MT, Cutkomp J, Queral L, et al. Pharmacological effects of intravenous melatonin: comparative studies with thiopental and propofol. *Br J Anaesth.* 2003;90(4):504-7. Epub 2003/03/20.
117. El-Shenawy SM, Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Batran S, Arbid MS. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. *Pharmacol Res.* 2002;46(3):235-43. Epub 2002/09/11.
118. Onal SA, Inalkac S, Kutlu S, Kelestimur H. Intrathecal melatonin increases the mechanical nociceptive threshold in the rat. *Agri.* 2004;16(4):35-40. Epub 2004/11/13.
119. Naguib M, Baker MT, Spadoni G, Gregerson M. The hypnotic and analgesic effects of 2-bromomelatonin. *Anesth Analg.* 2003;97(3):763-8. Epub 2003/08/23.
120. Golombek DA, Escolar E, Burin LJ, De Brito Sanchez MG, Cardinali DP. Time-dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism. *Eur J Pharmacol.* 1991;194(1):25-30. Epub 1991/02/26.
121. Jeong JH, Choi KB, Yi BC, Chun CH, Sung KY, Sung JY, et al. Effects of extremely low frequency magnetic fields on pain thresholds in mice: roles of melatonin and opioids. *J Auton Pharmacol.* 2000;20(4):259-64. Epub 2001/03/22.
122. Mantovani M, Kaster MP, Pertile R, Calixto JB, Rodrigues AL, Santos AR. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *J Pineal Res.* 2006;41(4):382-9. Epub 2006/10/04.

123. Ray M, Mediratta PK, Mahajan P, Sharma KK. Evaluation of the role of melatonin in formalin-induced pain response in mice. *Indian J Med Sci.* 2004;58(3):122-30. Epub 2004/03/31.
124. Tu Y, Sun RQ, Willis WD. Effects of intrathecal injections of melatonin analogs on capsaicin-induced secondary mechanical allodynia and hyperalgesia in rats. *Pain.* 2004;109(3):340-50. Epub 2004/05/26.
125. Golombek DA, Pevet P, Cardinali DP. Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996;20(3):403-12. Epub 1996/01/01.
126. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(2):50-6. Epub 1995/02/01.
127. Yu CX, Zhu B, Xu SF, Cao XD, Wu GC. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol.* 2000;403(1-2):49-53. Epub 2000/09/02.
128. Odagaki Y, Nishi N, Koyama T. Functional coupling of GABA(B) receptors with G proteins that are sensitive to N-ethylmaleimide treatment, suramin, and benzalkonium chloride in rat cerebral cortical membranes. *J Neural Transm.* 2000;107(10):1101-16. Epub 2000/12/29.
129. van den Top M, Buijs RM, Ruijter JM, Delagrangé P, Spanswick D, Hermes ML. Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic nucleus neurones in vitro independent of their circadian rhythm. *Neuroscience.* 2001;107(1):99-108. Epub 2001/12/18.
130. Nelson CS, Marino JL, Allen CN. Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport.* 1996;7(3):717-20. Epub 1996/02/29.
131. Vanegas H, Schaible H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain.* 2000;85(1-2):9-18. Epub 2000/02/29.

132. Ayar A, Martin DJ, Ozcan M, Kelestimur H. Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett*. 2001;313(1-2):73-7. Epub 2001/10/31.
133. Chuchuen U, Ebadi M, Govitrapong P. The stimulatory effect of mu- and delta-opioid receptors on bovine pinealocyte melatonin synthesis. *J Pineal Res*. 2004;37(4):223-9. Epub 2004/10/16.
134. Yu CX, Wu GC, Xu SF, Chen CH. [Effect of melatonin on release of beta-endorphin, norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in rat brain]. *Yao Xue Xue Bao*. 2001;36(1):5-9. Epub 2003/02/13.
135. Pierrefiche G, Zerbib R, Laborit H. Anxiolytic activity of melatonin in mice: involvement of benzodiazepine receptors. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1993;82(2):131-42. Epub 1993/11/01.
136. Golombek DA, Escolar E, Cardinali DP. Melatonin-induced depression of locomotor activity in hamsters: time-dependency and inhibition by the central-type benzodiazepine antagonist Ro 15-1788. *Physiol Behav*. 1991;49(6):1091-7. Epub 1991/06/01.
137. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res*. 1997;23(2):106-16. Epub 1997/12/10.
138. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Caputi AP. Regulation of prostaglandin production in carrageenan-induced pleurisy by melatonin. *J Pineal Res*. 1999;27(1):9-14. Epub 1999/08/18.
139. Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*. 2001;430(2-3):351-7. Epub 2001/11/17.

140. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys*. 2001;34(2):237-56. Epub 2002/03/20.
141. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int*. 1995;26(5):497-502. Epub 1995/05/01.
142. Peres MF. Melatonin, the pineal gland and their implications for headache disorders. *Cephalalgia*. 2005;25(6):403-11. Epub 2005/05/25.
143. 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. Epub 2010/01/20.
144. 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. Epub 2010/12/17.
145. 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. Epub 2010/02/27.
146. 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. Epub 2008/09/23.
147. 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. Epub 2010/09/09.
148. Ismail SA, Mowafi HA. Melatonin provides anxiolysis, enhances analgesia, decreases intraocular pressure, and promotes better operating conditions during cataract surgery under topical anesthesia. *Anesth Analg*. 2009;108(4):1146-51. Epub 2009/03/21.

149. Nelson FA, Farr LA, Ebadi M. Salivary melatonin response to acute pain stimuli. *J Pineal Res.* 2001;30(4):206-12. Epub 2001/05/08.

7 ARTIGOS

7.1 Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies (Arquivos de Neuropsiquiatria 2011;69:943-948)

Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies

Pedro Schestatsky¹, Luciana Cadore Stefani², Paulo Roberto Sanches³, Danton Pereira da Silva Júnior³, Iraci Lucena Silva Torres², Letizzia Dall-Agnol², Luciane Fachin Balbinot⁴, Wolnei Caumo^{2,4,6}

¹Neurology Department, EMG Unit from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre RS, Brazil; ²Post-Graduation Program of Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brazil; ³Biomedical Engineering of HCPA; ⁴Post-Graduation Program of Neuroscience, UFRGS; ⁵Anesthetist, Pain and Palliative Care Service at HCPA; ⁶Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, Porto Alegre RS, Brazil.

Correspondence and reprints should be addressed to:

Wolnei Caumo, MD, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Laboratory of Pain & Neuromodulation

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003

Bairro Rio Branco - Porto Alegre - RS – Phone (51) 3359.8083

E-mail: caumo@cpovo.net

Declaration of interests

The authors declare that there are not financial or other relationships that might lead to conflicts of interest.

ABSTRACT

Quantitative sensory testing (QST) is defined as the determination of thresholds for sensory perception under controlled stimulus. Our aim was to validate a new QST device for Brazilian sample. In 20 healthy adults, thermoalgesic thresholds were assessed using a QST prototype (Heat Pain Stimulator-1.1.10; Brazil). A $30 \times 30 \text{ mm}^2$ thermode with a 1°C/s stimulus change rate were applied. Thresholds of three consecutive stimuli were averaged in two different sessions separated by at least two weeks. Additionally long thermal heat pain stimulus was performed. To evaluate the consistency of our method we also analyzed 11 patients with small fiber neuropathy. Results showed good reproducibility of thermal perception thresholds in normal individuals and plausible abnormal thresholds in patients. We conclude that our QST device is reliable when analyzing the nociceptive pathway in controls and patients.

Key words: quantitative sensory testing, validation, nociceptive pathway, psychophysics, heat pain stimulation.

Validação de um aparelho brasileiro de teste de quantificação sensitiva para o diagnóstico de neuropatia de fibras finas

RESUMO

Teste de quantificação sensitiva (TQS) significa determinação de limiares de percepção sensitiva frente a um estímulo de intensidade controlada. Nosso objetivo foi validar um novo equipamento de TQS adaptado à população brasileira. Em 20 adultos saudáveis, limiares termoalgésicos foram avaliados, utilizando um aparelho protótipo do TQS (Heat Pain Stimulator-1.1.10; Brazil). Foi utilizado um termodo de $30 \times 30 \text{ mm}^2$, com estímulo térmico de 1°C/s . A média dos limiares de três estímulos consecutivos foi obtida em duas sessões diferentes, separadas por pelo menos 2 semanas. Adicionalmente, foram aplicados estímulos térmicos dolorosos de longa duração. Para avaliar a consistência do nosso método, foram também analisados 11 pacientes com neuropatia de fibras finas. Os resultados mostraram boa reprodutibilidade dos limiares de percepção nos indivíduos saudáveis, assim como limiares anormais nos pacientes. Em conclusão, nosso aparelho de TQS apresentou boa confiabilidade ao analisar a via nociceptiva de controles e pacientes.

Palavras-Chave: teste de quantificação sensitiva, validação, via nociceptiva, estímulo termoalgésico.

Quantitative sensory testing (QST) is a widely used psychophysical method for quantification of sensory function [1,2]. Although this method gives valid information on large fiber status, the term “QST” is normally used for small fiber and nociceptive pathway assessment, using controlled thermal, instead of tactile or vibratory stimuli [3-6]. This method is important for the diagnosis of neuropathies for two main reasons. First, because small fiber dysfunction is usually the first alteration in axonal neuropathies (i.e., diabetic) the QST could aid in its early diagnosis [7]. Second, contrary to QST, conventional nerve conduction studies are unable to assess small fiber function [1].

Differently than nerve conduction studies, QSTs are psychophysical in nature, requiring cooperation from the patient [2]. While the sensory stimulus is controlled by the examiner during QST, the response represents the subjective perception of thermoalgesic stimulus. If abnormal, the QST result may signalize dysfunction anywhere along the sensory pathway between thermal receptors, small fibers, spinothalamic tract and other cerebral areas i.e, pain matrix [8].

But how is perception measured? By means of controlled thermal stimuli, the patient is asked to press a button when he (she) feels different thermal perceptions from a thermode device in contact with the skin. Warm perception thresholds are used as a parameter reflecting the function of unmyelinated C-fibers, whereas heat pain and cold perception thresholds indicate A δ -fiber function; and to a lesser extent also the function of subgroups of C-fibers [9,10]. However, in clinical routine, because cold thresholds are more variable, warm and heat pain thresholds are measured preferentially [2]. Figure 1 shows the most common QST abnormalities in different clinical conditions [8].

In the last few years QST has been one of the main methods used in human experimental pain models and in the early diagnosis of neuropathies [6,11]. However, although considered an important tool in Neurology, QST devices are not easily available in most neurophysiologic laboratories worldwide. One of the reasons for such a lack of availability is the high cost and the complexity of the grading sensory system. In Brazil, few centers have been developing QST devices [12,13], but no validation studies have been reported so far. Our aim is to show our experience in the development of a new computer-controlled thermal stimulation device, demonstrate its reliability in repetitive sessions within controls and patients and propose standardized QST verbal instructions for Brazilian patients.

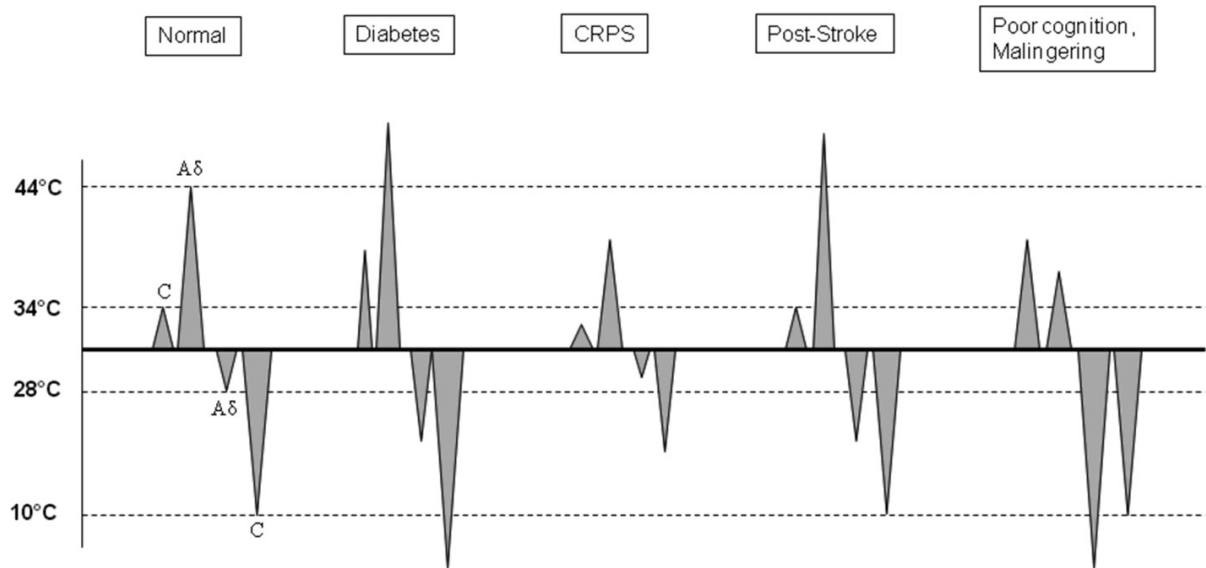


Fig 1. The most common quantitative sensory testing abnormalities in different clinical conditions.

METHOD

Subjects

We selected 20 healthy volunteers (10 men) aged from 22 to 44. We excluded subjects with peripheral nervous system diseases or using medication that could affect the sensory perception, such as psychotropic and analgesic medications. All subjects assigned the informed consent that was approved by the ethics committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Patients

We selected 11 age and sex-matched patients with painful neuropathies from the Neuromuscular Ambulatory from our institution, six of them with diabetes mellitus, four with leprosy and two with human immunodeficiency virus. All of them complaining of typical neuropathic pain over distal extremities.

Equipment

The system for heating/cooling of the thermal stimulator was based on Peltier principle. This module is a thermoelectric element which generates a temperature difference between the two sides of the component, coupled to an aluminum polished surface (Fig 2A) that gets in contact with the patient's skin (Fig 2B). The aluminum plate temperature is monitored by a temperature sensor, which has a response time of tenths of a second. The analog temperature after conditioning was sampled with 100 Hz and recorded with a 10 bit resolution. This signal is displayed in real time on the computer screen and is used to control the module temperature. This control is performed by the microcontroller that generates a pulsed signal

applied to the power stage, which provides the current levels for the Peltier module excitation. The temperature of the thermode rised in a constant rate or stabilized in a predefined temperature during the experiment. To ensure this constant rising of temperature, a digital controller was implemented through software developed in visual basic platform on personal a computer. The patient can stop the heat at any time if he/she feels discomfort. In this case, temperature and time interval are monitored. Apart from the button that is used to mark the temperature in which the subject feels warm and heat pain sensations, the system also provides a linear analog input to inform, by means of a manual lever (Fig 2C), the intensity of discomfort on a visual analogue scale ranging from 0 (no discomfort) to 10 (intolerable pain). The system has an additional safety device, that automatically turns off the module when temperature reaches 52°C in order to avoid skin damage. The temper- ature and pain analog scale curves were stored in files for later analysis. Figure 3 shows a scheme of QST set up.

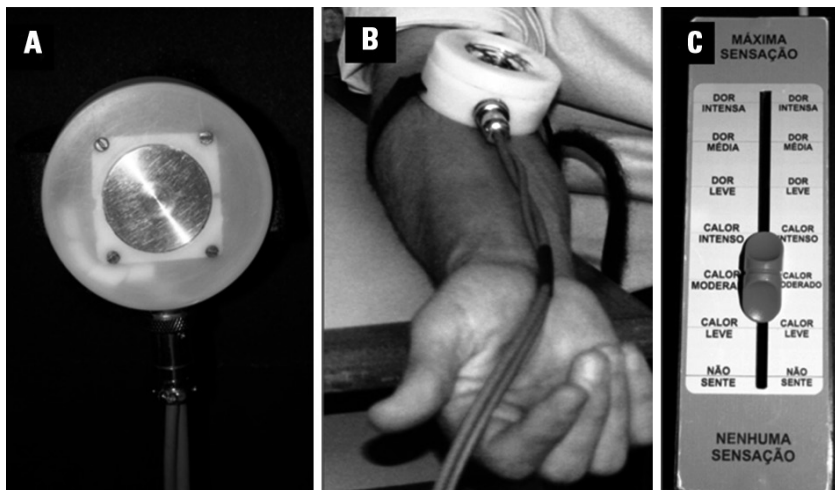


Fig 2. Quantitative sensory testing devices: [A] Thermode; [B] Position of the thermode in the arm; [C] Electronic visual analogue scale.

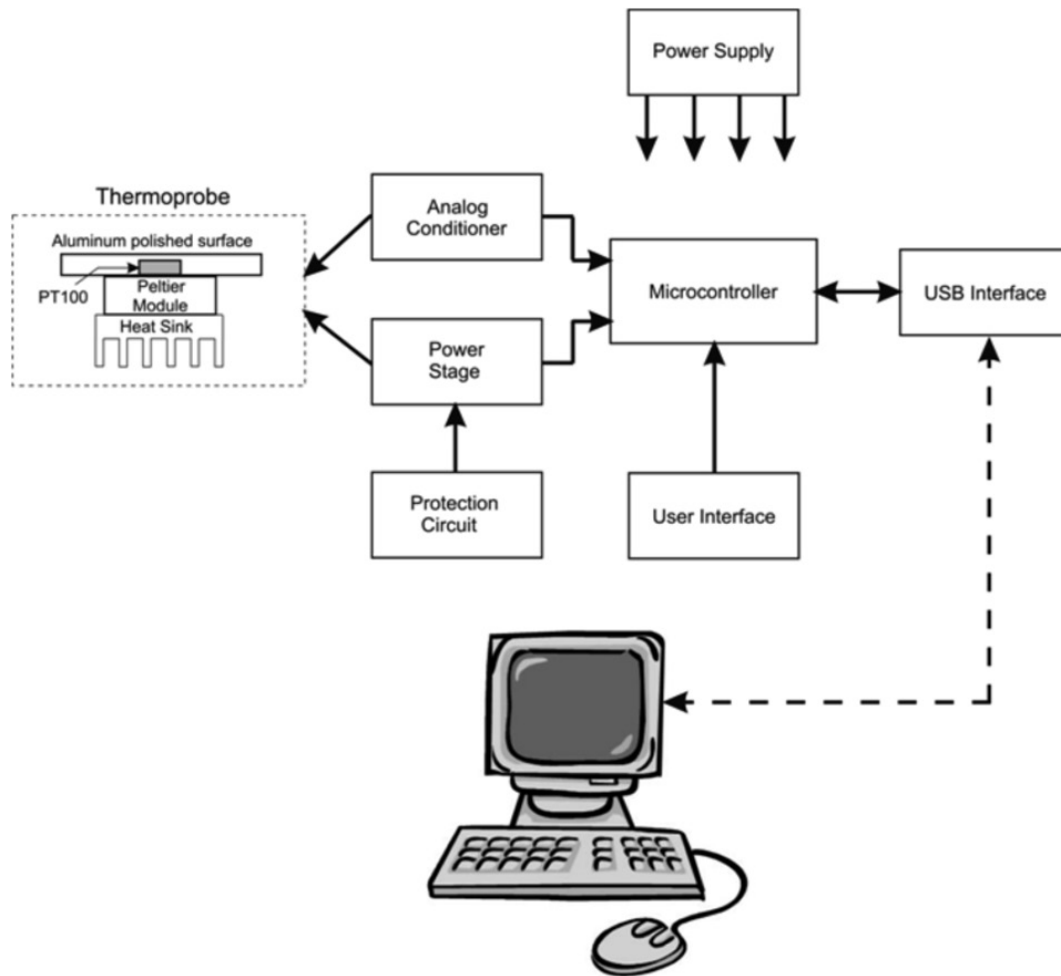


Fig 3. The quantitative sensory testing set up scheme.

Experimental procedure

The evaluation was performed in a quiet, semidark room, at a temperature between 23°C and 24°C. Subjects were always addressed by the same researcher (LCS), who systematically read the instructions and explained the standardized experimental procedure, using a previously published QST protocol orientation [14] adapted to Brazilian portuguese language.

Thermoalgesic stimuli were delivered through a Peltier thermode of a surface of $30 \times 30 \text{ mm}^2$ (Heat Pain Stimulator-1.1.10, Brazil). Baseline temperature was always set at 30°C and ramp rate was fixed at 1°C/s, to a maximum at 52°C. Subjects were seated on a comfortable chair with arms on the arm rest, and had the Peltier's thermode attached with a velcro strip to the ventral aspect of their mid forearm Figure 2B. We changed slightly the exact site of the skin where the thermode was applied between three consecutive trials. Subjects had an available button to press to immediately stop the thermoalgesic stimuli, when necessary. For all tests, we used the same software to apply a controlled change in the thermode temperature. Subjects were requested to pay attention to the thermal sensation and avoid speaking, coughing or

breathing deeply during the experiment. In order to confirm that the thermode was homogeneously heated we also perform thermography (Eletrophysics, PV320T) in some subjects. All signals were represented on a screen out of the subject's visual field, for on-line monitoring and off-line analysis. We assessed warm and heat pain thresholds, as well as sensory perception during long 45°C thermal stimulation, in two different occasions with at least two-week interval for each subject.

Warm and pain thresholds

Warm and pain thresholds were assessed with the method of limits [2]. The thermode was placed on the non-dominant upper arm. After a warning signal, the temperature rose from an adaptation temperature of 30°C with a ramp rate of 1°C/s. The participant was asked to press as quickly as possible a button at the moment the stimulation became warm or painful. Three assessments were taken with an interstimulus interval of 40 seconds¹⁵ and thresholds were calculated by taking the average temperature of the three assessments.

Long painful thermal stimulation

The thermode temperature was rapidly increased up to 45°C. Then, this temperature was maintained for 60 seconds. During this time, subjects marked their perception using an electronic visual analogue scale (VAS), with six different levels of perception:[15] (1) no temperature perception; (2) light warm; (3) medium warm; (4) light pain; (5) medium pain and (6) high pain perception. We considered levels 2 and 4 as thresholds for warm and pain, respectively.

Statistical analyses

All statistical analyses were done using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows version 16. Correlations between the indices of two separate measurements of warm threshold and heat pain thresholds were tested by Pearson coefficient. Also, the reproducibility of assessments was tested by intraclass coefficient. Student's t test was used for threshold comparisons between patients and controls. All analyses were performed with confidence interval of 95%.

RESULTS

Twenty healthy volunteers (10 females) participated in this study. Average age was 28±6.6 years. The correlation indices and intraclass coefficient average for warm and pain thresholds are presented in Table. No differences were found between thermal thresholds obtained with button versus electronic VAS (Student's t test; $p > 0.05$ for all comparisons).

When analyzing three patients with small fiber diseases and pain we observed elevated warm and heat thresholds in all of them. Figure 4 shows illustrative examples of normal (4A) and abnormal (4B) thresholds obtained from illustrative control subject and patient, respectively. Thermography recordings showed homogenous increment of skin temperature in a circumscribed area that exactly matched with the thermode dimensions (Fig 5). Although skin redness was observed in the vast majority of the subjects, no major skin injuries occurred in any of them. Subjective perception during long painful stimulation followed a stereotyped pattern in controls. Most subjects moved the lever very rapidly; right after thermode had started to cool down. Differently, patients maintained the lever in pain sensation in the electronic VAS even after the thermode was cold. Figure 6 illustrates such differences showing another control subject (Fig 6A) and patient (Fig 6B) submitted to long painful stimulus.

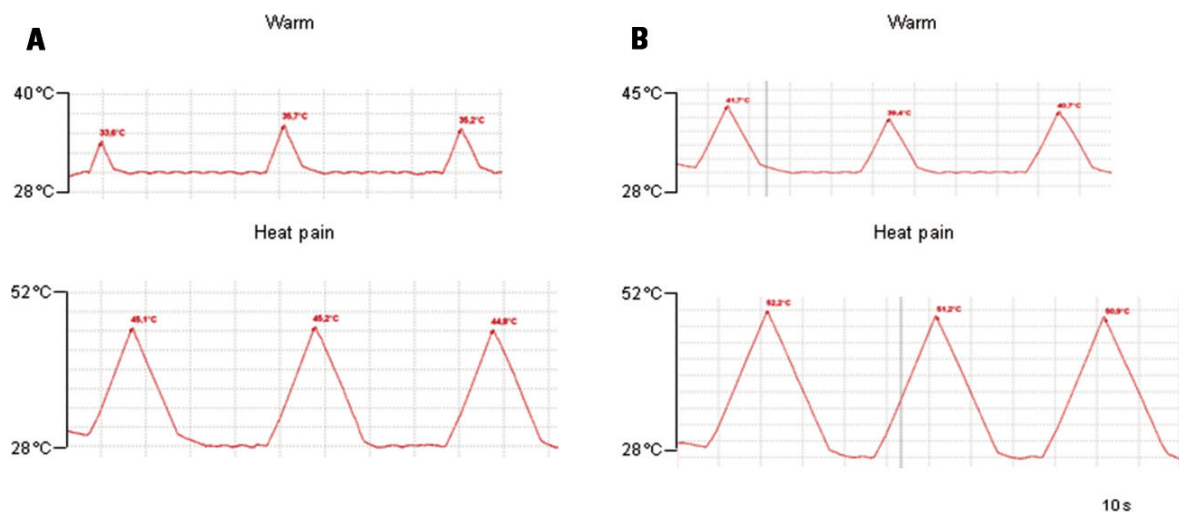


Fig 4. Thermal thresholds in normal subjects [A] and patients with small fiber disease [B]. Note higher thresholds for warm and pain sensation in a illustrative patient.

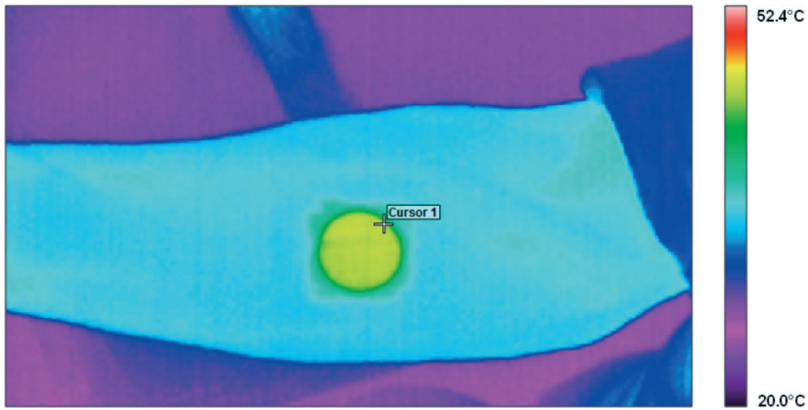


Fig 5. Thermography recording after heat pain stimulation. Note the size of the thermode imprinting in the skin and the actual achieved temperature.

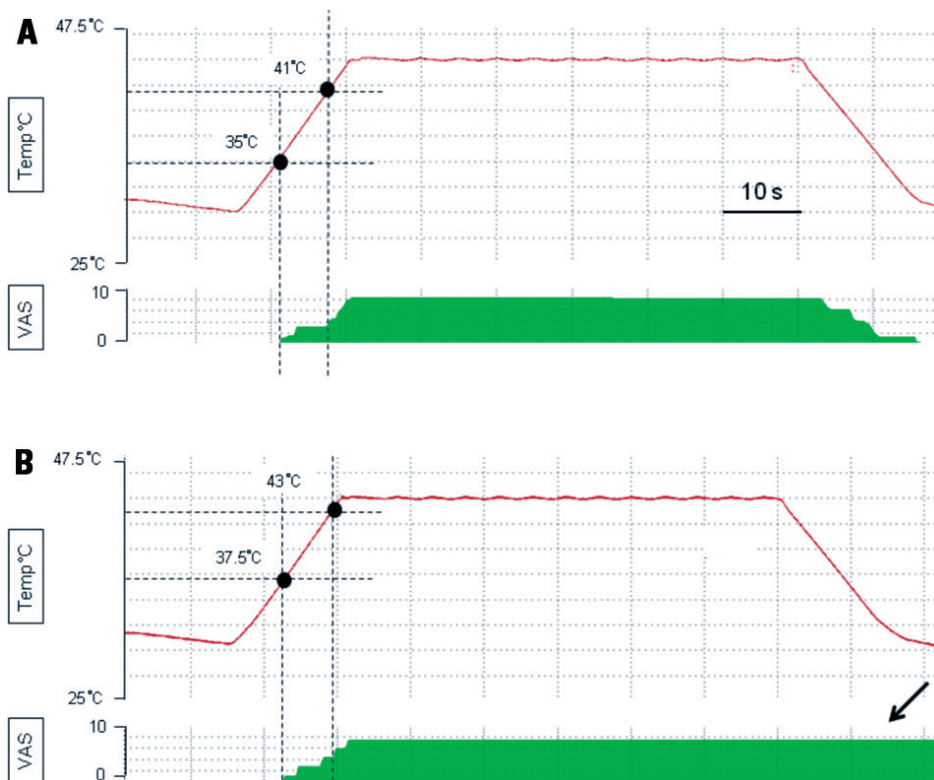


Fig 6. Long painful stimulation. Note the lower thermal thresholds of illustrative patient [B] in comparison with a control subject [A]. Also, note the persistency pain perception (black arrow) even after the stimulus has ceased.

Thresholds	Assessment		Pearson coefficient	Intraclass coefficient
	First	Second		
Warm (°C)	35.6±1.3	35.3±1.4	0.8*	0.88*
Heat Pain (°C)	44.5±2.5	43.3±2.9	0.91*	0.92*

*p<0.001.

Table. Mean and standard deviation values for thermoalgesic thresholds and correlation coefficients between quantitative sensory testing sessions.

DISCUSSION

Our study has four main findings: (1) All thermal thresholds values were compatible with normal thermo- algesic transmission from warm and pain receptors to the brain; (2) All values were highly reproducible among time-separated measurements; (3) Thermal thresholds obtained with the button were the same obtained with electronic VAS and (4) As expected, abnormal thermal thresholds were observed in patients with small fiber dysfunction.

Several algorithms have been suggested to determine thermal perception thresholds [3,9,16]. Two general schemes have emerged: the method of limits and the method of levels [2]. In the method of limits, a subject is required to indicate as soon as an increasingly thermal stimulus is detected. Therefore this method is considered “time reaction inclusive”. In the method of levels, stimuli of defined intensity levels are tested with the subject signaling whether a specific level is detected. In this case, thresholds are not dependent on reaction time and they are usually higher than the method of limits. Both tests are reliable, however the method of levels is time consuming (6 times longer than the method of limits) and no differences in sensitivity between the two methods were seen in diabetic patients [17].

It is important to stress that QST does not measure pain itself. Actually QST measure sensory deficit that could be or not related to pain complaints. In a patient with chronic pain, lower thermal thresholds point to hyperalgesia, whereas elevated warm and heat pain thresholds point to a small fiber dysfunction which sometimes leads to neuropathic pain [6,8,11,18].

The thresholds for warm and heat pain stimuli obtained in this study are in agreement with previously published reports [4,15,19,20]. In addition, psychophysical responses to long thermal stimulation were also similar to previous results [21]. An interesting finding was the greater variability of heat pain thresholds in comparison to warm thresholds. This is in line with previous study [20] and may be explained by the fact that pain is greatly influenced by

modulatory mechanisms [22]. The long thermal stimulation protocol also brought some interesting findings. Normal subjects almost always have their perception decreased after a few seconds of steady pain stimulation. This can be explained by the refractoriness of thermal receptors after prolonged excitation making the brain equivocally think that there is a transient reduction of sensation. Another curious finding was the maintenance of pain perception such as seen in an illustrative patient with small fiber disease. This can be assumed to be an after sensation phenomenon, a very typical finding in patients with neuropathic pain due to spinal central sensitization after peripheral lesions [23]. These findings highlight the usefulness of an electronic VAS instead of a conventional and static button pressed when relevant perceptions are perceived. Besides, this strategy also serve not only as confirmation of the subject's ability to detect and perceive pain, but also as a method for monitoring the possibility that innocuous stimuli are painful in sporadic cases of allodynia phenomenon [20]. Thus, incorporating simultaneous electronic VAS during thermal stimulation would make the QST more complete as a diagnostic procedure.

Apart from the accuracy of thermal thresholds we have also observed a very good reproducibility within subjects, which is in accordance with several authors [24-27]. In fact, the QST reproducibility in normal subjects is probably better than that of patients with neuropathy [28].

Our study has two main limitations. First we do not use thermodes with different ramp rates in different body sites. In the same way we only used a large thermode and this could not be sensitive enough to detect mild neuropathy because of spatial summation [29]. However, the ramp rate and body location used in this study was mainly employed by others, [2] and large thermode allows sensation to be more easily discriminated in normal skin [30] and provide more reproducible thresholds [26]. Indeed, small thermodes should be used only at rounded body surfaces [5]. Second, we do not perform electrophysiological studies in order to confirm the absence of subclinical small fiber disease i.e., laser or contact heat-evoked potentials. However none of our subjects complained of any sensory disturbances neither have some risk factor for small fiber neuropathy.

Despite the limitations of our study, our QST device showed good accuracy and reproducibility in both controls and patients. Using QST, sensory deficits may be quantified and the data can be used in parametric statistical analysis. Therefore, this tool can reliably be used for research and clinical purposes adapted to Brazilian portuguese language. Further studies are needed using different body regions and thermode sizes.

REFERENCES

1. Zaslansky R, Yarnitsky D. Clinical applications of quantitative sensory testing (QST). *J Neurol Sci* 1998;153:215-338.
2. Chong PS, Cros DP. Technology literature review: quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 2004;29:734-747.
3. Fruhstorfer H, Lindblom U, Schmidt WC. Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1976;39:1071-1075.
4. Yarnitsky D, Sprecher E, Zaslansky R, Hemli JA. Heat pain thresholds: normative data and repeatability. *Pain* 1995;60:329-332.
5. Hilz MJ, Stemper B, Axelrod FB, Kolodny EH, Neundörfer B. Quantitative thermal perception testing in adults. *J Clin Neurophysiol* 1999;16:462-471.
6. Arendt-Nielsen L, Yarnitsky D. Experimental and clinical applications of quantitative sensory testing applied to skin, muscles and viscera. *J Pain* 2009;10:556-572.
7. Jensen TS, Bach FW, Kastrup J, Dejgaard A, Brennum J. Vibratory and thermal thresholds in diabetics with and without clinical neuropathy. *Acta Neurol Scand* 1991;84:326-333.
8. Schestatsky P, Nascimento OJ. What do general neurologists need to know about neuropathic pain? *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67:741-749.
9. Verdugo R, Ochoa JL. Quantitative somatosensory thermotest: a key method for functional evaluation of small calibre afferent channels. *Brain* 1992;115:893-913.
10. Campero M, Serra J, Ochoa JL. C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol* 1996;497:565-572.
11. Cruccu G, Anand P, Attal N, et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. *Eur J Neurol* 2004;11:153-162.
12. Villarroel MF, Orsini MB, Lima RC, Antunes CM. Comparative study of the cutaneous sensation of leprosy-suspected lesions using Semmes- Weinstein monofilaments and quantitative thermal testing. *Lepr Rev* 2007;78:102-109.
13. Azevedo E, Silva A, Martins R, Andersen ML, Manzano GM, Tufik S. Activation of C-fiber nociceptors by low power diode laser (extracted from Doctoral Thesis of Eduardo Azevedo Pacheco entitled “Estudo do limiar nociceptivo durante a privação de sono utilizando o potencial evocado por laser” – UNIFESP, 2010).
14. Rolke R, Baron R, Maier C, et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): Standardized protocol and reference values. *Pain* 2006;123:231–243.
15. Schestatsky P-a, Algaba R, Pérez D, et al. Transient decrease of sensory perception after thermoalgesic stimuli for quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 2007;36:466-470.
16. Dyck PJ, O'Brien PC, Kosanke JL, Gillen DA, Karnes JL. A 4, 2, and 1 stepping algorithm for quick and accurate estimation of cutaneous sensation threshold. *Neurology* 1993;43:1508-1512.
17. Claus D, Hilz MJ, Neundorfer B. Thermal discrimination thresholds: a comparison of different methods. *Acta Neurol Scand* 1990;81:533-540.

18. Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain. Seattle: IASP Press 1994.
19. Yarnitsky D, Sprecher E. Thermal testing: normative data and repeatability for various test algorithms J Neurol Sci 1994;125:39-45.
20. Kelly KG, Cook T, Backonja MM. Pain ratings at the thresholds are necessary for interpretation of quantitative sensory testing. Muscle Nerve 2005;32:179-184.
21. Schestatsky P, Callejas MA, Valls-Solé J. Abnormal modulation of electrodermal activity by thermoalgesic stimuli in patients with primary palmar hyperhidrosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2011;82:92-96.
22. Fields HL. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. Prog Brain Res 2000;122:245-253.
23. Jensen TS, Baron R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. Pain 2003;102:1-8.
24. Bertelsmann FW, Heimans JJ, Weber EJ, van der Veen EA, Schouten JA. Thermal discrimination thresholds in normal subjects and in patients with

7.2 BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects (Neuroscience Letters 2012;514:62-66)

BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects

Luciana Cadore Stefani, M.D.¹; Iraci Lucena da Silva Torres³, Phm, PhD^{1, 3}; Izabel Cristina Custodio de Souza, Biol., PhD¹; Joanna Ripoll Rozisky, Phm, MsH¹; Felipe Fregni, M.D., PhD^{4,5,6}; Wolnei Caumo, M.D., PhD^{1,3}

Post-Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) ¹; Anesthetist, Pain and Palliative Care Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) ²; and Associate Professor, Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brazil ³; Director, Laboratory of Neuromodulation, Department of Physical Medicine & Rehabilitation, Spaulding Rehabilitation Hospital & Massachusetts General Hospital; ⁴Associate Professor of Physical Medicine & Rehabilitation Associate Professor of Neurology Harvard Medical School. ⁵ Berenson-Allen Center for Noninvasive Brain Stimulation, Department of Neurology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA.

Correspondence and reprints should be addressed to:

Wolnei Caumo, MD, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Laboratory of Pain & Neuromodulation

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003

Bairro Rio Branco - Porto Alegre - RS – Phone (51) 3359.8083

E-mail: caumo@cpovo.net

Declaration of interests

The authors declare that there are not financial or other relationships that might lead to conflicts of interest.

Abstract

BDNF is an important marker of neuronal plasticity. It has also been associated with pain processing. Increased BDNF levels are observed in chronic pain syndromes. In order to understand the role of BDNF associated with other factors such as gender on experimental pain we aimed to determine whether experimental heat or pressure pain threshold is correlated with brain derived neurotrophic factor (BDNF) level, gender and age. Heat pain threshold and pressure pain threshold were measured in 49 healthy volunteers (27 females). The multivariate linear regression models (on heat and pressure pain thresholds) revealed a significant effect of gender ($p=0.001$ for both models), serum BDNF ($p<0.004$ for both models) and interaction between BDNF and gender (<0.001 for both models). In fact, when adjusting for BDNF levels and age, heat and pressure pain thresholds were significantly reduced in women as compared to men ($p<0.001$ for both models). These effects were not observed when gender was analyzed alone. These finding suggests that experimental heat and pressure pain threshold is gender-related and BDNF dependent. In fact BDNF has a facilitatory effect on pain threshold in females but has an opposite effect in males; supporting the notion that BDNF is an effect modifier of the gender effects on pain threshold in healthy subjects.

Keywords: pain threshold; BDNF; neuroplasticity and pain

Introduction

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is an important marker and modulator of neural activity and NMDA receptor dependent neuronal plasticity in ascending and descending pain transmission pathways [25]. In animals, BDNF and its TrkB receptor are increased in models of bladder inflammation and nerve injury [33, 49]. In humans, increased BDNF levels are associated with pain in chronic pancreatitis [33, 56]. In addition, when neutralizing BDNF by anti-BDNF antibody, or TrkB receptor, mechanical allodynia[55]and thermal hyperalgesia were relieved [10].

Furthermore, pain-related BDNF activity seems to be related to gender. In rats BDNF appears to worsen visceral pain in females while the opposite effect in males is observed [23]. In addition, in previous studies, BDNF was associated with a specific effect on depression-like behavior in rats, suggesting that there may be a sexual dimorphism in BDNF function [30]. Though there is evidence of gender-specific BDNF effects in animals; it remains to be determined whether similar mechanisms are observed in humans specially when associated with pain modulation.

Gender effects of behavioral pain have been extensively documented. It is well known that females experience more pain than male in various pain states [7, 17, 34]. For example, prevalence of various visceral pain disorders, such as chronic pelvic pain and irritable bowel syndrome, is more prevalent in women than men [7]. Similar effects have been demonstrated for experimental thermal pain [8]electrical pain, [48]mechanical pain, [18, 21], ischemic pain [24]and in some types of chronic pain such as in fibromyalgia [14] and migraine [3, 51]. Moreover, gender differences in perceived pain to a standardized painful stimulus show that this pain induces differential cortical activity in mid cingulate cortex [15], prefrontal cortex, insula, and thalamus [35] indicating overall that women show increased activity across brain regions associated with medial pain pathway processing. Because this pathway is thought to code for affective/ motivational components of the pain experience [37-38], increased activity

here supports the notion that gender differences in perceived pain are attributable to an affective (state-sensitive) recoding of pain-related afferent signaling.

In summary, previous evidence consistently supports the idea that BDNF contributes to the development and sustainability of various pain states due to its critical role in plasticity-related processes in pain pathways, both at spinal and supraspinal levels [27]. Given animal data, BDNF may also have differential gender effects in pain processing in humans. We therefore aim to investigate whether there is a gender difference in experimentally induced heat and pressure pain thresholds, and then determine whether these differences are explained by differences in BDNF levels.

Subjects and methods

The study protocol was approved by the Ethics Committee at the institution in which the work was carried out and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants signed an informed consent form. Forty-nine healthy volunteers (27 females) aged from 22 to 40 participated in this study. We excluded subjects with peripheral nervous system diseases or any clinically relevant clinical condition and subjects using medication that could affect the sensory perception, such as neuropsychotropics and analgesic drugs. Finally female subjects were required to have normal menstrual cycles and were not pregnant.

Dependent variables

The dependent variables of interest were heat and pressure pain thresholds. To assess thermal threshold, we determined the quantitative heat pain thresholds using the method of limits on a computer Peltier based device thermode, size 30 x 30 mm. It was attached to the skin on the ventral aspect of the subjects' midforearm. After a trial-run to familiarize the volunteers with the procedures, we performed the test series. Subjects were always assessed by the same researcher, who systematically read the instructions and explained the

standardized experimental procedure using a modified previously published protocol [41] for quantitative sensory testing (QST) assessments.

The baseline temperature was set initially at 32°C and was increased at a rate of 1°C/s, to a maximum at 52°C. The participant was asked to press a button as quickly as possible when stimulation became warm or painful. Three assessments were taken with an interstimulus interval of 40s [46] and thresholds were calculated by taking the average temperature of the three assessments. The position of the thermode was altered slightly between trials (although it remained on the left ventral forearm) to prevent either sensitization or response suppression of cutaneous heat nociceptors.

Pressure Pain Detection thresholds (PPDT) values were quantified using a Fisher's pressure algometer with a surface area of 1.0 cm² (Pain Diagnostics and Thermography, Great Neck, NY 11023). Prior to the test trial, the patient learned to differentiate perception of pressure versus perception of the onset of pain. The subject was then instructed to verbally report perception of the pain onset. During the testing session, the tip of the algometer was applied over the tibial surface. The pressure was gradually increased at a rate of 1 kgf/s. The average values of PPT in kgf/ cm² (lb/cm²) of three successive readings taken at intervals of 3-5 min was used as outcome.

Subjects were asked to say 'stop' immediately when a discernible sensation of pain, distinct from pressure or discomfort, was felt. At this point, the experimenter immediately retracted the algometer [9]. The digital display continued to show the value of pressure applied at the moment the algometer was retracted.

Independent variables

a) The blood level of BDNF was one of the independent variables of interest. Blood samples were collected from all subjects before the experiment. Blood samples were centrifuged in plastic tubes for 10 min at 4500 × g at 4°C, and serum was stored at -80°C for hormone assays. On the day of the assays the samples of serum were thawed and diluted

according to the kit instruction. Each sample was thawed only once. SerumBDNF was determined by ELISA method using commercial kits that follow the basic principles of competitive immunoassays. Serum BDNF was determined using a *ChemiKine* BDNF Sandwich ELISA Kit, CYT306, Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA. The lower detection limits of the kits is 7.8 pg/mL for BDNF. The other main independent variable was gender. We also analyzed the effects of age in our model.

b) Depressive symptoms were assessed by the Beck Depression Inventory (BDI). The final scores varied from 0 to 63 [12].

c) Anxiety was measured with the refined version of the Rash analysis of the State-Trait Anxiety Inventory (STAI), adapted to Brazilian Portuguese [20]. State anxiety (a situation-driven transient anxiety) and trait anxiety (stable personality disposition reflecting general level of fearfulness) were evaluated.

Statistical analysis

To compare the baseline parameters between gender we use *t* test for independent sample. Stepwise multiple linear regression models were performed with heat and pressure pain thresholds as dependent variables. An interaction term for gender *vs.* BDNF was used to assess a possible effect modifier of serum BDNF on the relationship between gender and pain threshold. In order to ensure normally distributed data, we did log transformation for BDNF. Data were analyzed using STATA software (11.0 version, College Station, Texas, US). *p* values less than 0.05 (2-tailed) were considered significant.

Results

Forty nine subjects participated in this study (27 females), see baseline demographic and psychological characteristics in table 1. There were no statistically significant differences in the baseline variables between males and females.

Interestingly, when analyzing experimental pain in females and males, there was a small non-significant difference between groups. The mean \pm standard deviation of pressurepain threshold in males and females was 6.60 ± 1.93 and 6.38 ± 1.97 , respectively; while for heatpain threshold, it was 43.03 ± 3.08 and 42.25 ± 3.80 , respectively.

We then fitted a regression model to assess the relationship of pain, gender and BDNF for both models. These models revealed a significant effect of gender ($p=0.001$ for both models), serum BDNF ($p<0.004$ for both models) and interaction between BDNF and gender (<0.001 for both models). In fact, when adjusting for BDNF levels and age, heat and pressure pain thresholds were significantly reduced in women as compared to men ($p<0.001$ for both models). Age was not significant in both models.

4. DISCUSSION

The purpose of this study was to investigate whether pain modulation (experimental heat and pressure pain thresholds) is gender dependent when controlled for BDNF levels. As expected, women experienced more pain than men when exposed to painful stimulations and adjusted to BDNF levels. These findings suggest that the level of serum BDNF is an important effect modifier for the effects of gender on experimental pain. Higher levels of BDNF were correlated with higher pain thresholds in females and in inversely in males. It is important to emphasize that these data were obtained in healthy volunteers using an experimentally controlled acute pain stimulus.

The present findings support the notion that BDNF levels may be a neurobiological mechanism underlying the gender-related differences in pain thresholds. BDNF has emerged as a key mediator of synaptic plasticity, neuronal connectivity and dendritic arborization [22, 26]. Together with other biological factors, (ex. neurotransmitters, hormones and other neurotrophins) BDNF orchestrates mechanisms of neuronal plasticity and survival. However, in our cross-sectional design, our data only allow us to hypothesize this cause-effect

relationship. Further studies are needed to elucidate the possible mechanism implicated in this response and to clarify the issue about the gender-specific relationship of BDNF on pain thresholds.

Accordingly, the effect of gender in the relationship between BDNF and pain threshold can be explained by the estrogen levels, which regulates the increase in BDNF mRNA in areas associated with nociceptive sensory processing such as hippocampus, cerebral cortex and spinal cord [2]. Therefore the relationship between gender and BDNF on pain threshold observed in this study may indirectly confirm the role of the regulatory effect of estrogen in sensitization of central nervous system centers associated with nociceptive sensory processing. This hypothesis is plausible, because the level of BDNF is regulated by the level of estrogen, which has co-analgesic effect. Furthermore estrogen regulates opioid receptor density in several pain-related areas [PAG, parabrachial nucleus (PBn)]; that is significantly lower in female rats during proestrus (higher plasma estrogen) compared with diestrus and metestrus phases or male rats.[6]. In fact, short-term treatment with estrogen in ovariectomized rats decreases the number of opioid binding sites in the brain, decreasing the analgesic effects of morphine[36]. In addition, estrogen modulates the potency of morphine by influencing G protein coupling[39].

While studies in animals have demonstrated that activity level of the endogenous analgesic system is higher in males than females [4, 29], in human, females have greater response than males [5, 28, 54]. This discrepancy has a neurobiological substrate, because in humans μ -receptors in women female brain are activated differently than those in the male brain[57]. In non-stimulated, no painful condition, a positron emission tomography study showed greater μ -receptors binding in the amygdala in women compared with men. In response to sustained pain, men had larger magnitudes of μ -opioid system activation than women in the anterior thalamus, ventral basal ganglia, and amygdala[57]. This evidence demonstrates that at equivalent levels of pain or stimulus, men and women differ in the

magnitude and direction of response of the μ -opioid system across a wide neural network. Thus, opioid response to pain might explain the opposite effect of BDNF in the relationship between genders and pain threshold.

There may be additional mechanisms to explain this finding. Firstly, other hormones, such as testosterone may also explain these differences as in the case of testosterone, this hormone may protect against the hyperactivity of hypothalamus pituitary-adrenal (HPA) axis[43, 53]; which may be deregulated in stress response between men and women [53, 55]. Also, pain may activate difference neural circuitry in men and women [13, 19, 42]. For instance, Naliboff et al. demonstrated that while women showed greater activation in the ventromedial prefrontal cortex, right anterior cingulate cortex, and left amygdala in response to a visceral stimulus; men showed greater activation of the right dorsolateral prefrontal cortex, insula, and dorsal pons/periaqueductal gray [32].

Secondly, one can hypothesize that the gender-specific effects of BDNF on the synaptic activity is at least in part due to the temporal summation of reflex responses to a greater extent than it does withdrawal reflex threshold. This is consistent with current psychophysical and electrophysiological data, which show that women summate more easily than men and thus tend to up-regulate their central processing relays more readily [8, 40, 44-45, 47]. In this scenario, higher BDNF levels would amplify this response and therefore be associated with more pain.

Thirdly, another factor to consider when studying gender differences in withdrawal reflex activity (and pain sensitivity in general) is the cyclical fluctuation of gonadal steroids during the menstrual cycle. Indeed, Tassorelli et al.[52]recently found that pain sensitivity and nociceptive flexion responses increase during the luteal as opposed to the follicular phase of the menstrual cycle. It is possible, therefore, that our female subjects' reflex responses may be different (and comparable to those of men) because they were not all tested during their

follicular phase. In this context, BDNF levels could be a surrogate for menstrual hormonal variation.

Fourthly, according to a primate model, BDNF is a selective marker of early adversity in the female gender and a higher level is indicative of abnormal responses manifested as a depression-like state. This increase in BDNF levels early on may contribute to the generation of individual differences in stress neurocircuitry, providing a substrate for altered vulnerability to depressive disorders at adulthood [31]. Maladaptive or repeated activation of stress responsive biological mediators, such as neurotrophins, may have long-term influences on stress sensitivity at adulthood and increase vulnerability for stress-related illnesses, including psychopathology and changes in pain threshold.

Taking into account that the luteal phase was not controlled in this study this is an important limitation of this study. However, it is unlikely that the direction of the correlation between BDNF and pain threshold would be different even if we had controlled menstrual phase. In addition, although a previous study showed correlation between pain threshold and menstrual cycle [11], this relationship has not been confirmed in a subsequent study in which pain threshold was unchanged during both the follicular and luteal phase of the menstrual cycle [21].

Nevertheless, future studies are needed to properly assess the relative impact of fluctuating status variables (ex. hormonal profile) on the context of gender-related differences observed here. Although the design we used is not ideal to infer a direct causal relationship, it permits us investigate this interaction between BDNF and gender in pain threshold in controlled manner in order to exclude the influence of several confounding factors observed in clinical situations, such as baseline pain, psychological factors, and effect of other analgesics. Our design allowed us to investigate this interaction in a semi-objective way, using thermal and pressure stimulus measures as opposed to using primarily subjective scales [1, 16]. In summary, in this study, we found that the individual pain thresholds were

influenced by gender however when controlled for BDNF. Several factors may explain these findings such as the effects of estrogens on opioid activity, effects of other hormones such as testosterone on pain processing. Finally the effects of gonadal hormones on neuroplasticity including immediate and previous effects that may take place during neural development may explain our results as discussed above.

Other limitations to this study should be considered. First, we found that age was not correlated with pain threshold. This incongruence with previous studies may be explained by the limited age range of our sample as we aimed to recruit a homogeneous sample to reduce other sources of variability. Second, one should consider that a limitation of our data is that the pressure of the thermode was not controlled in any special way. This factor has been discussed to be a potential confounder in similar pain measurement setups [50]. The strong relationships we observed suggest that slight pressure differences would not significantly affect position–temperature relationships.

Overall, these findings show that the level of serum BDNF is correlated with pain threshold when differentiated by gender. Higher levels of BDNF were correlated with higher pain thresholds in females and inversely in males. Further studies should assess additional variables that may help to explain variability in pain threshold across healthy and also chronic pain subjects.

Table 1. Characteristics of the sample (n=49).

	Male (n=22)	Female (n=27)	<i>p</i>
Age (years)	25.40 ± 5.37	27 ± 7.53	0.18
State-anxiety at baseline	20.98 ± 4.11	20.00 ± 4.13	0.55
Trait-anxiety	18.55 ± 3.96	18.57 ± 4.70	0.91
Depressive symptoms on Beck Inventory	3.35 ± 2.94	3.11 ± 2.99	0.91

Table 2. Multivariate linear regression of the interaction between BDNF and pain thresholds by gender (n=47).

(1A). Dependent variable: HEAT PAIN THRESHOLD				
Parameter	β	T	<i>p</i>	95% CI
Serum BDNF ng (log)	-16.40	5.38	0.004	(-27.27 to -5.54)
Gender	-10.67	2.89	0.001	(-16.52 to -4.83)
Age (ys)	0.02	0.22	0.828	(-0.12 to 0.15)
Interaction	11.63	3.24	0.001	(5.09 to 18.16)
Heat pain threshold vs. serum BDNF (log) by gender				
Parameter	B	T	<i>p</i>	95% CI
Serum BDNF ng (log) in male (n=22)	-4.78	2.24	0.04	(-9.48 to -0.09)
Serum BDNF ng (log) in female (n=27)	6.82	2.17	0.004	(2.33 to 11.30)
(1B). Dependent variable: PRESSURE PAIN THRESHOLD				
Parameter	β	T	<i>p</i>	95% CI
Serum BDNF ng (log)	-10.36	-3.42	0.001	(-16.47 to -4.24)
Gender	-6.07	-3.72	0.001	(-9.36 to -2.78)
Age (ys)	-0.02	-0.04	0.97	(-0.08 to 0.08)
Interaction	5.93	1.82	0.0001	(3.24 to 10.60)
Pressure pain threshold vs. serum BDNF (log) by gender				
Serum BDNF ng (log) in male	-3.43	-1.34	0.02	(-6.25 to -0.60)
Serum BDNF ng (log) in female	3.49	1.18	0.007	(1.07 to 5.91)

Acknowledgements

This research was supported by grants from the following Brazilian agencies: Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES - PNPd/CAPES (for W.C and I.C.C.S), National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Dr. I.L.S.Torres, Dr. W.Caumo); Postgraduate Program in Medical Sciences at the School of Medicine of the Federal University of Rio Grande do Sul, Postgraduate Research Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and Foundation of Support of Research at Rio Grande do Sul (FAPERGS). F.F. is supported by NIH grant (5R21DK081773 – 03).

References

- [1] A. Abrishami, J. Chan, F. Chung, J. Wong, Preoperative pain sensitivity and its correlation with postoperative pain and analgesic consumption: a qualitative systematic review, *Anesthesiology* 114 (2011) 445-457.
- [2] A.L. Allen, K.E. McCarron, Estrogen increases nociception-evoked brain-derived neurotrophic factor gene expression in the female rat, *Neuroendocrinology* 81 (2005) 193-199.
- [3] F. Blandini, L. Rinaldi, C. Tassorelli, G. Sances, M. Motta, A. Samuele, R. Fancellu, G. Nappi, A. Leon, Peripheral levels of BDNF and NGF in primary headaches, *Cephalalgia* 26 (2006) 136-142.
- [4] Y.A. Blednov, M. Stoffel, H. Alva, R.A. Harris, A pervasive mechanism for analgesia: activation of GIRK2 channels, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 277-282.
- [5] Y.Y. Chia, L.H. Chow, C.C. Hung, K. Liu, L.P. Ger, P.N. Wang, Gender and pain upon movement are associated with the requirements for postoperative patient-controlled iv analgesia: a prospective survey of 2,298 Chinese patients, *Can J Anaesth* 49 (2002) 249-255.
- [6] K.A. Duncan, A. Murphy, Sex-linked differences in mu opiate receptor expression in the rat brain., 11 th world Congress on Pain, International Association for the Study of Pain, Australia, 2005, p. 191.
- [7] R.B. Fillingim, C.D. King, M.C. Ribeiro-Dasilva, B. Rahim-Williams, J.L. Riley, 3rd, Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings, *J Pain* 10 (2009) 447-485.
- [8] R.B. Fillingim, W. Maixner, S. Kincaid, S. Silva, Sex differences in temporal summation but not sensory-discriminative processing of thermal pain, *Pain* 75 (1998) 121-127.
- [9] A.A. Fischer, Pressure algometry over normal muscles. Standard values, validity and reproducibility of pressure threshold, *Pain* 30 (1987) 115-126.
- [10] T. Fukuoka, E. Kondo, Y. Dai, N. Hashimoto, K. Noguchi, Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model, *J Neurosci* 21 (2001) 4891-4900.
- [11] M.A. Giamberardino, K.J. Berkley, S. Iezzi, P. de Bigontina, L. Vecchiet, Pain threshold variations in somatic wall tissues as a function of menstrual cycle, segmental site and tissue depth in non-dysmenorrhic women, dysmenorrhic women and men, *Pain* 71 (1997) 187-197.
- [12] C. Gorenstein, L. Andrade, Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects, *Braz J Med Biol Res* 29 (1996) 453-457.
- [13] E. Gould, A. Westlind-Danielsson, M. Frankfurt, B.S. McEwen, Sex differences and thyroid hormone sensitivity of hippocampal pyramidal cells, *J Neurosci* 10 (1990) 996-1003.
- [14] L. Haas, L.V. Portela, A.E. Bohmer, J.P. Oses, D.R. Lara, Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in patients with fibromyalgia, *Neurochem Res* 35 (2010) 830-834.
- [15] L.A. Henderson, S.C. Gandevia, V.G. Macefield, Gender differences in brain activity evoked by muscle and cutaneous pain: a retrospective study of single-trial fMRI data, *Neuroimage* 39 (2008) 1867-1876.
- [16] Y.W. Hsu, J. Somma, Y.C. Hung, P.S. Tsai, C.H. Yang, C.C. Chen, Predicting postoperative pain by preoperative pressure pain assessment, *Anesthesiology* 103 (2005) 613-618.

- [17] R.W. Hurley, M.C. Adams, Sex, gender, and pain: an overview of a complex field, *Anesth Analg* 107 (2008) 309-317.
- [18] R. Jensen, B.K. Rasmussen, B. Pedersen, I. Lous, J. Olesen, Cephalic muscle tenderness and pressure pain threshold in a general population, *Pain* 48 (1992) 197-203.
- [19] J.M. Juraska, Sex differences in "cognitive" regions of the rat brain, *Psychoneuroendocrinology* 16 (1991) 105-109.
- [20] M.B. Kaipper, E. Chachamovich, M.P. Hidalgo, I.L. Torres, W. Caumo, Evaluation of the structure of Brazilian State-Trait Anxiety Inventory using a Rasch psychometric approach, *J Psychosom Res* 68 (2010) 223-233.
- [21] R.R. Klatzkin, B. Mechlin, S.S. Girdler, Menstrual cycle phase does not influence gender differences in experimental pain sensitivity, *Eur J Pain* 14 (2010) 77-82.
- [22] S.D. Kuipers, C.R. Bramham, Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy, *Curr Opin Drug Discov Devel* 9 (2006) 580-586.
- [23] F. Li, J.W. Zhang, R. Wei, X.G. Luo, J.Y. Zhang, X.F. Zhou, C.Q. Li, R.P. Dai, Sex-differential modulation of visceral pain by brain derived neurotrophic factor (BDNF) in rats, *Neurosci Lett* 478 (2010) 184-187.
- [24] W. Maixner, C. Humphrey, Gender differences in pain and cardiovascular responses to forearm ischemia, *Clin J Pain* 9 (1993) 16-25.
- [25] R.C. Malenka, M.F. Bear, LTP and LTD: an embarrassment of riches, *Neuron* 44 (2004) 5-21.
- [26] K. Martinowich, H. Manji, B. Lu, New insights into BDNF function in depression and anxiety, *Nat Neurosci* 10 (2007) 1089-1093.
- [27] A. Merighi, R. Bardoni, C. Salio, L. Lossi, F. Ferrini, M. Prandini, M. Zonta, S. Gustincich, G. Carmignoto, 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* 68 (2008) 457-475.
- [28] G.R.W. Miaskowski C., Levine J.D., Sex-related differences in analgesic responses., Vol. 17, IASP press, Seattle, 2000, 209-230 pp.
- [29] I. Mitrovic, M. Margareta-Mitrovic, S. Bader, Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences., *Proc Natl Acad Sci* 100 (2003) 271-276.
- [30] L.M. Monteggia, B. Luikart, M. Barrot, D. Theobald, I. Malkovska, S. Nef, L.F. Parada, E.J. Nestler, Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors, *Biol Psychiatry* 61 (2007) 187-197.
- [31] A. Nair, K.C. Vadodaria, S.B. Banerjee, M. Benekareddy, B.G. Dias, R.S. Duman, V.A. Vaidya, Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus, *Neuropsychopharmacology* 32 (2007) 1504-1519.
- [32] B.D. Naliboff, S. Berman, L. Chang, S.W. Derbyshire, B. Suyenobu, B.A. Vogt, M. Mandelkern, E.A. Mayer, Sex-related differences in IBS patients: central processing of visceral stimuli, *Gastroenterology* 124 (2003) 1738-1747.
- [33] D. Oddiah, P. Anand, S.B. McMahon, M. Rattray, Rapid increase of NGF, BDNF and NT-3 mRNAs in inflamed bladder, *Neuroreport* 9 (1998) 1455-1458.
- [34] C.J. Paller, C.M. Campbell, R.R. Edwards, A.S. Dobs, Sex-based differences in pain perception and treatment, *Pain Med* 10 (2009) 289-299.

- [35] P.E. Paulson, S. Minoshima, T.J. Morrow, K.L. Casey, Gender differences in pain perception and patterns of cerebral activation during noxious heat stimulation in humans, *Pain* 76 (1998) 223-229.
- [36] J. Qiu, M.A. Bosch, S.C. Tobias, D.K. Grandy, T.S. Scanlan, O.K. Ronnekleiv, M.J. Kelly, Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C, *J Neurosci* 23 (2003) 9529-9540.
- [37] P. Rainville, Brain mechanisms of pain affect and pain modulation, *Curr Opin Neurobiol* 12 (2002) 195-204.
- [38] P. Rainville, G.H. Duncan, D.D. Price, B. Carrier, M.C. Bushnell, Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex, *Science* 277 (1997) 968-971.
- [39] A. Ratka, J.W. Simpkins, Effects of estradiol and progesterone on the sensitivity to pain and on morphine-induced antinociception in female rats, *Horm Behav* 25 (1991) 217-228.
- [40] M.E. Robinson, E.A. Wise, C. Gagnon, R.B. Fillingim, D.D. Price, Influences of gender role and anxiety on sex differences in temporal summation of pain, *J Pain* 5 (2004) 77-82.
- [41] R. Rolke, W. Magerl, K.A. Campbell, C. Schalber, S. Caspari, F. Birklein, R.D. Treede, Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials, *Eur J Pain* 10 (2006) 77-88.
- [42] R.L. Roof, The dentate gyrus is sexually dimorphic in prepubescent rats: testosterone plays a significant role, *Brain Res* 610 (1993) 148-151.
- [43] D.R. Rubinow, C.A. Roca, P.J. Schmidt, M.A. Danaceau, K. Putnam, G. Cizza, G. Chrousos, L. Nieman, Testosterone suppression of CRH-stimulated cortisol in men, *Neuropsychopharmacology* 30 (2005) 1906-1912.
- [44] E. Sarlani, E.G. Grace, M.A. Reynolds, J.D. Greenspan, Sex differences in temporal summation of pain and aftersensations following repetitive noxious mechanical stimulation, *Pain* 109 (2004) 115-123.
- [45] E. Sarlani, J.D. Greenspan, Why look in the brain for answers to temporomandibular disorder pain?, *Cells Tissues Organs* 180 (2005) 69-75.
- [46] P. Schestatsky, R. Algaba, D. Perez, J. Casanova-Molla, L. Leon, J. Costa, J. Valls-Sole, Transient decrease of sensory perception after thermoalgesic stimuli for quantitative sensory testing, *Muscle Nerve* 36 (2007) 466-470.
- [47] M. Serrao, P. Rossi, G. Sandrini, L. Parisi, G.A. Amabile, G. Nappi, F. Pierelli, Effects of diffuse noxious inhibitory controls on temporal summation of the RIII reflex in humans, *Pain* 112 (2004) 353-360.
- [48] R. Staud, M.E. Robinson, C.J. Vierck, Jr., D.D. Price, Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) attenuate temporal summation of second pain in normal males but not in normal females or fibromyalgia patients, *Pain* 101 (2003) 167-174.
- [49] M.R. Suter, Y.R. Wen, I. Decosterd, R.R. Ji, Do glial cells control pain?, *Neuron Glia Biol* 3 (2007) 255-268.
- [50] L.L. Symonds, N.S. Gordon, J.C. Bixby, M.M. Mande, Right-lateralized pain processing in the human cortex: an fMRI study, *J Neurophysiol* 95 (2006) 3823-3830.
- [51] M.T. Tanure, R.S. Gomez, R.C. Hurtado, A.L. Teixeira, R.B. Domingues, Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor during migraine attacks: a pilot study, *J Headache Pain* 11 (2010) 427-430.
- [52] C. Tassorelli, G. Sandrini, A.P. Cecchini, R.E. Nappi, G. Sances, E. Martignoni, Changes in nociceptive flexion reflex threshold across the menstrual cycle in healthy women, *Psychosom Med* 64 (2002) 621-626.

- [53] E.A. Young, Sex differences and the HPA axis: implications for psychiatric disease, *J Gend Specif Med* 1 (1998) 21-27.
- [54] J.P. Zacny, Morphine responses in humans: a retrospective analysis of sex differences, *Drug Alcohol Depend* 63 (2001) 23-28.
- [55] X.F. Zhou, Y.S. Deng, C.J. Xian, J.H. Zhong, Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats, *Eur J Neurosci* 12 (2000) 100-105.
- [56] Z.W. Zhu, H. Friess, L. Wang, A. Zimmermann, M.W. Buchler, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is upregulated and associated with pain in chronic pancreatitis, *Dig Dis Sci* 46 (2001) 1633-1639.
- [57] J.K. Zubieta, Y.R. Smith, J.A. Bueller, Y. Xu, M.R. Kilbourn, D.M. Jewett, C.R. Meyer, R.A. Koeppe, C.S. Stohler, mu-opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women, *J Neurosci* 22 (2002) 5100-5107.

7.3 A phase II, randomized, double-blind, placebo controlled, dose-response trial of melatonin on the pain threshold in healthy subjects

A phase II, randomized, double-blind, placebo controlled, dose-response trial of melatonin on the pain threshold in healthy subjects

Luciana Cadore Stefani, M.D.¹; Suzana Muller; Iraci L.S. Torres, Phm, PhD^{1, 3}; Izabel Cristina Custódio de Souza, Biol., PhD¹; Joanna R. Rozisky¹; Felipe Fregni; Regina Markus; WolneiCaumo, MD, PhD^{1,3}

Post-graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) 1; Anesthetist, Pain and Palliative Care Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Laboratory of Pain & Neuromodulation at UFRGS 2 and Associate Professor, Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brazil 3 Associate Professor of Physical Medicine & Rehabilitation Associate Professor of Neurology Harvard Medical School. 4 Berenson-Allen Center for Noninvasive Brain Stimulation, Department of Neurology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA.

*Correspondence and reprints should be addressed to:
Wolnei Caumo MD, PhD
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Laboratory of Pain & Neuromodulation
Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003
Bairro Rio Branco - Porto Alegre - RS – Phone (51) 3359.8083
E-mail: caumo@cpovo.net*

Running title: Concentration response curve of the effect of melatonin on pain in humans.

Keywords: melatonin; pain threshold; dose-response curve; clinical trial.

Word count: **3207**

Numbers of tables: **02**

Number of figures: **03**

What is already known about this subject

Results in animal studies have suggested that oral melatonin has a dose-dependent antiallodynic effect.

In humans, fixed preoperative doses of melatonin have been shown to reduce postoperative pain.

It is unknown if melatonin shows an analgesic concentration-response curve, which is essential to define the dose according to the clinical effect.

Statement about what this paper adds

What this study adds

The present results suggest that melatonin may serve as an effective drug for controlling pain perception. Also, that the melatonin showed a dose-dependent effect on the pain threshold of healthy subjects.

Summary

Objective: To evaluate the analgesic dose response of the effects of melatonin on the pressure and heat pain threshold and tolerance, and the sedative effects.

Methods: Sixty-one healthy subjects aged 19 to 47 were randomised into one of four groups: placebo, 0.05 mg/kg sublingual melatonin, 0.15 mg/kg sublingual melatonin or 0.25 mg/kg sublingual melatonin. A pressure algometer was used to determine the pressure pain threshold (PPT) and the pressure pain tolerance (PPTo). Quantitative sensory testing (QST) was used to measure the heat pain threshold (HPT) and the heat pain tolerance (HPTo). The sedation was assessed by the visual analogue scale and bispectral analysis.

Results: The serum plasmatic melatonin levels were directly proportional to the melatonin doses given to each patient. One way ANOVA models and MANOVA for pain thresholds show a significant main effect of group. Post hoc analysis showed significant differences between the placebo vs. the intermediate (0.15 mg/kg) and the highest (0.25 mg/kg) melatonin doses for all the tests of pain threshold and also sedation level. The linear regression model showed a significant association between the serum melatonin concentrations and the change in the pain threshold ($R^2=0.56$ for HPT and $R^2= 0.518$ for PPT).

Conclusions: The present data indicate that sublingual melatonin exerts a well-defined dose-dependent antinociceptive activity, and there is a correlation between the plasma melatonin drug concentration and the acute changes in the pain threshold. These results provide additional support for the investigation of melatonin as an analgesic agent.

Introduction

Melatonin is the major hormone synthesized by the pineal gland and has been mainly involved in the control of the circadian rhythm [1]. However, melatonin has also been involved with regulation of other systems such as the pain system. In fact, the antinociceptive effect of melatonin has been demonstrated in animal models of acute pain [2-3], inflammatory pain [4-6] and neuropathic pain [6-7]; and in addition in human studies investigating the preoperative doses of melatonin [8-10]. The mechanisms of antinociceptive effects of melatonin are not fully understood. Previous studies have suggested that this hormone could have an effect on spinal cord and thus changing nociceptive transmission at this level[11]. Melatonin also has modulatory functions on opioid and gamma-aminobutyric acid (GABA) systems [12-14]. Furthermore melatonin may have a peripheral effect as shown by the inhibitory activity on the release of proinflammatory cytokines on peripheral sites. Therefore, melatonin may cause antinociception through a peripheral and central mechanisms. Based on the preliminary encouraging results of melatonin on pain modulation, an important question is whether there is a dose-relationship of melatonin effects on pain modulation in humans. To the best of our knowledge a dose-relationship study in humans assessing the antinociceptive effects of melatonin has not been performed before. In addition this study also assessed the concentration of melatonin as to conduct a concentration-response curve of melatonin on pain thresholds.

In order to measure pain in this study, we chose to measure pain threshold and tolerance. Although the pain threshold is fairly constant, the pain tolerance level, which is defined as the amount of pain a subject is prepared to put up with, varies enormously. Interestingly, patients do not usually seek medical advice until they are beyond their pain tolerance [15]. For a given noxious stimulus, the intensity with which pain is felt varies from person to person, and a distinction has to be made between an individual's pain threshold and pain tolerance [16]. This was defined in experimental pain models in healthy human

volunteers by measuring analgesic drug effects using a noninvasive, non-noxious, standardised, repeatedly applicable stimulus [17].

Therefore by measuring pain tolerance in this study, we would increase the sensitivity of our analysis. In fact the sensitivity of the test to the drug effect may be reduced by concomitant administration of placebo and interindividual and intraindividual variability of the endpoint (i.e., pain tolerance or pain intensity). Thus, an ideal pain test should be sensitive enough to provide a reasonable concentration-response curve in the clinical concentration range with a minimal placebo and time effect.

We therefore investigated the dose response of the analgesic effect of melatonin after taking into account the interindividual and intraindividual variability using models using the concentration levels of melatonin. We tested the pressure pain tolerance, the heat pain tolerance, and the sedative effect.

Materials and Methods

Subject and Study Design

After obtaining approval from the ethics committee, 61 white healthy men and women volunteers with a mean age of 26.8 y (the range was 19-47 y) were enrolled into the randomised, parallel, double-blind, placebo-controlled study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki on biomedical research involving human subjects, and written informed consent was obtained from the participants. The study was registered in the *Brazilian clinical trial database (U1111-1123-5109)*.

Volunteers were recruited from the general population by postings in universities, on the internet and in public places in the Porto Alegre area. Interested individuals were screened for eligibility by phone. Subjects were eligible to participate if they fulfilled the following criteria: between the ages of 19 and 49 y; no current acute or chronic pain conditions; no use of analgesics within 1 week; no rheumatologic disease; no clinically significant or unstable

medical or psychiatric disorder; no history of alcohol or substance abuse within the last 6 months; no neuropsychiatric comorbidity; and no use of central nervous system-effective medication.

Research design

The data were collected at the Clinical Research Center of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The volunteers were asked to abstain from alcohol and excessive coffee consumption (defined as 5 cups or 400 mg of caffeine 18) for 24 h before testing and from drinking and eating for 6 h before testing. Study sessions were performed in a quiet, nonstressful environment at the same air-conditioned location, and the sessions always started at the same time in the afternoon. The volunteers rested comfortably in a semi-recumbent position during the experiments and were monitored with noninvasive blood pressure, pulse oximetry and a BIS (bispectral index) Quatro Sensor (Aspect Medical Systems), which was applied on the forehead and connected to the BIS monitor. After a trial run to familiarise the volunteers with the procedures, two test series were performed: at baseline and 30 min after the intervention. The subjects were always assessed by the same researcher (L. Stefani), an anesthesiologist with extensive experience on clinical and experimental pain assessment, who systematically read the instructions and explained the standardised experimental procedure using a modified protocol from a previously published protocol [18] for a quantitative sensory testing (QST) and pressure threshold assessments. After the test series, a venous blood sample was taken for analysis of the plasma melatonin concentration. The blood samples were immediately stored at 4°C and centrifuged at 3,500 rpm for 10 min after the last test series. The plasma was frozen at -80°C for later analysis.

Interventions

The intervention was one of three doses of sublingual melatonin (Sigma Chemical, Germany, provided batch-by-batch certificates of analysis for authenticating the purity of each batch): 0.05 mg/kg, 0.15 mg/kg, 0.25 mg/kg (maximum dose 20 mg), or placebo. The nurse prepared the study drugs using a melatonin syrup (20 mg/ml) in needleless syringes marked only with coded labels to maintain the double-blinded nature of the study.

Randomisation

We used a fixed block size of 12 to ensure that equal numbers of participants were randomised into the four groups. We stratified the randomisation by gender to assign the patients to one of three melatonin doses or placebo. Before the recruitment phase, the sealed envelopes containing the allocated treatment were prepared and numbered sequentially. The envelopes were only allowed to be opened after the subject signed the consent form and was performed by the nurse who gave the medications. During the entire protocol timeline, two investigators who were not involved in the patient evaluations were responsible by blinding and randomisation procedures. Other individuals who were involved in patient care were unaware of the treatment group to which the patients belonged.

Experimental Pain Tests

The pain threshold is commonly defined as the minimal amount of pain that a subject can recognise, whereas the measured intensity is an external event. Pain threshold can also be increased by pure hypnotic drugs [19-20]. In contrast, pain tolerance is a more reliable measure to detect true analgesic effects (Arendt-Nielsen et al. 1996). Therefore, we selected both pain threshold and pain tolerance as endpoints for the measurement of drug effect.

1. Heat pain thresholds and tolerance. Quantitative sensory testing (QST) was used to assess heat pain thresholds by the method of limits on a computer Peltier-based device

thermode (30 x 30 mm) [21]. The thermode was attached to the skin on the ventral aspect of the mid forearm. The baseline temperature was set at 32°C and was increased at a rate of 1°C/s to a maximum of 52°C. This slow rise time was selected as a test of pain, which was primarily evoked by stimulation of C-nociceptive afferents as previously demonstrated [22]. Each participant was asked to press a button as quickly as possible at the moment the stimulation became painful. Three assessments were taken with an interstimulus interval of 40 s [23], and the thresholds were calculated by taking the average 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 sensitisation or response suppression of coetaneous heat nociceptors. The same equipment was used to determine the maximally tolerated temperature on the ventral aspect of the mid forearm. Starting at a baseline temperature of 32°C, the thermode was heated at a rate of 1.0°C/s. The volunteer pressed a button when he/she did not want the temperature to be increased any further (pain tolerance is the maximal temperature that a person is able to tolerate; the cutoff limit was 52°C), which caused the thermode to cool to the baseline temperature.

2. Pressure Pain Test. A Fisher's pressure algometer (Pain Diagnostics and Thermography, Great Neck, NY 11023) (Fisher, 1986) was used to determine the pain pressure detection and the pain pressure tolerance. The pressure was gradually increased at a rate of 1 kgf/s. A probe with a surface area of 1 cm² was applied perpendicular to the tibial surface. Prior to the test trial, the volunteer learned to differentiate the perception of pressure from the perception of the onset of pain. The subject was then instructed to verbally report the perception of the pain onset. Subjects were asked to say 'stop' immediately after a discernible sensation of pain (distinct from pressure or discomfort) was felt. At this point, the experimenter immediately retracted the algometer[24]. The average value of three successive readings taken at intervals of 3-5 min was used as the pain pressure threshold [24]. We also measured the pain pressure tolerance, which was defined as the maximally tolerated pressure applied on the tibial surface.

Subjects were asked to say 'stop' when they did not want the pressure to be increased any further (pain tolerance is the maximum level of pressure that a person is able to tolerate; the cutoff limit was 10 kgf).

3. **The clinical assessment of sedation** was determined by simultaneous recording of the visual analogue scale (VAS) 100 mm zero (awake) and 100 (complete sleepiness). The BIS was obtained with a BIS monitor (model A-2000; Aspect Medical Systems, Newton, MA). After electrode placement above the bridge of the nose, over the temple area, and between the corner of the eye and the hairline, the monitor undergoes automatic impedance testing to ensure acceptable signal reception. When an inadequate signal was sensed, the colour pattern of the display changed, which allowed easy differentiation between true and spurious values. The electrodes were repositioned or replaced if impedances increased enough to impair the EEG evaluation. A reading of zero indicated no brain activity, and a reading of 100 indicated a fully awake state. The BIS score correlates quantitatively with the alertness of sedated patients without being confounded by evaluator or patient bias [25]. Data from the BIS monitor were recorded for the study group during 30 min after melatonin administration.

Assessment of demographic characteristics, depressive symptoms and anxiety

- a) Demographic data were assessed using a standardised questionnaire. All of the tests used in the present study were validated for the Brazilian population and performed in the presence of a previously trained evaluator.
- b) Depressive symptoms were assessed by the Beck Depression Inventory (BDI). The final scores varied from 0 to 63 [26].
- c) Anxiety was measured with the refined version of the Rash analysis of the State-Trait Anxiety Inventory (STAI), which was adapted to Brazilian Portuguese [27]. State anxiety (a situation-driven transient anxiety) and trait anxiety (stable personality disposition reflecting general level of fearfulness) were evaluated.

Melatonin determination

The blood samples were centrifuged in plastic tubes for 10 min at $3500 \times g$ at 4°C , and the serum was stored at -80°C for the hormone assays. To assess bioavailability, serum melatonin was determined by ELISA using commercial kits from MP Biomedical Inc. (Irvine, California, USA) that follow the basic principles of competitive immunoassays [28]. The detection limit of the ELISA assay was 0.3 ng/mL (300 pg/ml).

Statistical analysis

The differences between groups were examined by analysis of variance (ANOVA) to analyse parametric dependent variables, and categorical outcomes were examined by chi-square or Fisher's exact tests given our main independent outcome (intervention) is also categorical. Linear regression and slope analysis were performed to obtain the serum melatonin concentration and pain threshold relationship.

The results were evaluated by the absolute mean variation on thresholds and sedation on scores of delta values (post-treatment minus pretreatment). Given the several outcomes of pain threshold levels, we also analysed data using MANOVA instead of individual ANOVAs only. Bonferroni's test for post hoc multiple comparisons was used to identify differences between the groups. For the BIS data (obtained each minute during a 60-min period), we conducted a group analysis with a mixed ANOVA model in which the independent variables were time, treatment (placebo vs. melatonin 0.05, 0.15 and 0.25 mg), the interaction term time vs. the treatment group and subject ID. We performed post hoc analysis using paired *t* tests to assess the effects of each treatment group. We considered all of the randomised patients as part of the analysis using the intention-to-treat analysis method with the last observation carried forward. The analyses were performed with GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, USA) and SPSS version 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

Results

Sixty-one subjects were randomised into one of four groups (Figure 1). The patients' characteristics are summarised in Table 1. The demographic characteristics are shown for each group of subjects assigned to receive one of three doses of melatonin or placebo. The ages of the subjects and the gender distribution did not differ between the 4 groups.

The serum concentration curve for melatonin was directly proportional to the dose given in each patient (Figure 2). Indeed, the curve demonstrates a linear relationship between the size of the melatonin dose and the serum concentration achieved.

Between-group changes in pain threshold and sedation

The results of the MANOVA to analyse the effects of melatonin on pain threshold and sedation scores as well as the ANOVA of mixed model to analyse the treatment effect on BIS are shown in Table 2. The post hoc analysis showed significant differences between the placebo and the intermediate and the highest melatonin doses in all of the tests. A one-way MANOVA revealed a significant multivariate main effect for treatment group (Wilks' $\lambda = 0.50$, $F(12) = 3.46$, $P < 0.001$, *partial eta squared* = 0.205). The power to detect an effect was 0.98.

Concentration-response curve for the pain threshold

Figure 2 shows the dose-response curve generated from three different doses, which can be used to determine potency and maximal efficacy (Figure 2). Comparisons of the concentration and the delta mean of the pain pressure threshold and the heat pain threshold responses (Figures 3A and B) show a linear relationship between serum plasmatic melatonin and the analgesic effects. The correlations between the serum melatonin concentrations and

the change in the outcome variables (pain threshold) are derived from the linear regression model.

Discussion

The present study showed concentration-response curves for the effects of melatonin on heat and pressure pain tests. Serum melatonin concentrations are within the normal dynamic range for dose melatonin concentrations (Figure 2) with rapid elevation, which indicates that the rate and extent of absorption of melatonin (bioavailability) is linear after sublingual administration. Interestingly, sublingual melatonin induced a dose-dependent analgesic effect on the pain threshold. A single dose of at least 0.15 mg/kg produced a significant increase in heat and pain pressure thresholds (Table 2). The subjects in the present study did not experience any side effects beside sedation, which suggests that the different doses that were used were adequate but not excessive. The patients who received 0.15 mg/kg or 0.25 mg/kg of sublingual melatonin had a statistically significant increase in sedation (based on the BIS data) compared with those who received placebo or the lowest melatonin dose (Table 2).

The data obtained in the present study are best described with a linear response curve. Our findings distinguish between inter individual and intra individual variability of the drug effect, which may be important for the interpretation of the results. The comparisons of mean delta also allow for determinations of the concentration-effect curves for each individual. The findings of the present study support the hypothesis of a melatonin concentration-response curve effect. The experiment was conducted in a controlled setting, which excludes the influence of several confounding factors observed in clinical pain, such as baseline pain, psychological factors and the presence of other analgesics.

The present findings are underscored by positive results of melatonin in animal models [29] of nociceptive pain, such as the tail-flick [30], hot-plate [14, 31], tail electric stimulation [5] and hind paw pinch [32] tests. Although a dose-dependent antinociceptive effect has been shown in some previous preclinical studies [13, 30], even with small melatonin doses, we cannot perform direct comparisons of concentration-response curves between animal and human models because several aspects related to varying doses (20 to 200 mg/kg), route of administration (intraperitoneal or intracerebroventricular) and kinetic parameters are species specific.

In the present study, the effect on nociceptive pain through the thermal and pressure threshold was based on activation of the rapid A δ fibre, which induced a sensation that corresponds to the “first pain felt”. The initial response was followed by a C fibre-mediated second pain, which is less localised and has a longer duration. These stimuli indiscriminately excite skin and deeper tissue receptors [33-34] in a similar manner as clinical nociceptive pain, which usually has diverse mechanisms. Although the mechanisms involved in the analgesic response to melatonin are unclear, there are some hypotheses to explain how endogenous or exogenous melatonin participates in pain control.

Interestingly, studies have suggested that melatonin is synthesised in a number of extrapineal sites, including the spinal cord, which indicates that this hormone could act as a paracrine signal in addition to its endocrine action [35]. Furthermore, melatonin receptors are abundant in the spinal cord [36]. Thus, melatonin could play a role in the modulation of the nociceptive transmission at this level [11]. Melatonin also has modulatory functions on opioid and gamma-aminobutyric acid (GABA) systems [12-14], but it is not possible to dissociate between the two competing systems (i.e., inhibition and facilitation) in human experimental and clinical studies. Indeed, only the net effect can be assessed. Thus, a reduction in inhibition may either be a primary change or a secondary response to an increase in facilitation [37]. Studies have also suggested that additional pathways play a role in the analgesic actions of

melatonin, such as a nuclear signalling pathway, a receptor-independent radical scavenging function, and inhibition of the release of proinflammatory cytokines on peripheral sites. In addition, the highly lipid-soluble nature of melatonin allows it to easily penetrate the blood-brain barrier. Therefore, melatonin may cause antinociception through a peripheral and central mechanism, and the effect may be related to dose, which was shown in the present study (Table 2). In the present study, the BIS value decreased with increasing melatonin dose. Although there were significant differences among the sedation levels of the individual groups, we do not believe that the differences are clinically significant. The magnitude of the differences is small because only a mild level of sedation was observed, and all of the subjects were easily aroused by verbal stimuli throughout the study.

The present data indicate that sublingual melatonin exerts a well-defined dose-dependent antinociceptive activity, and there is a correlation between the plasma melatonin drug concentration and the acute changes in the pain threshold. These results provide additional support for the investigation of melatonin as an analgesic agent.

Table 1. Demographic data and psychological profiles (n=61).

Variable	Placebo (n=15)	Melatonin 0.05 mg/kg (n=15)	Melatonin 0.15 mg/kg (n=15)	Melatonin 0.25 mg/kg (n=16)	<i>F</i>	<i>P</i>
Male/Female	7/8	7/8	7/8	8/8	—	
Age (years) †	25.13 (±5.50)	25.2 (±5.07)	25 (±6.44)	23.68 (2.72)	4.7	0.72
Body index (kg/m ²)	22.50 (±4.03)	24.16 (±6.47)	22.76 (±3.29)	22.75 (2.71)	0.92	0.43
Beck Depressive Inventory						
symptoms †	3.2 (±2.54)	4.8 (±5.7)	4.0 (±2.73)	3.37 (2.87)	0.57	0.63
Trait Anxiety †	21.13 (±3.77)	22.26 (±5.6)	19.85 (±3.15)	18.54 (4.59)	0.09	0.96
State Anxiety †	19.0 (±3.0)	18.93 (±5.4)	19.21(±2.63)	20.25 (4.2)	0.92	0.98

Table 2. The mean delta score (SD) (post-treatment values minus pre-treatment values) of the pressure and heat pain threshold, the pressure pain tolerance (PPTo) and the heat pain tolerance (HPTo) tests or sedation score (n=61).

Pain pressure threshold †						
Treatment	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Partial	F	P
	Pos-treatment vs. Pre	(Delta)	(Log)	Eta-Square		
Placebo (n=15)	6.64 (1.57) vs. 6.17 (1.50)	0.08 (1.03)	-0.58 (.13) ^a	0.29	7.70	0.0001
Melatonin 0.05 mg/kg (n=15)	6.79 (1.54) vs. 6.59 (1.54)	0.20 (0.35)	-0.80 (0.25) ^a			
Melatonin 0.15 mg/kg (n=15)	6.48 (1.89) vs. 5.54 (1.58)	0.94 (0.79)	-0.89 (0.10) ^b			
Melatonin 0.25 mg/kg (n=16)	7.37 (1.74) vs. 6.02 (1.64)	1.35 (1.26)	-1.10 (0.51) ^b			
Heat pain threshold †						
Placebo (n=15)	43.23 (2.51) vs. 42.90 (43)	0.33 (2.11)	1.11 (0.41) ^a	0.19	4.47	0.001
Melatonin 0.05 mg/kg (n=15)	43.10 (2.42) vs. 42.56 (2.37)	0.54 (0.96)	0.89 (0.37) ^a			
Melatonin 0.15 mg/kg (n=15)	44.71 (2.91) vs. 42.75 (3.15)	1.96 (1.08)	0.80 (0.34) ^b			
Melatonin 0.25 mg/kg (n=16)	45.05 (3.05) vs. 42.56 (3.56)	2.49 (2.88)	0.88 (0.35) ^b			
Score on heat pain tolerance (HPTo) †						
Placebo (n=15)	43.23(2.159) vs. 42.50 (2.49)	0.32 (0.8)	2.00 (0.11) ^a	0.31	5.18	0.005
Melatonin 0.05 mg/kg (n=15)	43.10(2.42) vs. 42.78 (2.32)	0.67 (0.84)	1.96 (0.13) ^a			
Melatonin 0.15 mg/kg (n=15)	44.71 (2.91) vs. 42.68 (3.15)	2.03 (0.49)	1.87 (0.08) ^{a,b}			
Melatonin 0.25 mg/kg (n=16)	45.05 (3.05) vs. 41.74 3.56)	3.31 (0.73)	2.02 (0.12) ^b			
Mean delta pressure pain tolerance †						
Placebo (n=15)	6.89(1.57)) vs. 6.08 (1.50)	0.81 (0.57) ^a	—	0.29	4.72	0.007
Melatonin 0.05 mg/kg (n=15)	7.38 (1.54) vs. 6.59 (1.54)	0.79 (0.74) ^{a,b}	—			
Melatonin 0.15 mg/kg (n=15)	8.29 (1.89) vs. 6.89 (1.58)	1.40 (0.82) ^{a,b}	—			
Melatonin 0.25 mg/kg (n=16)	8.43 (1.74) vs. 6.98 (1.64)	1.45 (0.78) ^b	—			
Mean delta sedation score on the VAS†						
Placebo (n=15)	2.19 (1.41) vs. 1.21 (0.97)	0.98 (1.76)	0.86 (0.56) ^a	0.16	3.58	0.01
Melatonin 0.05 mg/kg (n=15)	3.48 (1.87) vs. 1.65 (1.82)	1.83 (1.14)	1.81 (0.66) ^a			
Melatonin 0.15 mg/kg (n=15)	3.82 (1.94) vs. 1.45 (1.62)	2.37 (1.70)	1.89 (0.76) ^a			
Melatonin 0.25 mg/kg (n=16)	4.47 (1.51) vs. 1.78 (1.52)	2.69 (1.50)	2.24 (0.62) ^b			
Mean of the BIS during 60 min after medication §						
Placebo (n=15)	97.42 (1.84) vs. 97.63 (2.0)	-0.21 (1.70) ^a	—	7.28	0.0001	

Melatonin 0.05 mg/kg (n=15)	97.21 (1.93) vs. 97.92 (2.43)	-0.71 (2.07) ^b	___
Melatonin 0.15 mg/kg (n=15)	96.17 (1.82) vs. 97.42 (2.21)	-1.25 (1.82) ^c	___
Melatonin 0.25 mg/kg (n=16)	94.75 (6.94) vs. 97.14 (1.70)	-2.39 (1.70) ^c	___

Visual analogue scale (VAS)

Different superscripts (a, b, and c) indicate significant difference among treatment groups using the Bonferroni test.

† Analysis of variance (MANOVA) to compare the mean of the delta (post minus pre).

§ Mixed ANOVA model.

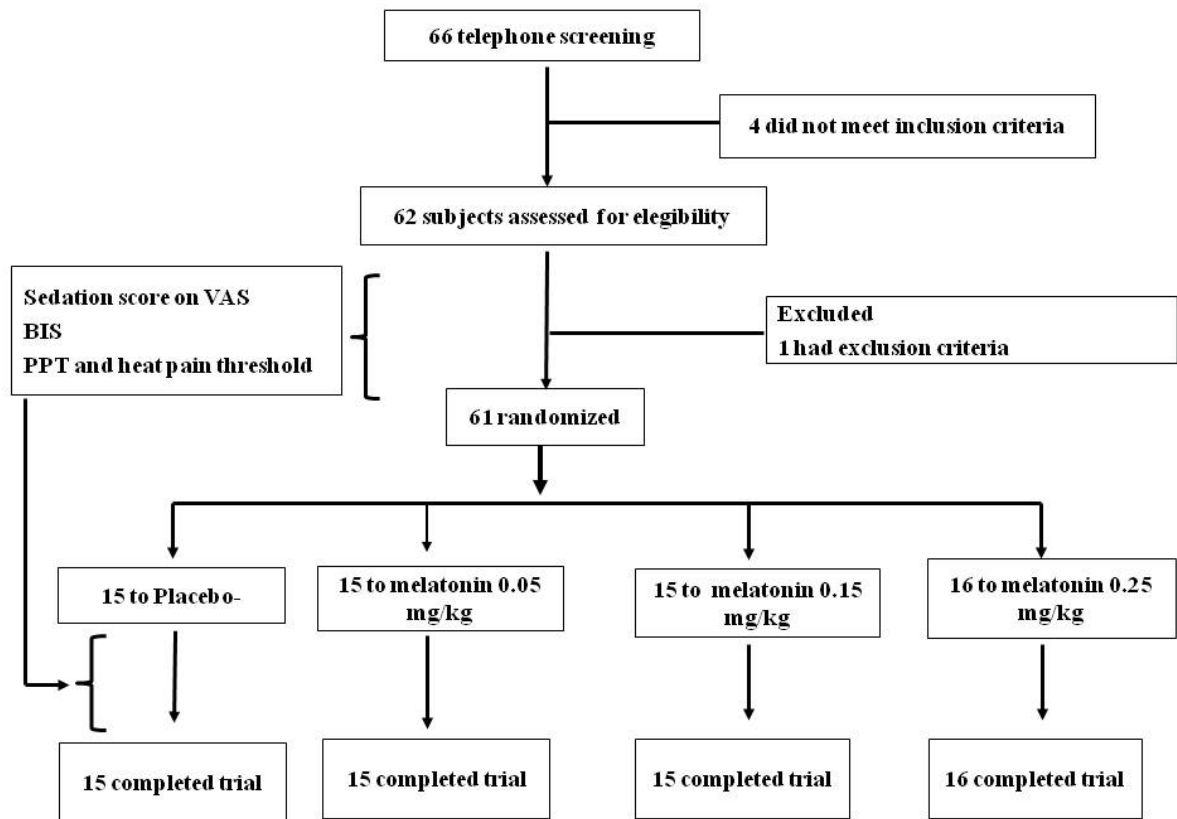
Figure 1. Flow and number of patients in each phase of the study

Figure 2. Comparison of the mean concentration achieved 30 min following sublingual doses of 0.05, 0.15 or .25 mg/kg (n=61).

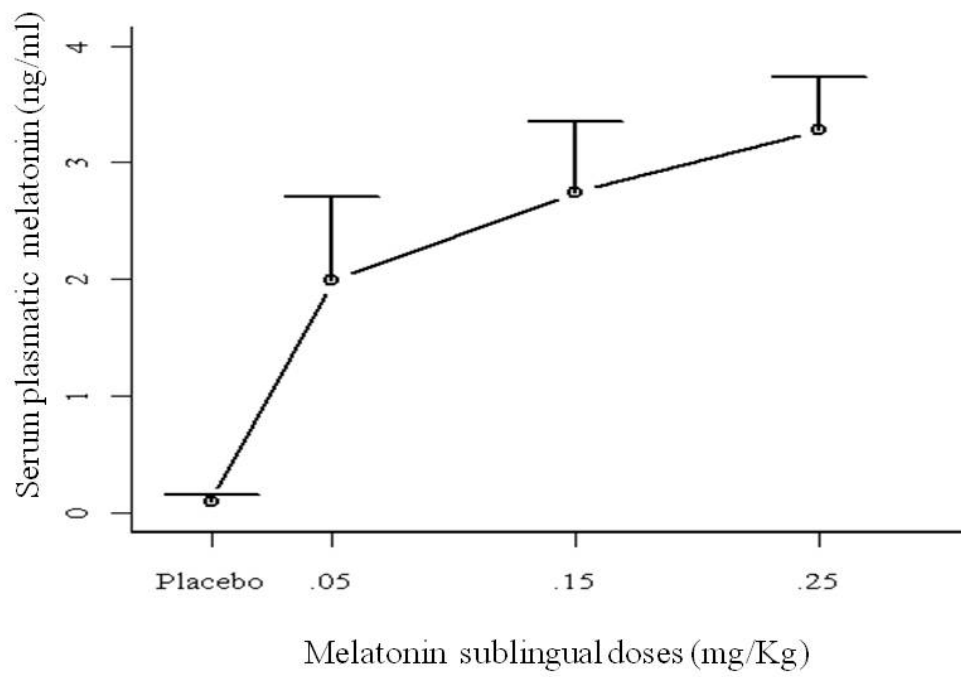
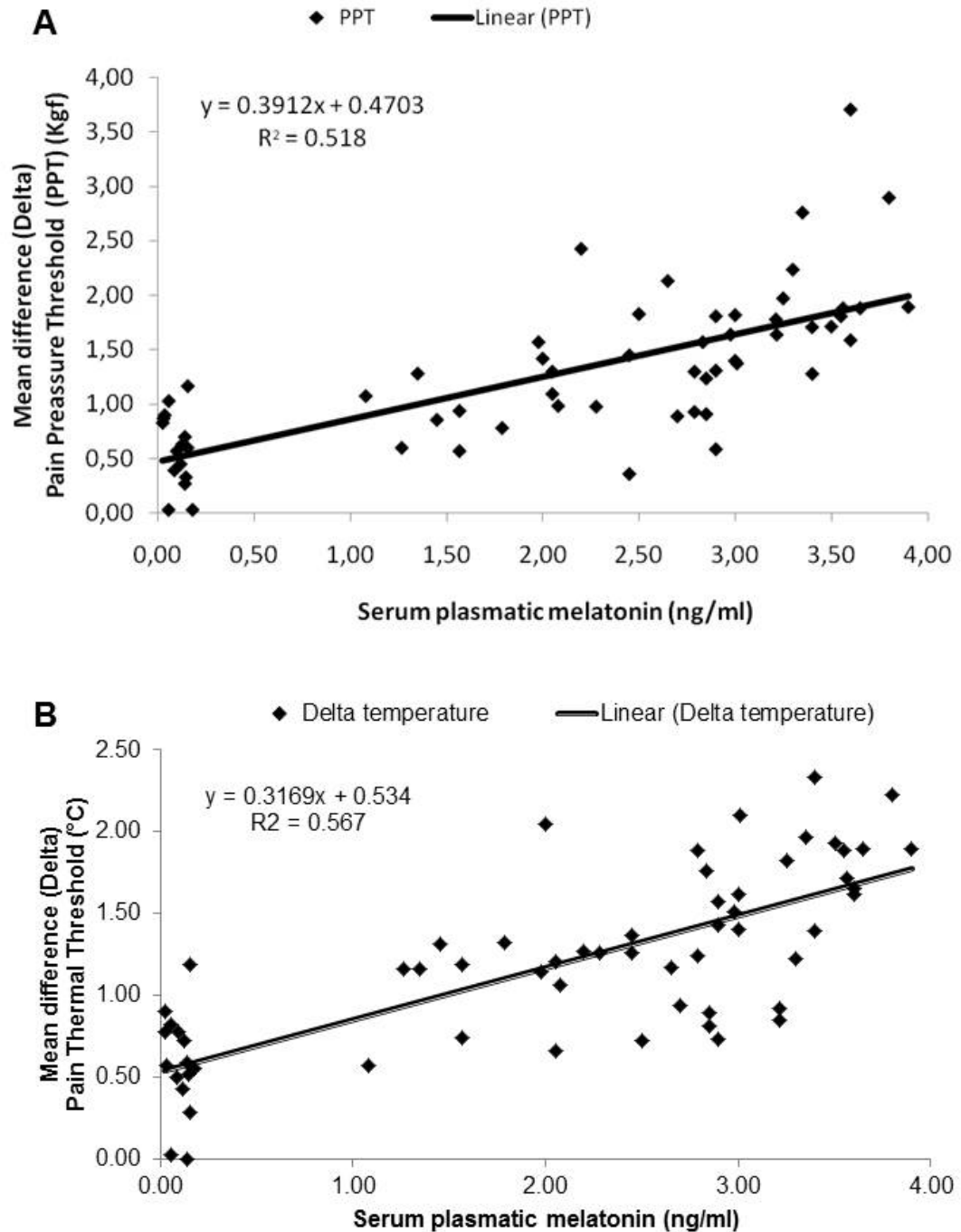


Figure 3 (A and B). The effect on pain pressure and the heat threshold expressed as the delta mean pain threshold (post-melatonin minus pre-melatonin) of all of the volunteers (n = 61).



Acknowledgements 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; Regina Markus, PhD).

Post doctorate grant: Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES - PNPd/CAPES (for Izabel Cristina Custódio de Souza).

Doctorate grant: Postgraduate Program in Medical Sciences at the School of Medicine of the Federal University of Rio Grande do Sul (Joanna R. Rozisky).

Assistance, medicines, equipment, or administrative support: Postgraduate Research Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

The institution (HCPA, UFRGS) receive support the following governmental

Brazilian agencies: 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:

I affirm that we did not have support from any organisation for the submitted work.

We don't have financial relationships with any organisations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years.

Also, we didn't have other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

Bibliography

1. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005; 9: 11-24.
2. Elmegeed GA, Baiuomy AR, Abdel-Salam OM. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of novel synthesized melatonin analogues. *Eur J Med Chem* 2007; 42: 1285-92.
3. Li SR, Wang T, Wang R, Dai X, Chen Q, Li RD. Melatonin enhances antinociceptive effects of delta-, but not mu-opioid agonist in mice. *Brain Res* 2005; 1043: 132-8.
4. Arreola-Espino R, Urquiza-Marin H, Ambriz-Tututi M, Araiza-Saldana CI, Caram-Salas NL, Rocha-Gonzalez HI, Mixcoatl-Zecuatl T, Granados-Soto V. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 577: 203-10.
5. El-Shenawy SM, Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Batran S, Arbid MS. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. *Pharmacol Res* 2002; 46: 235-43.
6. 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.
7. Ulugol A, Dokmeci D, Guray G, Sapolyo N, Ozyigit F, Tamer M. Antihyperalgesic, but not antiallodynic, effect of melatonin in nerve-injured neuropathic mice: Possible involvements of the L-arginine-NO pathway and opioid system. *Life Sci* 2006; 78: 1592-7.
8. Acil M, Basgul E, Celiker V, Karagoz AH, Demir B, Aypar U. Perioperative effects of melatonin and midazolam premedication on sedation, orientation, anxiety scores and psychomotor performance. *Eur J Anaesthesiol* 2004; 21: 553-7.
9. 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: 100-8.
10. Caumo W, Torres F, Moreira NL, Jr., Auzani JA, Monteiro CA, Londero G, Ribeiro DF, Hidalgo MP. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesth Analg* 2007; 105: 1263-71, table of contents.
 11. Dubocovich ML. Melatonin receptors in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol* 1991; 294: 255-65.
 12. Ambriz-Tututi M, Rocha-Gonzalez HI, Cruz SL, Granados-Soto V. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sci* 2009; 84: 489-98.
 13. Mantovani M, Kaster MP, Pertile R, Calixto JB, Rodrigues AL, Santos AR. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *J Pineal Res* 2006; 41: 382-9.
 14. Golombek DA, Escolar E, Burin LJ, De Brito Sanchez MG, Cardinali DP. Time-dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism. *Eur J Pharmacol* 1991; 194: 25-30.
 15. Bowsher D. The physiology of Acupuncture. *Acupunct Med* 1987; 4: 12-14.
 16. Baldry PE. *Acupuncture, Trigger Points and Musculoskeletal Pain*. 2 Edicion. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.
 17. Arendt-Nielsen L. Induction and assessment of experimental pain from human skin, muscle and viscera,. In: 8th World Congress on Pain, edJensen TS TJ, Wiesenfeld-Hallin Z., Seattle: IASP Press, 1997: 393-45.
 18. Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F, Treede RD. Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain* 2006; 10: 77-88.

19. Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L, Bak P, Fischer M, Zbinden AM. Psychophysical and electrophysiological responses to experimental pain may be influenced by sedation: comparison of the effects of a hypnotic (propofol) and an analgesic (alfentanil). *Br J Anaesth* 1996; 77: 165-71.
20. Petersen-Felix S, Arendt-Nielsen L, Bak P, Roth D, Fischer M, Bjerring P, Zbinden AM. Analgesic effect in humans of subanaesthetic isoflurane concentrations evaluated by experimentally induced pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 55-60.
21. 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. *Arq Neuropsiquiatr* 2011; 69: 943-8.
22. Yeomans DC, Pirec V, Proudfit HK. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: behavioral evidence. *Pain* 1996; 68: 133-40.
23. Schestatsky P, Valls-Sole J, Costa J, Leon L, Veciana M, Chaves ML. Skin autonomic reactivity to thermoalgesic stimuli. *Clin Auton Res* 2007; 17: 349-55.
24. Fischer AA. Pressure algometry over normal muscles. Standard values, validity and reproducibility of pressure threshold. *Pain* 1987; 30: 115-26.
25. Donaldson M, Goodchild JH. Use of bispectral index system (BIS) to Monitor Enteral Conscious (moderate) sedation during general dental procedures. *J Can Dent Assoc* 2009; 75: 709.
26. Gorenstein C, Andrade L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 453-7.

27. 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. *J Psychosom Res* 2010; 68: 223-33.
28. Rufiange M, Dumont M, Lachapelle P. Correlating retinal function with melatonin secretion in subjects with an early or late circadian phase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2491-9.
29. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Moscovitch A, Trakht I, Brown GM, Cardinali DP. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action. *Brain Res Bull* 2010; 81: 362-71.
30. Yu CX, Zhu B, Xu SF, Cao XD, Wu GC. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 403: 49-53.
31. Lakin ML, Miller CH, Stott ML, Winters WD. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci* 1981; 29: 2543-51.
32. Naguib M, Hammond DL, Schmid PG, 3rd, Baker MT, Cutkomp J, Qeral L, Smith T. Pharmacological effects of intravenous melatonin: comparative studies with thiopental and propofol. *Br J Anaesth* 2003; 90: 504-7.
33. Arendt-Nielsen L, Curatolo M, Drewes A. Human experimental pain models in drug development: translational pain research. *Curr Opin Investig Drugs* 2007; 8: 41-53.
34. Polianskis R, Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L. Pressure-pain function in desensitized and hypersensitized muscle and skin assessed by cuff algometry. *J Pain* 2002; 3: 28-37.
35. Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, Liebmann PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; 30: 243-7.
36. Pang SF, Wan Q, Brown GM. Melatonin receptors in the spinal cord. *Biol Signals* 1997; 6: 272-83.

37. Arendt-Nielsen L, Yarnitsky D. Experimental and clinical applications of quantitative sensory testing applied to skin, muscles and viscera. *J Pain* 2009; 10: 556-72.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1 Conclusão

A validação de um instrumento para mensuração psicofísica da dor possibilitou o estudo de diversas variáveis implicadas na modulação do processo nociceptivo. Conforme esperado, as mulheres apresentaram menores limiares de dor ao estímulo térmico e mecânico que os homens, sendo que altos níveis de BDNF foram correlacionados com

menor dor nas mulheres e essa relação foi inversa nos homens, suportando a idéia de que essa neurotrofina modifica o efeito que o gênero exerce sobre os limiares de dor.

Mostramos que a melatonina possui efeito analgésico dose-dependente no modelo de dor experimental desenvolvido e que existe correlação entre a concentração plasmática e as alterações nos limiares avaliados. Além disso, o adequado perfil farmacocinético, e ausência de efeitos colaterais significativos nas doses administradas reforça a inserção da melatonina como um fármaco modulador da dor.

8.2 Perspectivas

Mecanismos neurais distintos e sistemas anti e pró-nociceptivos são implicados na percepção da dor aguda e crônica. A obtenção de medidas objetivas ainda é um desafio, visto que fatores afetivos e cognitivos altamente subjetivos compõe esse fenômeno. O conhecimento mais profundo de alguns desses mecanismos propiciado pelo desenvolvimento desta tese, nos trouxe subsídios para abordar diferentes aspectos implicados nessa experiência.

No entanto, apesar do progresso sistemático, o arsenal terapêutico é pouco efetivo, especialmente para as síndromes crônicas. Com o avanço de métodos neurofisiológicos e de imagem, vimos surgir estratégias terapêuticas alternativas, que tem por foco a ativação de alvos corticais e subcorticais.

É nesse contexto que se insere a temática do meu projeto de pós-doutorado, no qual se estudarão os efeitos da estimulação transcraniana por corrente direta na resposta analgésica a curto prazo, no consumo de anestésicos, e na incidência de dor crônica após cirurgias ginecológicas. Este projeto faz parte das linhas de pesquisa multidisciplinares que vem sendo desenvolvidos pelo nosso grupo, voltadas ao estudo de mecanismos de neuroplasticidade, com ênfase no estudo da dor. Insere-se em estudo temático cujos alvos das investigações são mecanismos neurobiológicos, diagnósticos e terapêuticos usando técnicas de neuromodulação farmacológicas e não farmacológicas. A propósito, o projeto de pós-doutorado mencionado faz parte de um projeto temático de cooperação

internacional, que conta com a participação dos dois centros mundiais de excelência no estudo da neuromodulação, a citar o *Laboratory of Neuromodulation da Harvard Medical School* e o *Laboratory of Clinical Neurophysiology* da Universidade de Goettingen (Alemanha).

Os estudos desta tese assim como os em curso em nossos laboratórios focam nos aspectos fisiopatológico, diagnóstico e terapêutico visam gerar conhecimento para alicerçar novas políticas de assistência e treinamento no manejo da dor aguda e crônica, assim como integrar diferentes saberes para a investigação diagnóstica e terapêutica no campo da neuropsiquiatria e neuropsicofarmacologia. Esta abordagem, que integra a pesquisa à assistência envolvendo uma equipe de saúde multidisciplinar, permite estabelecer as interfaces da assistência ao paciente com dor e com a educação da equipe de saúde, tendo como prioridade o diagnóstico e tratamento aplicados. Colaborando assim, para a concretização da aplicação do conhecimento aos pacientes, criando uma estrutura funcional para que o conhecimento gerado seja transferido ao paciente e a sociedade. Podendo, sobretudo, auxiliar na elaboração de protocolos clínicos de diagnóstico e de tratamento. Este conjunto de ações visa qualificar o sistema de saúde com terapêuticas eficazes, baseadas no processo fisiopatológico e suportadas por desfechos clínicos relevantes aos pacientes e à sociedade. Desta forma, buscamos contribuir com o desenvolvimento dos grupos de pesquisa envolvidos, colaborando tanto qualitativa quanto quantitativamente com o desempenho científico e tecnológico, auxiliando o fortalecimento da pesquisa brasileira no cenário nacional e internacional.

9 ANEXOS

9.1 Consentimento informado

CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: Avaliação da resposta analgésica à melatonina a estímulos de intensidade variada em modelo de dor experimental.

Número do protocolo: _____

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Pesquisador responsável: Drs. WolneiCaumo e Luciana P. Cadore Stefani. Telefone: 99813977 ou 99434818

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA: 2101-8304

Nome da paciente: _____

1. OBJETIVOS DESTE ESTUDO

A finalidade deste estudo é avaliar como o hormônio que regula o ritmo de dormir e acordar, a melatonina, pode produzir alívio da dor ou do desconforto quando usado embaixo da língua. Também se pretende avaliar se esse efeito tem relação com dose que é administrada. É importante lembrar que essas respostas serão avaliadas frente aos estímulos de pressão na perna calor no braço aplicados por um aparelho.

2. EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

O senhor (a) terá que responder a algumas perguntas. Também, vai-se pegar uma veia para coletar sangue para dosar a melatonina e serão colocados aparelhos para medir a pressão, monitorizar as batidas do coração e as ondas elétricas do cérebro. Após serão feitos testes para avaliar o quanto o senhor(a) sente de dor ou desconforto ao aplicar uma pressão na usa perna ou calor no seu braço, cuja temperatura é controlada por computador para que não ocorra queimadura da pele. Depois disso, o senhor (a) terá que usar dois centímetros de um xarope debaixo da língua. Nesse xarope poderá ter diferentes doses de melatonina ou não existir nenhum remédio (placebo). Concomitante o você receberá uma baixa dose de morfina ou nenhum remédio na veia. A distribuição para qual dose e tratamento que o senhor(a) vai receber será feita por sorteio. Trinta minutos após usar o remédio serão feitos testes para avaliar a dor ou desconforto. Além disso, é importante lembrar que serão coletadas amostras de sangue para exame através da veia em que se colocou o soro, mas não deverá produzir nenhuma dor. Estima-se o tempo total do estudo em uma hora e trinta minutos, mais trinta minutos de observação antes de ser liberado para casa. A sua participação é voluntária. Se concordar, serão aplicados os questionários e daremos início ao estudo. Gostaríamos de lembrar que forneceremos vales-transporte para o seu deslocamento até o hospital e que será fornecido um lanche após a realização da pesquisa. Você não deverá voltar dirigindo para casa, pois as medicações podem causar sonolência residual.

3. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

Os possíveis desconfortos do presente estudo são: a picada para pegar a veia, e a sensação de dor leve ou desconforto ao se fazer a pressão na perna ou no local que vai ser aplicado calor. A medicação em estudo não possui efeitos colaterais conhecidos a não ser produzir sono nas dosagens que serão administradas. Quanto a morfina que pode ser administrada pode causar leve sonolência, náuseas e vômitos, que não são comuns nas baixas doses que serão administradas.

4. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO

Os resultados desse estudo poderão trazer informações importantes, sobre a dose da melatonina e seu efeito em aliviar a dor. Caso se confirme a hipótese de que o efeito da melatonina no alívio da dor segue um padrão dependente de dose em voluntários saudáveis, poderemos, então, considerar o um novo medicamento para ser usado no alívio da dor.

5. DIREITO DE DESISTÊNCIA

O senhor (a) pode desistir de participar a qualquer momento. Suas decisões de não participar ou de deixar a pesquisa depois de iniciada, não afetará qualquer atendimento médico posterior na presente instituição.

6. PRIVACIDADE

Todas as informações obtidas deste estudo poderão ser publicadas com finalidade científica, preservando os dados de identificação.

8. SENTIMENTO

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, tomo parte, voluntariamente, do presente estudo.

Assinatura do paciente

Assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador responsável

Porto Alegre, de de 200 .

9.2 Protocolo

CRONOFARMACOLOGIA E DOR – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0) PROTOCOLO PROJETO 07-483

Nome: _____ N° Banco _____
 _____ Codigo: _____ Data: _____

Fone residencial: _____ Celular: _____ e-mail _____

1. Idade: _____ Peso _____ 2. Altura (cm) _____
 3. Escolaridade: (1) 2º grau completo (2) cursando 3º grau (3) 3º grau completo
 4. Uso de alguma medicação? Qual? _____
 5. Doença diagnosticada? Qual? _____
 6. Fumo? (1) Sim (2) Não Quanto tempo? _____ Quantos cig/dia? _____

Horário	T0	Inter	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Intervenção													
BIS													
FC													
PAM													
PAS													
PAD													
Saturação													
Sedação (Ramsay)													
Sedação EAV													
ECG													

Thermotest	T 0			T 1		
Limiar calor						
Limiar de dor						
Tolerância						
Limiar ETP						
Algometria	T 0			T 1		
Limiar Algometria						
Tolerância Algometria						

OBSERVAÇÕES