



FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

TESE DE DOUTORADO

**TIPOLOGIA CIRCADIANA E POLIMORFISMOS DO GENE *CLOCK PER3* COMO
FATORES MODIFICADORES DO SISTEMA DESCENDENTE DA DOR E DO
EFEITO DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA DE CORRENTE CONTÍNUA**

FABIANA CARVALHO

PORTO ALEGRE

2017

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

**TIPOLOGIA CIRCADIANA E POLIMORFISMOS DO GENE *CLOCK PER3* COMO
FATORES MODIFICADORES DO SISTEMA DESCENDENTE DA DOR E DO
EFEITO DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA DE CORRENTE CONTÍNUA**

FABIANA CARVALHO

ORIENTADOR

Prof. Wolnei Caumo, M.D., PhD.

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

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Fabiana
Tipologia Circadiana e Polimorfismos do Gene
Clock PER3 como Fatores Modificadores do Sistema
Descendente da Dor e do Efeito da Estimulação
Transcraniana de Corrente Contínua / Fabiana
Carvalho. -- 2017.
214 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, 2017.

1. Tipologia Circadiana. 2. Polimorfismos do gene
PER3. 3. Sistema modulatório Descendente da Dor. 4.
Estimulação Transcraniana de Corrente Contínua. 5.
ETCC. 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).

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana Paula Cadore Stefani

(PPGCM-UFRGS)

Profa. Dra. Luciana da Conceição Antunes

(PPGCM-UFRGS)

Profa. Dra. Maria Paz Loayza Hidalgo

(PPG Psiquiatria e Ciências do Comportamento-UFRGS)

Profa. Dra. Joice Dickel Segabinazi

(PUC-RS)

*[...] E o futuro é uma astronave
Que tentamos pilotar
Não tem tempo, nem piedade
Nem tem hora de chegar
Sem pedir licença
Muda a nossa vida
E depois convida
A rir ou chorar...*

*Nessa estrada não nos cabe
Conhecer ou ver o que virá
O fim dela ninguém sabe
Bem ao certo onde vai dar
Vamos todos
Numa linda passarela
De uma aquarela
Que um dia enfim
Descolorirá (...)*

Cantor Toquinho, música Aquarela

*Dedico esta tese à minha família, pelo afeto e apoio incondicional e ao meu marido,
por todo o suporte de amor e por incentivar-me a seguir meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente o apoio incondicional do meu orientador Prof. Dr. Wolnei Caumo, por fazer-se presente, ser oportuno e assertivo em suas críticas, as quais sempre fizeram-me crescer, enquanto acadêmica e pessoa. Ressalto sua habilidade em transmitir-nos seu conhecimento em todos os momentos de contato que tivemos; por sugerir, ensinar e fazer-nos amar nosso tema de pesquisa, valor este que vai além da obtenção do título acadêmico, pelo zelo com o laboratório de pesquisa e pela atividade docente. Com ele aprendi que não temos limite para crescer e almejar sermos melhores pesquisadores e melhores pessoas. Meu *muito* obrigada!

Aos professores, Dr. Mário Pedrazzoli Neto e Dr. Luiz Menna-Barreto, por compartilharem seus conhecimentos comigo, tanto durante a coleta de dados em Porto Alegre, quanto nas disciplinas cursadas em São Paulo, os quais me abriram o horizonte sobre a incrível área da Cronobiologia.

Ao amigo, Prof. Dr. Rafael Vercelino, que foi o intermediário e grande motivador para eu iniciar esse programa de doutorado em outra cidade.

À equipe de Engenharia Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), representada pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Sanches e Engenheiro Danton Pereira Jr., pelas inúmeras vezes que nos ajudaram a compreender a linguagem dos equipamentos eletrônicos.

Ao Prof. Dr. Felipe Fregni, por ter-me recebido em seu laboratório em Boston - *Laboratory of Neuromodulation - Spaulding Rehabilitation Hospital - Harvard Medical School*, em outubro de 2014. Agradeço também toda a atenção recebida nessa ocasião pela Prof^a. Dr^a. Sandra Carvalho e Prof. Dr. Jorge Leite, que ajudaram-me a estruturar boa parte de minha pesquisa.

Aos queridos colegas do Grupo de Pesquisa em Dor & Neuromodulação, por sua amizade, pela ajuda em inúmeros momentos cruciais, no auxílio das coletas e por ouvirem minhas angústias e alegrias durante esses 4 anos em que muitas vezes senti saudades de casa...vocês foram meu esteio nesses momentos! Agradecimentos especiais à Assunta, Luciana, Franciele, Aline, Janete, Jéssica, Evelyn, Júlia, Ana Cláudia, Alicia, Gerardo, Tiago, José, Leonardo e aos alunos bolsistas de Iniciação Científica Rafael, Rael, Letícia e Raquel, pela dedicação durante a coleta de dados do estudo. Um grande agradecimento à minha amiga Assunta Gasparin, pela amizade sincera e por sempre poder contar com sua ajuda, parceria e companheirismo.

Ao colega Mário Eugênio, Francisco Mauro e Cássia Garzela pela grande ajuda nas fotos e filmagens do vídeo-artigo. Também agradeço às modelos Emillie Pinheiro e Ketlin Bazzo pela participação no vídeo e fotos.

Aos pós-doutorandos antigos e atuais do grupo, os quais tive contato, Dra. Andressa, Dr. Felipe, Dra. Gabriela, Dra. Joanna, Dra. Joice, Dra. Luciana, Dr. Maxciel e Dr. Rafael, pelas inúmeras ajudas na construção de conhecimento, coletas e pela amizade.

Aos funcionários da recepção e segurança do Centro de Pesquisa Clínica (CPC) - Andréa, Eloiza, Suzete e Rodrigo - e da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) - Jeferson e Patrícia - por nos ajudarem tanto, sempre com muita disponibilidade, boa vontade e atenção.

À equipe do serviço administrativo do Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas (PPGCM), sempre pronta a nos ajudar, em especial à Sra. Vera Ribeiro, por todo apoio dado nesses quatro anos.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG-HCPA) e ao Fundo de

Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dos projetos.

A todos os participantes desta pesquisa, especialmente por aqueles que participam dela desde 2013. Com todas as dificuldades em se fazer pesquisa neste país, vocês conseguiram fazer esse momento ter sentido e valer muito a pena, obrigada por também coadunarem com essa ideia.

Às minhas grandes amigas de Foz do Iguaçu, às quais tenho muito amor e consideração e que mantiveram-se firmes na amizade, mesmo com tamanha indisponibilidade e distância geográfica de minha parte. Em especial à Lilian e Juliana, que cuidaram tão bem da minha casa em minha ausência.

Aos meus familiares, com quem pude conviver mais proximamente nos últimos 4 anos e sempre entenderam e respeitaram minhas opções de vida. Meus pais Ana Maria e Joel, que sempre foram meu exemplo e base de sustentação e minhas irmãs, Alessandra e Camila, com as quais compartilho muitos momentos especiais. Amo muito todos vocês: obrigada!!

Ao meu querido marido Wil, por sempre estar presente e por incentivar-me a realizar meus sonhos. Por compartilhar comigo muitos momentos especiais e *segurar a barra* quando eu estava cansada ou desmotivada. Por ser esse ser humano maravilhoso e único, capaz de tornar uma situação de desespero em calma somente com sua presença e palavras de afeto.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao PPGCM, pela oportunidade de aprendizado. Aos professores da banca de defesa, que aceitaram o convite.

À agência de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

RESUMO

Introdução: Os ritmos circadianos são orientados de forma endógena e oscilam com periodicidade aproximada de 24 horas, podendo ser sincronizados com o ambiente temporal externo, por meio de estímulos foto ou atividade-dependentes. O principal marca-passo circadiano é localizado no núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ) e controla muitas variáveis fisiológicas e comportamentais por meio da função sincronizada de genes-relógio que regulam os ritmos em todo o sistema nervoso central e periférico. Variações polimórficas no gene-relógio *PERIOD 3* (*PER3*) podem levar a anormalidades no ciclo sono-vigília (CSV) e mudanças fenotípicas na tipologia circadiana, as quais podem alterar os padrões de sono e conseqüentemente a modulação dos mecanismos descendentes da dor. Além disso, a tipologia circadiana, que classifica os indivíduos em matutinos, vespertinos ou indiferentes, também pode afetar a excitabilidade das membranas e o equilíbrio entre os sistemas excitatórios e inibitórios. O efeito encadeado destes sistemas pode modificar respostas fisiológicas, tais como a excitabilidade cortical e a potência dos sistemas endógenos moduladores da dor. Então, neste estudo investigou-se como a tipologia circadiana, o *jet lag* social e o gene relógio *PER3* se relacionam com a excitabilidade cortical, com marcadores de neuroplasticidade como a modulação descendente da dor, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* - BDNF) e S100- β . Sobretudo, investigou-se a relação entre a tipologia circadiana com o efeito da Estimulação Transcraniana de Corrente Contínua (ETCC) aplicada em domicílio.

Estudo I:

No primeiro estudo avaliou-se a interação entre fatores geográficos associados à latitude, parâmetros circadianos e sono. Para responder a esta questão, foram avaliados o polimorfismo do gene *PER3*, parâmetros do sono e variáveis do ritmo circadiano de indivíduos residentes em três diferentes latitudes do Brasil. **Métodos:** Um estudo multicêntrico foi conduzido pela Universidade de São Paulo com a colaboração dos autores desse estudo e foram escolhidas três amostras de 1.241 estudantes universitários residentes em três latitudes no Brasil (9°, 22° e 30° sul), utilizando o Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ) e a Escala de sonolência de Epworth. **Resultados:** Os resultados do primeiro estudo em relação aos parâmetros do sono relacionados com os genótipos *PER3* em diferentes latitudes, mostrou que durante os fins de semana (dias livres), o genótipo *PER3*^{4/4} está associado a um sono mais longo na latitude de Porto Alegre (latitude 30°S); já os genótipos *PER3*^{4/5} e *PER3*^{5/5} estão associados com maior duração do sono durante a semana em Campinas (latitude 22°S). Em relação à tipologia circadiana, os voluntários são, em média, mais matutinos na latitude 9°S (Maceió), enquanto que o padrão oposto foi encontrado na latitude de 30°S, mostrando a prevalência de vespertinidade. Na latitude intermediária de 22°S, o cronotipo intermediário foi o mais encontrado. **Conclusão:** A variação no ciclo claro/escuro (CE) ambiental ao longo do ano (que se relaciona com diferentes latitudes) gera, por meio do processo de arrastamento, diferentes resultados na duração do sono e fenótipos circadianos, sendo que o gene *PER3* modula a forma como o sistema circadiano humano se sincroniza ao ambiente.

Estudo II:

O segundo estudo teve como objetivo avaliar a variação do sistema modulador descendente de dor pela alteração na escala numérica de dor (NPS 0-10) durante a tarefa de modulação de dor condicionada (CPM-task) entre os polimorfismos do gene relógio *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5}. Além disso, avaliou-se a relação desses genes com as medidas da dor [limiar de dor ao calor, tolerância à dor, *cold pressor task* (CPT)], S-100- β e BDNF. **Métodos:** Neste estudo

transversal, foram incluídos 20 voluntários saudáveis (de 18 a 30 anos). As avaliações foram o teste sensorial quantitativo (QST), o paradigma de CPM-task, a tarefa *cold pressor task* (CPT), o BDNF e S100β. Todas essas medidas foram feitas de manhã e à tarde. O fenótipo circadiano foi determinado usando o Questionário ChronoType de Munique (MCTQ). **Resultados:** O Modelo Linear Generalizado (GLM) revelou uma diferença significativa na média da tarefa Δ -CPM-task (tarde *menos* manhã) entre os polimorfismos do gene relógio PER3^{4/4} -0,54 (0,78) vs. 0,70 (0,90) ($\chi^2 = 7,255$; df = 1 'P = 0,007), respectivamente. A privação do sono [B = -0,49, intervalo de confiança (IC) 95% = - 0,86 a -0,12] e a proteína Δ -S100-B [-0,03, (IC) 95% = -0,06 a -0,01] foi correlacionada negativamente com a tarefa Δ -CPM. Houve diferença na média do Δ -CPT entre PER3^{4/4} vs. PER3^{5/5} [-0,11 (4,51) vs. PER3^{5/5} 4,00 (2,60) ($\chi^2 = 22,251$; df = 1 'P = 0,000). Na análise de interação do polimorfismo com privação de sono ocorreu uma inversão na direção da correlação com os genes relógio, em ambos os resultados Δ -CPM-task e Δ -CPT. **Conclusão:** Esses achados sugerem que os polimorfismos do gene-relógio PER3 podem modular o sistema modulador descendente de dor. No entanto, a privação do sono é provavelmente um fator determinante para propiciar uma menor eficiência desse sistema, apesar do efeito do gene do relógio PER3.

Estudo III

O terceiro estudo buscou avaliar o efeito de 10 sessões de estimulação transcraniana de corrente contínua (ETCC) de uso domiciliar, tanto no potencial evocado motor (MEP) quanto no Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), de acordo com a tipologia circadiana (matutinos ou vespertinos) determinada pelo Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ). **Métodos:** Foram incluídos 14 voluntários saudáveis [(n = 6) matutinos e (n = 8) vespertinos), com idade entre 18 e 30 anos, destros, elegíveis a partir de uma amostra inicial de 456 participantes. Os resultados foram o MEP avaliado pela estimulação magnética transcraniana (TMS) e BDNF sérico. As variações de MEP e BDNF foram avaliadas antes e após 10 sessões de ETCC anódica aplicada no córtex motor primário (M1) esquerdo e catódico na região supraorbital direita. O fluxo de corrente foi de 2mA, durante 20 minutos. **Resultados:** O Modelo Linear Generalizado (GLM) revelou que, no final do tratamento, ocorreu uma diferença significativa no Δ -MEP expresso como uma porcentagem. A mediana (md) e interquartil (IQ25-75) no Δ -MEP nos matutinos e vespertinos foram 69,86 (50,50, 78,29) vs. 23,01 (15,11, 50,80), respectivamente [($\chi^2 = 15,13$, DF (graus de liberdade) = 1, P = 0,000)]. Enquanto no final do tratamento a mediana e o IQ25-75 no Δ -BDNF nos matutinos vs. vespertinos eram -1,50 (-27,26, 7,78) vs. -39,27 (-55,68, -11,58), respectivamente [($\chi^2 = 4,91$, DF = 1, P = 0,027)]. Um maior atraso no *jet lag* social e a hora do uso da ETCC foram correlacionados positivamente com a variação Δ -BDNF, apesar do cronotipo. **Conclusão:** Nossos achados indicam que a propensão individual para a matutividade foi associada a uma maior mudança no Δ -MEP, enquanto observou-se uma maior mudança no Δ -BDNF nos vespertinos em comparação com os matutinos ao final do tratamento. Além disso, os resultados sugerem que os processos de neuroplasticidade no final do tratamento estão relacionados ao estado de excitabilidade cortical basal de acordo com a tipologia circadiana e o *jet lag* social, independentemente da hora de uso da ETCC.

Estudo IV

Considerando o potencial de impacto dos fatores relacionados à ritmicidade circadiana nos processos de neuroplasticidade e no efeito da estimulação cerebral não-invasiva (*Non-invasive brain stimulation* – NIBS), o quarto estudo teve como objetivo avaliar a adesão e impedância de contato como medidas de factibilidade do equipamento de ETCC domiciliar. **Métodos:** Realizou-se um estudo experimental com 20 participantes saudáveis e 8 pacientes com diagnóstico de fibromialgia (FM), os quais utilizaram o equipamento de ETCC domiciliar por

10 e 60 sessões respectivamente. Avaliou-se a adesão às sessões propostas, os valores de impedância de contato e a presença de efeitos adversos (EA). **Resultados:** Os participantes tiveram uma adesão à terapia de 93,25%, realizando 650 das 697 sessões previstas. Além disso, o equipamento mostrou uma impedância de contato de 2,93 [desvio padrão - DP (1,04)] para os participantes saudáveis e 2,82 [DP (1,15)] para os com FM. Houve relatos de EA de intensidade leve, sendo mais prevalentes o prurido, formigamento e sensação de queimação, os quais não persistiram após o término das sessões. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o equipamento de ETCC desenvolvido apresenta viabilidade para uso domiciliar com bom potencial de adesão avaliados por meio da monitoração da impedância da corrente de contato, com reduzida incidência de efeitos adversos menores. No global, estes resultados mostram que o uso da ETCC domiciliar é um equipamento para uso terapêutico com boa perspectiva para a realização de ensaios clínicos com maior número de pacientes, nos quais a alocação do horário da aplicação da ETCC possa ser definida de acordo com marcadores associados à ritmicidade circadiana, tais como o horário de preferência circadiana.

Palavras-chave: Ritmos Biológicos, Tipologia Circadiana, Genes-relógio, gene *PER3*, Polimorfismos do gene *PER3*, Sistema Modulatório Descendente da Dor, CPM-*task*, ETCC, BDNF, excitabilidade corticoespinal, MEP, Fibromialgia, Dor Crônica.

Registro dos estudos: Estudo 1 e 2: WebGPPG 13-0455; Estudo 3 e 4: WebGPPG 14-0281 e *clinical trials.gov*: NCT02408237.

ABSTRACT

Introduction: Circadian rhythms are orientated endogenously and oscillate with approximately 24-hour periodicity, and can be synchronized with the external temporal environment, by means of photo or activity-dependent stimuli. The major circadian pacemaker is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) and controls many physiological and behavioral variables through the synchronized clock-gene function that regulates rhythms throughout the central and peripheral nervous system. Polymorphic variations in the PERIOD3 clock gene (PER3) may lead to abnormalities in the sleep-wake cycle and phenotypic changes in the circadian typology, which may alter sleep patterns and consequently modulate the descending mechanisms of pain. In addition, the circadian typology, which classifies subjects in morningness, eveningness or indifferent, can also affect the excitability of the membranes and the balance between the excitatory and inhibitory systems. The chained effect of these systems may modify physiological responses, such as cortical excitability and the potency of endogenous pain modulating systems. So, in this study we investigated how the circadian typology, social jet lag and a PER3 clock gene are related to cortical excitability, with markers of neuroplasticity such as descending pain modulating and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). Above all, we investigated the relationship between the circadian typology with Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) effect applied at home.

Study I:

The first study evaluated the interaction between geographic factors associated with latitude, circadian parameters and sleep. To answer this question, we evaluated the PER3 gene polymorphism, sleep parameters and circadian rhythm variables of individuals living in three different latitudes in Brazil. **Methods:** A multicenter study was conducted by the University of São Paulo with the collaboration of the authors of this study and three samples of 1.241 university students residing in three latitudes in Brazil (9°, 22° and 30° South) were chosen using the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) and the Epworth Sleepiness Scale. **Results:** The results of the first study in relation to sleep parameters related to PER3 genotypes in different latitudes showed that during the weekends (free days) the genotype PER3^{4/4} is associated to a longer sleep in latitude 30°S (Porto Alegre); the PER3^{4/5} and PER3^{5/5} genotypes are associated with longer sleep duration during the week in latitude 22°S (Campinas). Regarding the circadian typology, the volunteers are, on average, more morning at 9°S latitude (Maceio), while the opposite pattern was found at latitude 30°S, showing the prevalence of evening. At the intermediate latitude of 22°S, the intermediate chronotype was the most found. **Conclusion:** The variation in the environmental light/dark (LD) cycle throughout the year (which is related to different latitudes) generates, through the entrainment process, different results on sleep duration and circadian phenotypes, and the PER3 gene modulates the way the human circadian system synchronizes with the environment.

Study II:

The second study aimed to evaluate the variation of descending pain modulatory system (DPMS) by the change in the Numerical Pain Scale (NPS 0-10) during the conditioned pain modulation (CPM-task) between PER34/4 and PER35/5 clock genes. Additionally, we assessed the relationship these clock genes with pain measures [heat pain threshold, pain tolerance, cold pressor task (CPT)] and serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and S100-β protein. **Methods:** In this cross-sectional study, were included 20 healthy volunteers (from 18 to 30 years-old). The assessments were the Quantitative Sensory testing

(QST), the CPM-paradigm, the cold pressor task (CPT) and the BDNF and S100 β protein. All these measures were done in the morning and the afternoon. The circadian phenotype was determined using the Munich ChronoType Questionnaire (MCTQ). **Results:** Generalized Linear Models (GLM) revealed a significant difference in the average of the Δ -CPM-task between clock genes *PER3*^{4/4} -0.54 (0.78) vs. 0.70 (0.90) ($\chi^2=7.256$; $df=1$, $P=0.007$), respectively. The sleep-deprivation [$B=-0.49$, confidence interval (CI) 95%=-0.86 to -0.12] and the Δ -S100-B protein [-0.03, (CI) 95%=-0.06 to -0.01] were negatively correlated with the Δ -CPM-task. There was a difference in the average of the Δ -CPT between *PER3*^{4/4} vs. *PER3*^{5/5} [-0.11(4.51) vs. *PER3*^{5/5} 4.00 (2.60) ($\chi^2=22.251$; $df=1$, $P=0.000$). In the interaction analysis of the polymorphism with sleep deprivation occurred an inversion in the direction of the correlation with clock genes, in either outcomes Δ -CPM-task and Δ -CPT. **Conclusion:** These findings suggest that the polymorphisms of clock genes' PER3 can modulate the DPMS. However, the sleep deprivation is likely a determinant factor to prone a less efficiency of DPMS, despite the PER3 clock gene effect.

Study III

The third study evaluated the effect of 10 sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) at home-based in either motor evoked potential (MEP) and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF), according to circadian typology (morningness or eveningness) determined by the Munich ChronoType Questionnaire (MCTQ). **Methods:** We recruited 14 healthy volunteers [(n=6) morningness and (n=8) eveningness chronotypes], age 18 to 30 years old, right-handed, eligible from an initial sample of 456 participants. The outcomes were the MEP assessed by the transcranial magnetic stimulation (TMS) and serum BDNF. The MEP and BDNF variations were evaluated before, and after 10 sessions of tDCS anodic stimulation applied at left primary motor cortex (M1) and cathodal on the right supraorbital. The current flow was 2mA, during 20 minutes. **Results:** Generalized Linear Models (GLM) revealed that at the treatment end occurred a significant difference in the Δ -MEP expressed as a percentage. The median (md) and interquartile (IQ25-75) in the Δ -MEP in morningness and eveningness were 69.86 (50.50, 78.29) vs. 23.01 (15.11, 50.80), respectively [($\chi^2= 15.13$, DF (degrees of freedom)= 1, $P= 0.000$)]. While at the treatment end the md and the IQ25-75 in the Δ -BDNF in morningness vs. eveningness were -1,50 (-27,26, 7,78) vs. -39,27 (-55,68, -11,58), respectively [($\chi^2= 4.91$, DF= 1, $P= 0.027$)]. A largest social jet lag and the hour of the use of tDCS were correlated positively with the Δ -BDNF variation, despite the chronotype. **Conclusion:** Our findings indicate that the individual propensity for a morningness was associated with a greater change in the Δ -MEP, while we observed a greater change in the Δ -BDNF in eveningness compared to morningness at the treatment end. Besides, results suggest that the neuroplasticity processes at treatment end are related to basal cortical excitability state according to circadian typology and social jet lag, regardless of the hour of use of tDCS.

Study IV

The fourth study aimed to develop and evaluate the feasibility of using tDCS home-based, validated through the effect on healthy subjects and fibromyalgic patients. **Methods:** An experimental study was carried out with 20 healthy participants and 8 fibromyalgia (FM) patients, who used tDCS home-based for 10 and 60 sessions respectively. Were evaluated adherence to the proposed sessions, contact impedance values and the presence of adverse effects (AE). **Results:** Participants had a therapy adherence of 93.25%, performing 650 of the 697 sessions planned. In addition, the device showed a contact impedance of 2.93 [standard deviation - SD (1.04)] for healthy participants and 2.82 [SD (1.15)] for FM patients. There were reports of AE of mild intensity, with pruritus, tingling and burning sensation being more prevalent, which did not persist after the end of the sessions. **Conclusion:** The results suggest

that the tDCS home-based development presents feasibility for home use with good adhesion potential, evaluated through the monitoring of contact current impedance, with a reduced incidence of minor adverse effects. Overall, these results show that the use of tDCS at is a therapeutic possibility with a good future perspective for conducting clinical trials with a larger number of patients, in which the time allocation of the tDCS application is defined according to markers associated with circadian rhythmicity, such as the circadian preference time.

Key words: Biological rhythms, Circadian typology, Clock gene, *PER3* gene, *PER3* gene polymorphisms, Descending pain modulatory system, CPM-task, tDCS, tDCS home-based, BDNF, Corticospinal excitability, MEP, Fibromyalgia, Chronic Pain.

Registration of studies: Study 1 and 2: WebGPPG 13-0455; Study 3 and 4: WebGPPG 14-0281 and *clinical trials.gov*: NCT02408237.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC: Córtex cingulado anterior
- AMPA: Receptores α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
- AR: Artrite reumatóide
- BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro – do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*
- CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CE: Claro-escuro
- Ck1 ϵ : *Caseina quinase epsilon 1*
- CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CPC: Centro de Pesquisa Clínica
- CPM-task: Tarefa da modulação condicionada da dor
- CPM: Modulação condicionada da dor – do inglês *Conditioned Pain Modulation*
- CPT: *Cold Pressor Task*
- CPTo: Resposta de Tolerância à Dor – do inglês *Cold Pain Tolerance*
- CRY: *CRYptocromos*
- CSV: Ciclo sono/vigília
- DC: Dor crônica
- DHSC: Corno dorsal da medula espinal – do inglês *dorsal horn spinal cord*
- DNIC: *Diffuse Noxious Inhibitory Controls*
- DRG: *Dorsal Root Ganglion*
- EA: Efeitos Adversos
- EMG: Eletromiografia
- ETCC: Estimulação Transcraniana de Corrente Contínua
- FDI: Primeiro músculo interósseo dorsal – do inglês *first dorsal interosseous*
- FIPE: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
- FM: Fibromialgia
- GABA: ácido gama-aminobutírico – do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*
- GMDRB: Grupo multidisciplinar de desenvolvimento e Ritmos Biológicos
- GPPG: Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
- GRD: Gânglio da raiz dorsal

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

LC: *Locus coeruleus*

LTD: Depressão de longa duração – do inglês *long-term depression*

LTP: Plasticidade sináptica de longa duração – do inglês *long-term potentiation*

M1: Córtex motor primário

MCTQ: Questionário de Cronotipo de Munique – do inglês *Munich ChronoType Questionnaire*

MEP: Potencial evocado motor – do inglês *motor evoked potentials*

MEQ: Questionário de Matutividade-Vespertinidade – do inglês *Morningness-Eveningness Questionnaire*

MSF: Ponto médio do sono em dias livres

MSFsc: Meia fase de sono corrigida

MT: Limiar motor – do inglês *motor threshold*

NE: Norepinefrina

NIBS: Estimulação Cerebral Não Invasiva – do inglês *non-invasive brain stimulation*

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico

NPS 0-10: Escala Numérica Verbal de Dor – do inglês *Numerical pain scale NPS (0-10)*

NS: Nociceptores específicos

NSQ: Núcleo Supraquiasmático

OA: Osteoartrite

PA: Potencial de ação

PAG: Substância cinzenta periaquedutal

PCS: Escala de Pensamento Catastrófico sobre a Dor – do inglês *pain catastrophizing scale*

PER3: do inglês *PERIOD3*

PPGCM: Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

PRGC: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

QST: Teste quantitativo sensorial – do inglês *Quantitative sensory testing*

RVM: Medula rostral ventromedial

S100 β : Proteína de ligação ao cálcio B

SC: Sensibilização central

SCN: *Suprachiasmatic Nucleus*

SFAS: Síndrome de Fase atrasada de sono

SI: Córtex somatossensorial primário

SII: Córtex somatossensorial secundário

SNC: Sistema nervoso central

SP: Substância P

STT: Trato espinotalâmico

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

tDCS: *Transcranial Direct Current Stimulation*

TIM: *Timeless*

TMS: Estimulação magnética transcraniana – do inglês *transcranial magnetic stimulation*

trkB: Receptor proteína-tirosina quinase B – do inglês *Tropomyosine Receptor Kinase*

UAMP: Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

USP: Universidade de São Paulo

VNTR: *Variable Number of Tandem Repeat*

WDR: *Wide Dynamic Rang*

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: Estratégia da busca sistematizada.....	31
Figura 2: <i>Zeitgebers</i> e relógio circadiano interno	40
Figura 3: NSQ quando em presença do ciclo CE ambiental	41
Figura 4: Papel dos genes-relógio no controle do ritmo circadiano	43
Figura 5: Caracterização dos axônios aferentes primários	51
Figura 6: Mecanismos de sinalização da dor.....	53
Figura 7: Avaliação da função do sistema descendente de dor com uso do QST.....	58
Figura 8: Posicionamento da bobina e eletrodos da TMS	65
Figura 9: Potencial Evocado Motor (MEP).....	66
Figura 10: Etapas para a utilização de ETCC domiciliar.....	69
Figura 11: Marco conceitual.....	70

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

Figure 1. Curve distribution of MFSc according to latitude.....	104
Figure 2. Sleep duration on weekdays (A), sleep duration on weekends (free days) (B), social jet lag (C), diurnal sleepiness – Epworth scale (D)	105
Figure 3. Latitude, <i>PER3</i> genotype and sleep duration on weekdays and weekends	106

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

Figure 1. Flow of study	134
Figure 2. CPM-task and QST.....	134
Figure 3. Differences between afternoon and morning heat pain ratings during CPM-task	

(deltas) according to *PER3* polymorphism group (n=18)..... 137

Figure 4. Differences between afternoon and morning heat pain tolerance during Cold Pressor Test (deltas) according to *PER3* polymorphism group (n=18)..... 138

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 3

Figure 1. Experimental design — assessments and interventions on each participant.....164

Figure 2. Home-based tDCS device and neoprene cap (a). Assembly of electrodes (b).....164

Figure 3. Comparisons of the MEP (A) and BDNF (B) change expressed in percentage from before to after ten days of tDCS between circadian typology (eveningness and morningness).
.....167

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 4

Figure 1. Flow of study 186

Figure 2. Screen sequence 186

Figure 3. Alarm warning screen 187

Figure 4. Shut down screen if necessary stop the session during stimulation 187

Figure 5. Saving the session when stimulation ceases..... 188

Figure 6. Typical curves of current intensity *versus* contact impedance during a tDCS session
..... 188

Figure 7. Schematic drawing of the electrode construction 189

Figure 8. Stimulation area..... 189

Figure 9. Results of adverse effects 190

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Estratégias de busca de referências bibliográficas.....	30
--	----

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 1

Table 1. Mean age (years), gender (percentage of males) and body mass index (kg) according to the samples of three latitudes in this study.....	104
--	-----

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 2

Table 1. Sociodemographic and health characteristics of the sample according to <i>PER3</i> polymorphism.....	135
Table 2. Comparisons of pain measures according to polymorphism group and temporal variation (n=18).....	136
Table 3. Primary outcome – generalized linear model analyses of different on the delta value of change in the NPS (0-10) during CPM-task (from afternoon minus morning).....	137
Table 4. Secondary outcome – generalized linear model analyses of different on the delta value of cold pressor test (CPT) (from afternoon minus morning).....	138
Table 5. Spearman correlations (ρ) between pain psychophysics measures, chronotype measures and serum markers of neuroplasticity (n=18).....	139

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 3

Table 1. Demographic, psychological state and circadian typology of the study sample.....	165
Table 2. Circadian typology and outcomes parameters according to sex.....	165
Table 3. Effect of tDCS on MEP, BDNF, QST and the on NPS (0-10) during CPM-task expressed in percentage considering the change from baseline to treatment-end.....	166

Table 4. Primary outcomes – Generalized analyses of different on cortical excitability and serum BDNF	168
Table 5. MANCOVA to compare Δ -MEP and Δ -BDNF according to MCTQ circadian typology (eveningness or morningness) adjusted by the hour administration tDCS of use and social jetlag (n=14).....	169

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1 Estratégias para a busca e seleção sistematizada das informações	29
2.2 Ritmicidade biológica	31
2.2.1 Tipologia Circadiana	35
2.2.2 Genes-relógio	39
2.2.2.1 Gene <i>PERIOD3</i> (<i>PER3</i>)	45
2.2.3 Relação entre ritmo circadiano e dor	47
2.3 Neurobiologia da dor – Aspectos conceituais e fisiopatológicos	48
2.3.1 Sistema modulatório descendente da dor	55
2.3.1.1 Avaliação da função dos sistema modulatório descendente da dor e de limiares de dor	57
2.3.2 Marcadores biológicos de plasticidade associados à dor	60
2.4 Estimulação Transcraniana de Corrente Contínua (ETCC)	62
2.4.1 Avaliação da Excitabilidade Cortical	65
2.4.2 Desenvolvimento e validação de equipamento de ETCC para uso domiciliar ..	67
3. MARCO CONCEITUAL	70
4. JUSTIFICATIVA	71
5. OBJETIVOS	73
5.1 Objetivo primário	73
5.2 Objetivos secundários	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

7. ARTIGO 1	89
8. ARTIGO 2	107
9. ARTIGO 3	140
10. ARTIGO 4	171
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	191
12. PERSPECTIVAS FUTURAS	193
ANEXOS	194
ANEXO 1: TCLE ESTUDO 1 E 2	195
ANEXO 2: ADENDO TCLE ESTUDO 1 E 2	197
ANEXO 3: TCLE ESTUDO 3 E 4	199
ANEXO 4: PRODUÇÃO NO PERÍODO DO DOUTORADO	205
ANEXO 5: STROBE	208
ANEXO 6: CONSORT 2010	211

APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada em seis capítulos:

Capítulo I – Introdução

Capítulo II – Revisão da literatura

Capítulo III – Justificativa, mapa conceitual e objetivos

Referências da revisão da literatura

Capítulo IV – Artigos

Capítulo V – Considerações finais e perspectivas futuras

Capítulo VI - Anexos

1. INTRODUÇÃO

O estudo das funções biológicas levando em conta sua ritmicidade tem galgado importância no entendimento dos processos fisiológicos, fisiopatológicos e terapêuticos. A ritmicidade fenotípica define a tipologia circadiana que classifica os sujeitos em matutinos, vespertinos ou indiferentes. Essa classificação é feita levando em conta a preferência do indivíduo para alocar o seu horário para dormir e realizar as atividades diárias. Essa tipologia é em parte definida por sincronizadores externos, também chamados de *zeitgebers* e por ritmos endógenos, capazes de existir independentemente de pistas temporais.

Os genes *Clock* ou genes-relógio constituem o sistema molecular de temporização circadiana e fazem parte do sistema endógeno. Esses genes, que permitem uma ritmicidade metabólica celular com período de aproximadamente 24h, estão presentes em todas as células do organismo e respondem ou sincronizam dependendo de sinais nervosos e humorais, sendo um destes genes o *PERIOD3 (PER3)*. O gene *PER3* faz parte do sistema de temporização circadiana e está envolvido na regulação de processos fisiológicos, como a adaptação ao ciclo geofísico de claro/escuro (CE) ambiental, o ciclo sono/vigília (CSV) e o ciclo de temperatura corporal. Os polimorfismos do gene *PER3* estão associados a fenótipos circadianos e na regulação do sono homeostático (1,2). Além disso, ele também está associado ao processamento cerebral de sinais luminosos e à sensibilidade à luz azul.

Em função do ritmo circadiano ser controlado em parte por mecanismos genéticos, ele pode ser alterado quando um ou mais dos genes-relógio apresentam polimorfismos e os expressam. Variações nesses genes de controle circadiano, em especial o *PER3*, podem resultar em diversos fenótipos, de arritmidades, insônia ou dificuldades de sincronização às pistas externas, como as síndromes de fase atrasada e fase avançada de sono, por exemplo

(3,4). Isso pode levar a anormalidades no CSV e mudanças fenotípicas na tipologia circadiana as quais podem alterar a resposta aos diferentes espectros de luz, aos padrões de sono e, conseqüentemente, à modulação dos mecanismos descendentes da dor.

O processamento sensorial da dor é mantido por um sistema facilitador e inibidor descendente da dor, os quais funcionam em conjunto, mantendo dessa forma um estado basal de processamento. Qualquer mudança que comprometa esse equilíbrio pode levar a um desbalanceamento desse sistema. Um desses fatores é a tipologia circadiana a qual pode fornecer indicadores que se relacionam à percepção de dor (5) e à resposta terapêutica farmacológica e não farmacológica. Com isso, a tipologia circadiana também poderia influenciar a percepção de dor e, assim, modular as respostas fisiológicas de acordo com essa classificação. A ritmicidade circadiana está relacionada com a excitabilidade e atividade cortical, a qual desempenha um papel essencial na regulação no início do ritmo sono-vigília e na transição de estágios de sono por meio da liberação de múltiplos neuromoduladores que regulam o sistema de excitação (6). Então é plausível argumentar que uma modulação externa da atividade cortical pode ser adequada para afetar alterações específicas, incluindo a sincronização neural e a conectividade funcional. A excitabilidade cortical aqui é definida como a força da resposta de neurônios corticais a uma dada estimulação, a qual reflete a reatividade neuronal a um estímulo específico, sendo, portanto, um aspecto fundamental da função cerebral humana. Deve-se considerar que a resposta e o efeito dos métodos de neuromodulação não farmacológica são mediados por estímulos elétricos que mudam o potencial de membrana e os processos de neuroplasticidade.

Dentre os métodos de estimulação cerebral não invasiva (NIBS – do inglês *non-invasive brain stimulation*) emerge a estimulação transcraniana de corrente contínua (ETCC), cujos efeitos são promissores para a terapia da dor crônica, tratamento de transtornos

neuropsiquiátricos e na reabilitação. Essa estimulação modula a excitabilidade cortical usando corrente contínua de baixa intensidade (1-2 mA) via eletrodos de superfície (7). A estimulação anódica aumenta a excitabilidade cortical, enquanto o estímulo catódico causa hiperpolarização, reduzindo a excitabilidade da membrana neuronal.

Embora o conhecimento entre as características circadianas fenotípica e genotípica tenha avançado, estudos adicionais devem ser realizados para compreender como estes fatores se relacionam ao processamento da dor e a respostas terapêuticas, especialmente as técnicas de NIBS. Pensando nesse aspecto, por hipótese, técnicas neuromodulatórias, tais como a ETCC, poderiam ter seus efeitos de neuroplasticidade afetados de acordo com a tipologia circadiana. Ao se pensar em individualização de tratamentos de maneira a atender à terapia individualizada, é plausível que a ritmicidade circadiana seja um marcador para orientar a alocação do tratamento de maneira particularizada. No entanto, é fundamental compreender como as variações circadianas se relacionam com as funções fisiológicas e fisiopatológicas ao longo do dia, as quais ainda não foram suficientemente estudadas e empreendidas para definir seu papel na orientação dos tratamentos não-farmacológicos, em especial à NIBS (8).

Então, como se pode observar a partir deste racional e, considerando a relação entre as funções biológicas e a tipologia circadiana, propõe-se este estudo, com o objetivo de investigar como a tipologia circadiana, o *jet lag* social e os polimorfismos do gene relógio *PER3* se relacionam com a excitabilidade cortical, com marcadores de neuroplasticidade como a modulação descendente da dor, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* - BDNF) e S100- β . Sobretudo, investigou-se a relação entre a tipologia circadiana e o efeito da ETCC aplicada em domicílio, com escolha de alocação do horário da aplicação pelo participante. Além disso, propõe-se como perspectiva futura a possibilidade de desenvolvimento de estudos que levem em consideração o horário da

aplicação da técnica. Portanto, a viabilidade terapêutica tendo em conta aspectos relacionados ao ritmo para definir características individuais, tais como tipologia circadiana, demanda a existência de um equipamento de ETCC domiciliar, em que não haja restrição no horário de alocação da estimulação, permitindo assim a viabilidade de estudos com longo tempo de uso, diversificação das indicações e sobretudo um incremento na compreensão do impacto da ritmicidade endógena e do *jet lag* social no efeito da ETCC.

Assim sendo, a partir deste conjunto de informações, foram realizados quatro estudos.

(I) Um estudo multicêntrico foi conduzido pela Universidade de São Paulo (USP) com a colaboração da autora e orientador da presente tese e teve como objetivo avaliar a interação entre fatores geográficos associados à latitude, parâmetros circadianos e sono. Para responder a esta questão, foram avaliados o polimorfismo do gene *PER3*, parâmetros do sono e variáveis do ritmo circadiano de indivíduos residentes em três diferentes latitudes do Brasil. **(II)** Avaliar a variação do sistema modulador descendente de dor pela modificação na escala numérica de dor (NPS 0-10) durante a tarefa de modulação de dor condicionada (CPM-task) entre os polimorfismos do gene relógio *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5}. Além disso, avaliou-se a relação desses genes com as medidas da dor [limiar de dor ao calor, tolerância à dor, *cold pressor task* (CPT)], S-100-β e BDNF. **(III)** Avaliar o efeito de 10 sessões de ETCC, tanto no potencial evocado motor (MEP) quanto na secreção de BDNF, de acordo com a tipologia circadiana determinada pelo Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ). **(IV)** Avaliar a adesão e impedância de contato como medidas de factibilidade do equipamento de ETCC domiciliar.

A estrutura da apresentação desta tese segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A formatação dos artigos foi realizada de acordo com as normas dos periódicos aos quais foram ou serão submetidos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para a busca e seleção sistematizada das informações

Esta revisão da literatura está focada em investigar como a tipologia circadiana, o *jet lag* social e o gene relógio *PER3* se relacionam com a excitabilidade cortical, com marcadores de neuroplasticidade como a modulação descendente da dor, o BDNF e o S100- β .

Para apresentar o tema central desse estudo, buscou-se suporte em estudos experimentais, observacionais, ensaios clínicos randomizados e duplo-cegos controlados e para não restringir a pesquisa, os componentes Comparação e Desfecho não foram utilizados. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (PubMed), EMBASE, SciELO e Lilacs, sem período delimitado. Foram realizadas buscas por meio dos descritores [MeSH (MEDLINE/PubMed) e Emtree (EMBASE)], além de palavras-chave quando os termos não foram encontrados: (1) *Nociceptive pain*; (2) *Pain perception*; (3) *Pain threshold*; (4) *Pain measurement*; (5) *Descending pain modulatory system*; (6) *Diffuse Noxious Inhibitory Control (DNIC)*; (7) *Conditional Pain Modulation (CPM)*; (8) *Chronobiology phenomena*; (9) *Periodicity*; (10) *Biological clocks*; (11) *Circadian rhythm*; (12) *Circadian clocks*; (13) *Clock protein*; (14) *Period circadian proteins*; (15) *PER3 protein, human*; (16) *Transcranial direct current stimulation (tDCS)*; (17) *Cortical excitability*; (18) *Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)*; (19) *S100- β* . Os termos foram agrupados em três grupos: processamento de dor, cronobiologia e neuromodulação; no entanto, inicialmente foram investigados os termos individualmente para, após os agrupar.

A tabela 1 sintetiza a estratégia de busca das referências bibliográficas usadas, com base nos aspectos que estruturam o objetivo do estudo.

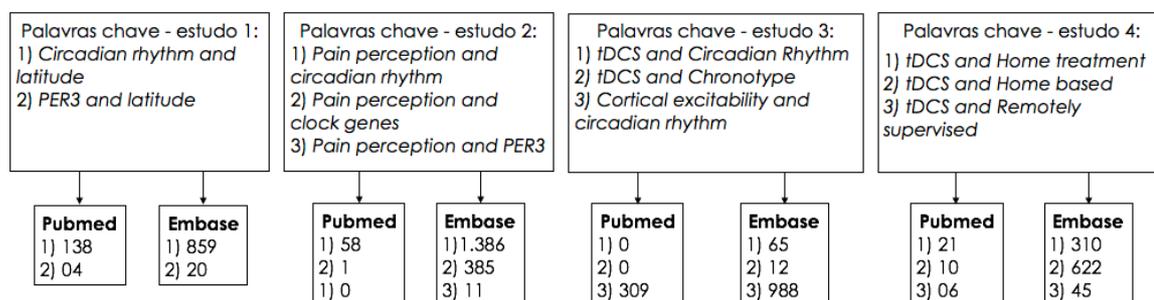
Tabela 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas.

Palavras-chave	PubMed	EMBASE	Lilacs	SciELO
“Nociceptive pain”	16.231	45.509	234	139
“Pain perception”	16.605	123.633	598	503
“Pain threshold”	21.002	131.832	225	126
“Pain measurement”	83.340	284.147	1428	417
“Descending pain modulatory system”	154	3.593	0	0
“DNIC”	406	5.070	0	0
“CPM”	26	2.388	0	0
“Chronobiology phenomena”	94.204	665	14	2
“Periodicity”	189.914	715.359	248	307
“Biological clocks”	12.815	50.215	72	13
“Circadian rhythm”	71.852	59.350	507	164
“Circadian clocks”	6.987	20.799	44	9
“Clock protein”	8.382	40.554	15	4
“Period circadian proteins”	3.932	27.225	12	3
“PER3 protein, human”	151	688	127	6
“tDCS”	3.154	4.003	25	29
“Cortical excitability”	111.413	42.483	13	15
“BDNF”	18.832	40.641	75	65
“S100-β”	2.178	3.243	1	15

DNIC: *diffuse noxious inhibitory system*; CPM: *Conditional Pain Modulation*; PER3: *period gene 3*; tDCS: *Transcranial direct current stimulation*; BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*.

Para a escolha dos artigos, usou-se os marcadores OR para o agrupamento das palavras-chave relacionadas aos processamentos de dor, cronobiologia e neuromodulação e após o marcador AND para relacionar os três grupos de interesse. Os artigos foram rastreados por meio dos títulos e resumos e após a exclusão das duplicações e leitura dos *abstracts* para confirmação da relação com os temas, 146 artigos foram selecionados para a leitura completa. Além disso, ao longo de 3 anos foi feito um rastreamento dos artigos que explicam o mecanismo de funcionamento dos gene-relógio; por isso, esses artigos de referência também foram incluídos, totalizando a escolha de 211 artigos. A figura 1 apresenta a estratégia da busca em cada base de dados com os termos agrupados.

Figura 1: Estratégia da busca sistematizada.



2.2 Ritmicidade biológica

Todas as espécies, de seres unicelulares a humanos, apresentam padrões rítmicos de duração distinta e em vários níveis de arranjo, produtos de uma organização temporal interna (9,10). Praticamente todos os processos fisiológicos apresentam ritmicidade, ou seja, são ciclos regulares expressos por meio de hábitos diurnos e noturnos ocorridos regularmente ao longo do tempo, podendo ser maiores, próximos ou menores que 24h. Essas variações são chamadas de ritmos biológicos, sendo os circadianos os mais estudados e melhor compreendidos até o momento.

Os ritmos circadianos (*circa*= ao redor de; *die*= dia) são ritmos biológicos que variam cerca de 24h e controlam uma variedade de sistemas biológicos além do ciclo diário de sono e vigília (11). Processos fisiológicos são regulados por ritmos circadianos e alguns deles incluem: temperatura corporal, secreções hormonais, aspectos bioquímicos e comportamento alimentar, por exemplo. Todos são necessários para a sobrevivência (11,12) e controlados por sincronizadores externos, também chamados de arrastadores ou *zeitgebers* (doadores de tempo) e por ritmos endógenos, também chamados de osciladores centrais ou

sistema temporizador (13), capazes de existir independentemente de pistas temporais. A alternância do ciclo claro/escuro produz uma série de sinais (variação luminosa, temperatura, disponibilidade de recursos, etc.) que podem atuar como pistas capazes de sincronizar sistemas de temporização endógenos (9). Desse modo, a organização temporal de um ser vivo expressa-se de duas maneiras: pela forma de reação a estímulos ambientais aos quais está inserido e pela ritmicidade biológica endógena.

Um dos estímulos ambientais mais marcante é o relacionado ao ciclo geofísico de claro/escuro (CE) diário (14), gerado pela rotação da terra em torno de seu próprio eixo e em torno do sol, considerado o mais forte *zeitgeber* que sincroniza ritmos circadianos em seres humanos um estímulo temporal estável, confiável (10,11). Este ciclo está sincronizado ao ciclo sono-vigília (CSV) da espécie humana, que é considerada diurna por realizar atividades durante o dia e dormir à noite. Dessa forma, o padrão temporal de ocorrência do ritmo biológico, quando sincronizado ao ciclo CE, dia/noite (14) favorece que grande parte das atividades sociais e laborais sejam alocadas para acompanhar esse ciclo, visando adaptação, pois os seres humanos convivem socialmente em uma organização temporal relacionada com o ambiente ao qual está inserido. No entanto, em condições naturais, a exposição à luz não é estável e depende do controle individual de exposição luminosa natural e artificial (10). Outros *zeitgebers* (não relacionados à luminosidade) são descritos e considerados importantes, como a atividade motora, a disponibilidade de alimentos, sons e interação social; entretanto, eles são considerados menos impactantes quando comparados ao ciclo CE, com exceção aos ambientes em que esse ciclo não está presente e um sinal temporal alternativo é necessário (10). Por fim, a introdução de relógios técnicos adicionou mais um *zeitgeber* na vida diária dos seres humanos: o tempo social (9).

Embora o ciclo CE natural seja conhecido por ser um *zeitgeber* potente, varia em

função da latitude e pode sinalizar diferentes pistas temporais para o sistema circadiano de acordo com a proximidade ou afastamento da linha do Equador. Esse ciclo varia conforme a rotação da Terra (9), portanto é variável ao longo do ano dependendo da latitude e da incidência da luz solar. Ritmos circadianos não têm a duração de exatas 24 horas; verifica-se essa flexibilidade possivelmente para o organismo poder se adaptar às diferentes latitudes que, por sua vez, oferecem diferentes informações temporais de acordo com a localização geográfica.

A sincronização da ritmicidade endógena baseia-se principalmente na sensibilidade à luz e inclui efeitos clássicos, como a mudança de fase do tempo de sono-vigília (15). Esta sensibilidade à luz, especialmente para o espectro azul-violeta, é particularmente dependente de fotorreceptores à base de melanopsina (16). No mundo real, onde os seres humanos estão expostos aos padrões de transição naturais do ciclo CE, a luz solar é uma fonte importante de espectro azul-violeta (446-484 nm λ) e, portanto, representa um grande sincronizador para o sistema endógeno de tempo circadiano (17,18).

Este ciclo natural de luz e som deriva de movimentos periódicos da Terra e varia de acordo com fatores geográficos, como a latitude. Embora os paralelos latitudinais tenham sido considerados uma construção humana não sendo, portanto, uma variável real, eles refletem características físicas da geografia. Cada latitude compreende variáveis ambientais complexas, como padrões de temperatura, precipitação, irradiação solar e outros fatores abióticos. Além disso, o conceito de latitude só atinge sua importância real quando considerado como vinculado aos movimentos rotacionais e translacionais da Terra. Consequentemente, variações diárias e anuais específicas de latitudes a variáveis (por exemplo, irradiação solar) dão origem a pressões evolutivas ligadas à latitude, que influenciam a expressão genotípica e fenotípica dos seres vivos. Portanto, a latitude reflete

diferenças na duração das fases claras e escuras do dia ao longo do ano, dos tempos do nascer e do pôr-do-sol, da composição espectral da luz e dos níveis de irradiação solar, que podem interagir de diferentes maneiras com o sistema de cronometragem circadiano (19). Por exemplo, um estudo sobre a relação da latitude e o efeito de polimorfismos do gene *PER3* já foi formulado com base nas associações opostas da síndrome da fase do sono atrasada que compara uma população britânica e brasileira (20).

O processo de adaptação à variação do ciclo CE ambiental pode ser medido conforme o ciclo influencia ou dessincroniza o ritmo circadiano (10). Sempre que uma variação ambiental ocorre, há um tempo de latência de reencaminhamento, o qual revela a capacidade individual de lidar com essas mudanças (10). Verificam-se pelo menos dois tipos de mudanças reconhecíveis nos *zeitgebers*: mudanças de curto e longo prazo. As de curto prazo ocorrem quando existe mudança de hábitos nos finais de semana e nas férias e as de longo prazo ocorrem em viagens para um fuso horário diferente (10). Em função disso, deve-se considerar que a adaptação temporal de um organismo ao meio ambiente não depende de um único sincronizador, mas de um grupo complexo e dinâmico deles (10).

Já a ritmicidade biológica endógena é a responsável pela alternância periódica das funções orgânicas durante o dia, expressas pela ciclicidade da atividade metabólica, pela atividade do sistema imune, da simultaneidade de ações celulares, bem como das funções gastrointestinal, renal e endócrina, independente de pistas temporais (21). A existência desse controle, integrado aos processos de sincronização temporal externa demonstra a generalidade desse fenômeno, além de apresentar evidências da presença de mecanismos orgânicos responsáveis pelos processos de temporização ou controle do tempo biológico interno, chamados de genes-relógio (13). Para exemplificar, pode-se destacar os ritmos biológicos já bem estabelecidos da melatonina (22), da temperatura corporal (23), do alerta subjetivo e da

performance em tarefas cognitivas (24), por exemplo.

Tendo em vista a ciclicidade dos ritmos biológicos, é necessário entender melhor como os seres humanos distribuem suas tarefas ao longo do dia e, mais do que isso, é necessário compreender que esse fenômeno não é puramente uma conveniência social, mas sim um processo no qual fatores ambientais e endógenos estão envolvidos e relacionados. O entendimento da tipologia circadiana, conseqüentemente, explica esse processo.

2.2.1 Tipologia circadiana

A tipologia circadiana é definida como a preferência para a execução de atividades em horários específicos do dia, sendo considerada fenótipo de ritmos circadianos (6,12,23). Também chamada de cronotipo, essa expressão rítmica circadiana difere entre os indivíduos e pode os classificar em sete categorias: matutino extremo, matutino moderado, matutino leve, indiferentes (intermediários), vespertino leve, vespertino moderado ou vespertino extremo (6,9,25). Essa classificação é feita levando em conta a preferência para alocar o horário para dormir e realizar as atividades diárias, sempre considerando o horário geográfico local (26).

Os sujeitos matutinos preferem dormir e acordar cedo e realizar suas atividades pela manhã, momento no qual conseguem o seu melhor desempenho mental e físico (6,23). Sentem-se aptos para a rotina diária de trabalho, com um bom nível de alerta pela manhã. Quando comparados com a população em geral, apresentam a característica de adiantamento de fase em grande parte dos ritmos endógenos.

Em contrapartida, os chamados vespertinos preferem realizar as atividades à tarde ou noite e dormem e acordam tarde, apresentando o melhor desempenho e sensação de alerta no final do dia e à noite (6,23), com pico dos ritmos endógenos atrasados em comparação com a

população em geral. Os indiferentes são o que realizam atividades em turnos variados sem provocar prejuízos no cumprimento de tarefas e compromissos, pois se adaptam com maior facilidade às demandas exigidas em qualquer turno (27). Cerca de 40% da população adulta é classificada em um dos dois grupos extremos (matutinos ou vespertinos), enquanto 60% são indiferentes (6).

Algumas medidas fisiológicas cujas temporalidades de expressão estão relacionadas à matutividade ou vespertividade podem ser utilizadas para correlacionar a preferência individual da realização das atividades pela manhã ou tarde com marcadores biológicos, como a secreção de melatonina e a variação da temperatura corporal (22,28). A melatonina é o hormônio mensageiro que transforma o sinal codificado a partir da informação luminosa que atinge a retina em sinais endócrinos e, portanto, está envolvida na adaptação ao claro/escuro. Em seres humanos, sua secreção pela pineal ocorre à noite, logo após o início da fase escura, atingindo valores mais elevados entre 2 e 4 horas da manhã, caindo gradualmente na segunda metade da noite. Durante o período diurno, a secreção de melatonina é muito baixa (29). A melatonina que, na população humana apresenta uma grande variabilidade interindividual na sua produção e liberação, tem um pico de secreção mais cedo nos indivíduos matutinos quando comparados aos vespertinos (23).

O método de mensuração da secreção de melatonina é laborioso e dispendioso e, embora seja bem estabelecido e confiável, não é adequado para estudos com uma grande quantidade de participantes em função do custo elevado. Uma alternativa para a detecção da tipologia circadiana é o uso de questionários para avaliar o cronotipo com base nas preferências de sono-vigília (26).

Uma série de questionários de autoavaliação foram validados em diversos países (6),

sendo que o primeiro instrumento desenvolvido para mensuração não invasiva do ciclo circadiano foi o Questionário de Matutividade-Vespertinidade (em inglês - *Morningness-Eveningness Questionnaire* - MEQ) descrito por Horne & Ostberg em 1976 (30) e adaptado para língua portuguesa em 1990 (31), o qual produz uma pontuação em que valores altos indicam a matutividade e valores baixos a vespertinidade.

Em contrapartida, em 2000 foi desenvolvido um instrumento alternativo, o Questionário de Cronotipo de Munique (*Munich ChronoType Questionnaire* - MCTQ) (25) que identifica o cronotipo com base no tempo real de sono nos dias de trabalho e nos dias livres ao invés de preferências pessoais (32). Calcula-se o ponto médio do sono em dias de trabalho e dias livres e após, faz-se uma correção aplicada para a compensação de sono nos dias livres devido ao *deficit* de sono durante a semana de trabalho: meia fase de sono corrigida (MSFsc). Isso permite a análise de medidas circadianas com base no tempo interno, em horas (26).

Embora o ambiente tenha um importante papel na ritmicidade biológica, pois interfere nos ritmos endógenos, sincronizando o organismo ao ciclo ambiental, o cronotipo não depende apenas da associação da genética (33–35) e dos fatores ambientais (25), mas também do gênero (36) e da idade (37–41). Portanto, considerar a faixa etária e as relações sociais características de cada uma das faixas de idade na análise das pesquisas cronobiológicas faz-se necessário, bem como entender que o sexo pode ser responsável pela flexibilidade do sistema de temporização circadiana nos ajustes para a adaptação diante dos desafios para manter a regularidade do ciclo sono-vigília (CSV) (36). Dentro de cada faixa etária, a distribuição de cronotipos (MSFsc) são semelhantes à da população geral, porém quando comparados com diferentes faixa etárias há uma diferença na resposta (42).

As crianças geralmente são matutinas, no entanto ocorre um atraso de fase progressivamente durante o desenvolvimento, atingindo um máximo de vespertinidade aos 20 anos e depois com o incremento da idade existe uma migração para a matutividade (42). Já estudantes universitários, por exemplo, exibem geralmente um padrão de CSV irregular, determinado por diminuição da duração do sono durante a semana que é compensado ao final de semana (43). Essa compensação, também denominada de *jet lag* social, evidencia o desalinhamento entre o horário social e biológico (44), uma característica marcante de indivíduos nesta fase da vida. Como a duração do sono é um dos componentes necessários para uma boa qualidade de sono (45), toda a restrição, mesmo que em fases específicas, resulta, no curto prazo, em grande número de efeitos fisiológicos adversos. Efeitos esses que podem provocar sérias consequências, em especial quando há a execução de tarefas em que sejam necessárias concentração, tomada de decisão e destreza motora, destacando-se os perigos de dirigir veículos automotores com sono (46), por exemplo.

Em contrapartida, diversos estudos evidenciaram que quando indivíduos ficam isolados de pistas externas, como o ciclo da luz, situação chamada de livre curso, passam a expressar o ritmo circadiano endógeno e, nesse caso, verificou-se que o CSV se mantém, porém em uma periodicidade maior de quando há exposição ao ciclo ambiental (11,13). A partir dessas pesquisas (11,13), verificou-se que um sistema extremamente sincronizado e organizado é considerado funcionante mesmo sem estímulos ambientais. Assim, as pesquisas sobre o funcionamento dessa sincronização, que envolve o sistema nervoso central e a presença dos chamados genes-relógio, começaram a existir. Embora os estudos sobre o sistema circadiano de experimentos em condições constantes tenha elucidado muito sobre a tipologia circadiana, o maior desafio foi entender como ela funciona na sincronização do dia endógeno com o ciclo CE ambiental, fenômeno denominado *entrainment* ou arrastamento

(26). Porém, um dos problemas da pesquisa com experimentos de sincronização é o uso de bons métodos para quantificar o arrastamento de forma confiável, o que foi resolvido com o uso de mensuração dos valores de melatonina e avaliação da temperatura corporal central (26).

A capacidade dos sistemas vivos para sustentar ritmos de aproximadamente 24 horas na ausência de pistas ambientais mostra que a maioria das oscilações diárias não são respostas ao ciclo diurno, mas sim são geradas por um relógio interno (11) que rege os ritmos biológicos (47–49). Isto demonstra a ação de um sistema temporizador interno que envolve osciladores celulares e pode gerar ciclos independentemente da presença de pistas temporais (50), papel feito pelos genes-relógio.

2.2.2 Genes-relógio

A expressão gênica circadiana faz parte do sistema endógeno e os genes-relógio ou *Clock* formam o sistema molecular de temporização circadiana. Esses genes formam um sistema sincronizado autossustentado que permitem uma ritmicidade metabólica celular com período de aproximadamente 24h (2), estão presentes em todas as células do organismo e respondem ou sincronizam dependendo de sinais nervosos e humorais (20,51).

No ambiente natural, o sistema circadiano de um organismo sincroniza uma ampla rede de processos fisiológicos e comportamentos biológicos (do CSV ao ritmo da melatonina e temperatura corporal) ao ciclo CE ambiental (2,11). Nos mamíferos, o principal oscilador biológico central gerador dos ritmos biológicos é considerado um marca-passo circadiano e está localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalâmico (52,53), é composto de dois núcleos bilaterais contendo aproximadamente 10.000 neurônios cada e está localizado na

região rostral do hipotálamo, acima do cruzamento dos nervos ópticos (quiasma óptico). Estas estruturas recebem projeções diretas de células ganglionares da retina (9,11). A Figura 2 apresenta um esquema que mostra a associação entre os *zeitgebers* (foto e atividade-dependentes) e o sistema circadiano endógeno, com a ativação do NSQ a partir da incidência da luz na retina e posterior sincronização periférica, a partir da oscilação celular dos genes-relógio presente em todas as células do organismo (54).

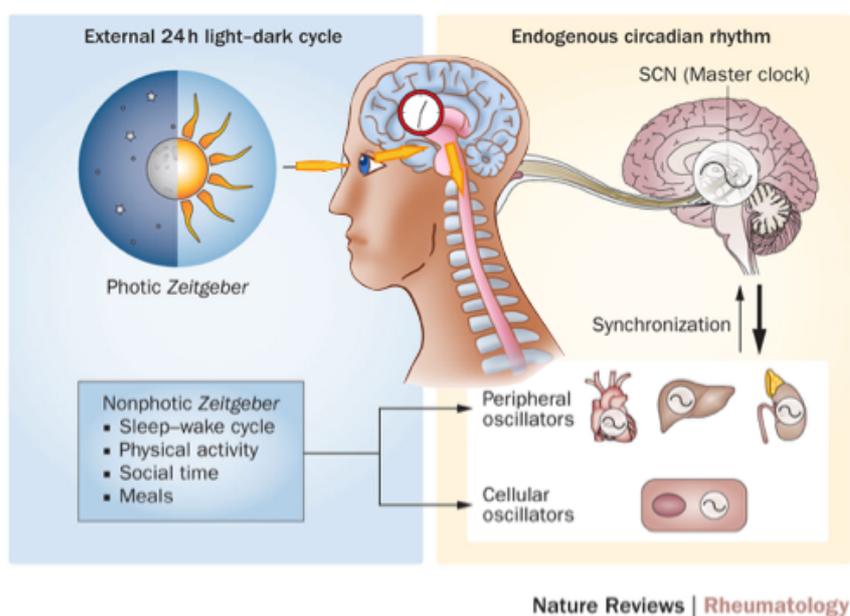


Figura 2: *Zeitgebers* e relógio circadiano interno. Fonte: adaptado de (54).

Os osciladores endógenos, marca-passos ou relógios biológicos são sincronizados ou arrastados por fatores cíclicos ambientais (ciclo CE) capazes de regular o período e a fase desses osciladores (Figura 3A). Eles são capazes de produzir um ritmo celular sustentado e síncrono nos tecidos central e periférico, resultando na organização temporal de ritmos moleculares e comportamentais em todo o corpo (55), os quais incluem o CSV, a secreção hormonal e a termoregulação (Figura 3B). Quando a informação luminosa do ambiente é processada na retina, é transmitida diretamente ao hipotálamo, por meio do trato retino-hipotalâmico (11) nos núcleos supraquiasmáticos, cujos neurônios geram um padrão

oscilatório de impulsos nervosos ao longo de 24 horas, dependendo da incidência ou não da luz na retina.

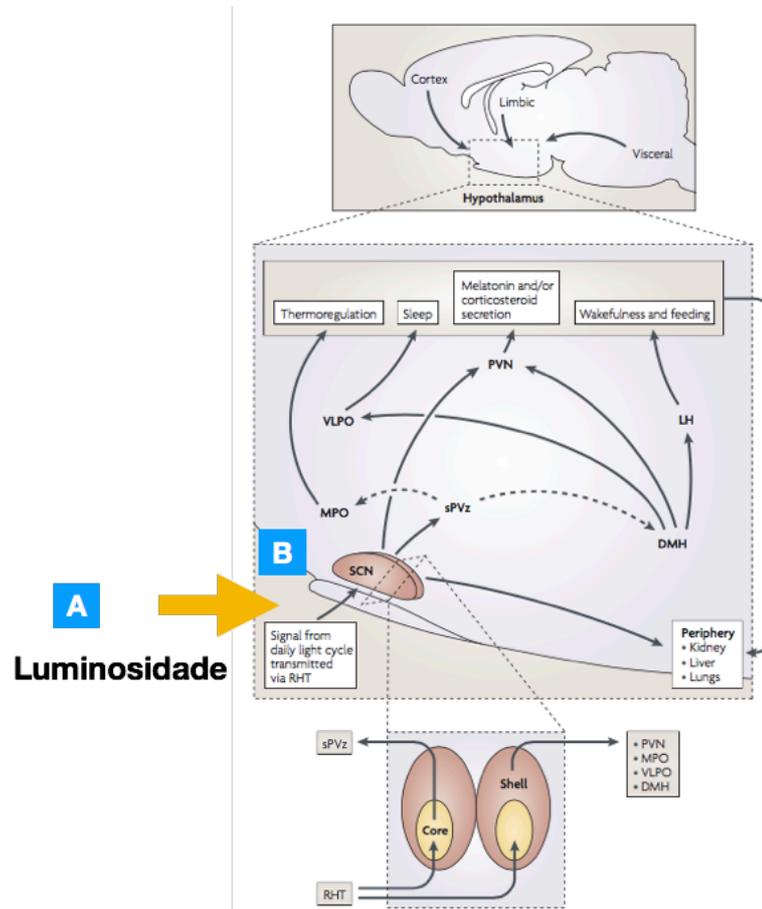


Figura 3: NSQ quando em presença do ciclo CE ambiental. Nota: adaptado de (11). (A) Presença de luminosidade. (B) SCN: Núcleo supraquiasmático.

Ambos os sinais neuronais e humorais provenientes do NSQ podem regular as vias de saída, que controlam diversas funções fisiológicas e, por meio de suas projeções, regulam a atividade da glândula pineal, provocando a síntese e a liberação de melatonina, o que no caso da espécie humana prepara para o sono noturno (11). As projeções dos neurônios do NSQ partem para muitas regiões e essas vias de saída são responsáveis pelo tempo adequado de liberação hormonal, comportamento de alimentação e flutuações de temperatura corporal.

Uma das regiões é o *locus coeruleus* (LC), o qual contém neurônios sintetizadores da

norepinefrina (NE) responsáveis por enviar projeções difusas ao longo do sistema nervoso central. O sistema LC-NE tem um papel importante nas respostas de excitação, atenção e estresse e também pode contribuir para a plasticidade sináptica de longa duração (*long-term potentiation* — LTP), modulação da dor, controle motor, homeostase de energia e controle do fluxo sanguíneo local (56). Esse processo facilita a regulação circadiana da atividade noradrenérgica e é importante para as transições da atenção focal e flexibilidade cognitiva (57), do condicionamento do medo contextual, da regulação circadiana do ciclo sono-vigília (58) e plasticidade sináptica, incluindo a LTP (55,59). Além dessas vias neuronais, há evidências de que o NSQ relaciona-se na mediação de ritmos fisiológicos, tanto no encéfalo quanto na periferia (11).

Os principais genes-relógio conhecidos por controlar o ritmo circadiano de mamíferos são: *Clock*, *Bmal1*, *Timeless (Tim)*, *Period (PER)* – *PER1*, *PER2* e *PER3*, *CRYptocromos (Cry)* – *Cry 1* e *Cry 2*, *Caseína quinase epsilon 1 (Ckl ε)*, *Dec1*, *Dec2* e o gene *Rev-erb ε* (60–62). O mecanismo proposto para explicar o papel dos genes-relógio no controle do ritmo circadiano é o seguinte: os genes *clock* e *bmal1* codificam proteínas que quando sintetizadas se unem formando uma estrutura chamada de heterodímero (Figura 4A). O heterodímero *Clock-bmal1* quando formado, ativa uma cascata de reações metabólicas e também a transcrição dos genes *Cry*, *Per* e *Tim*, necessários à manutenção do ciclo vigília-sono (Figura 4B). As proteínas codificadas por esses genes irão formar também dímeros (*Per-Per*, *Per-Tim*, *Per-Cry* e *Tim-Cry*) (Figura 4C), que irão retornar ao núcleo celular e bloquear a transcrição deles próprios, impedindo a ação do heterodímero *Clock-bmal1*, sobre seus próprios genes codificantes, formando dessa forma um *loop* auto-regulatório (Figura 4D) que dura aproximadamente 24 horas. A proteína *Ckl ε* tem o papel de fosforilar a proteína *PER*, regulando a atividade desta última. Os genes *Dec1*, *Dec2* e o gene *Rev-erb ε* participam de

loops auxiliares que ativam ou desativam a transcrição dos genes *Clock* e *Bmal1* (Figura 4E) e assim reiniciam o processo ao final de cerca de 24 horas (60,63).

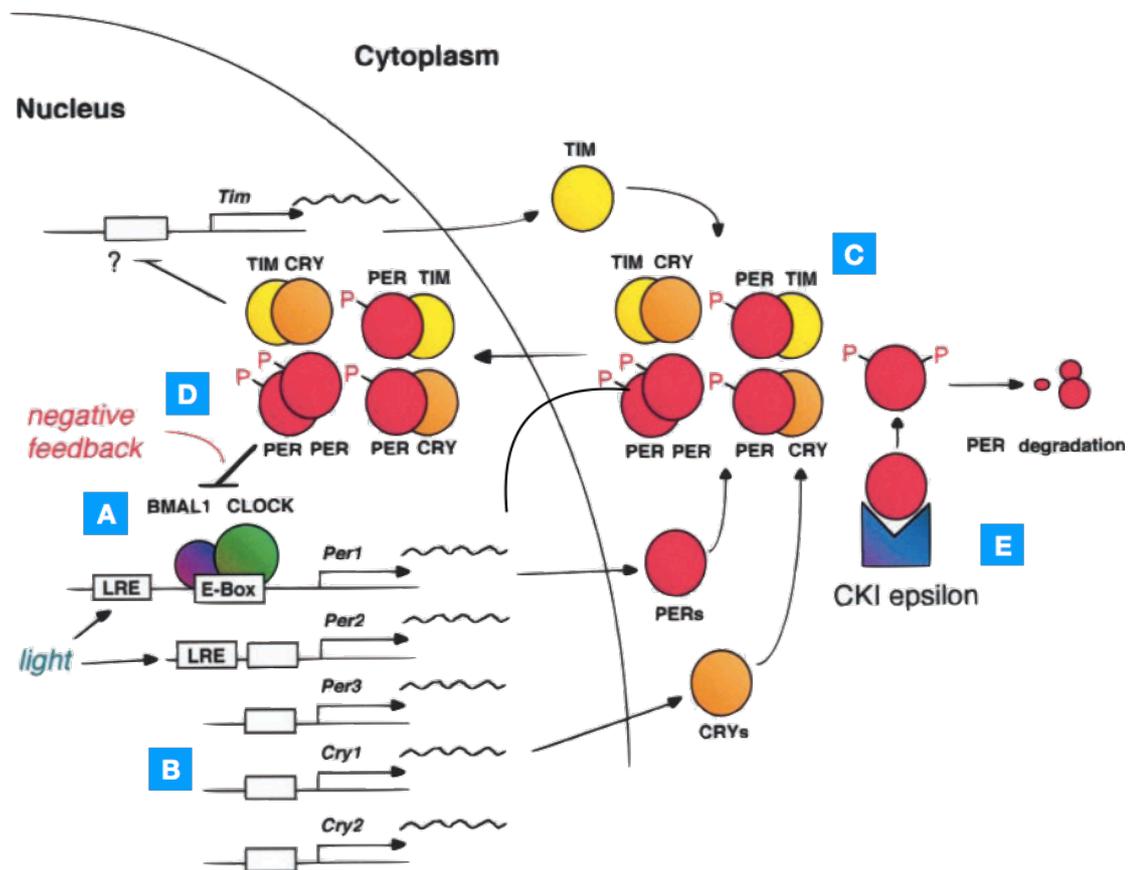


Figura 4: Papel dos genes-relógio no controle do ritmo circadiano. Adaptado de (60).

A modificação pós-tradução e a degradação das proteínas do relógio circadiano são etapas cruciais para determinar a periodicidade circadiana de aproximadamente 24 horas. Assim como nas *Drosophilas*, as proteínas *PER1* e *PER2* de mamíferos são progressivamente fosforiladas à medida que se acumulam durante o final da tarde e à noite (11), o que leva à ritmicidade circadiana e à ciclicidade do processo, constituindo-se um mecanismo autorregulador que oscila com um período próximo a 24h. Um componente central do modelo molecular da função do relógio circadiano é a chegada do dímero *PER-TIM* no núcleo das

células relógio (64). Então, se um pulso de luz ocorre no início da noite à medida que o heterodímero se acumula no núcleo das células relógio, o *TIM* é degradado e o *PER* é desestabilizado, o que gera um atraso no horário circadiano. Entretanto, se um pulso de luz acontece na parte posterior da noite (início da manhã), a molécula *TIM* é degradada após o acúmulo do pico, então o tempo do relógio avança, o que altera a expressão do gene do relógio (64).

Os gene-relógio são amplamente expressos em todo o encéfalo e a capacidade desses genes para alternar ativação e desativação das transcrições sugerem que podem orquestrar o controle circadiano tanto da expressão de genes neuronais, quanto da atividade neuronal em si. Dessa forma, esses genes influenciam a função de neurotransmissores e receptores envolvidos em diversos processos regulatórios que vão desde a regulação de processos fisiológicos até os processos emocionais e cognitivos, por exemplo (55).

Além disso, uma relação complexa foi identificada entre os sintomas de algumas doenças (especialmente as psiquiátricas) e ao sono e disfunção do ritmo circadiano. Tradicionalmente, o transtorno do sono tem sido considerado como um sintoma associado a várias condições clínicas, incluindo dor crônica (65), transtorno bipolar, esquizofrenia, depressão maior, ansiedade e abuso de substâncias (66). No entanto, é possível associar que o sono desordenado reflita a função do relógio biológico prejudicado, o que provoca o desenvolvimento e manutenção desses transtornos em indivíduos suscetíveis (67). Estes exemplos ilustram que o relógio circadiano mediado pelo NSQ e a interação mediada pelos genes-relógio com neurotransmissores e outros processos neuronais são complexas e provavelmente desempenham um papel importante na regulação de uma ampla gama de comportamentos, incluindo sono, emoção, motivação, alerta e cognição (55) e dor.

2.2.2.1 Gene *PERIOD3* (*PER3*)

O gene *PER3* faz parte do sistema de temporização circadiana e está envolvido na regulação de processos fisiológicos, como adaptação ao ciclo CE ambiental, o CSV e o ciclo de temperatura corporal (20,51). Em humanos, este gene possui uma região de repetição polimórfica (*Variable Number of Tandem Repeat* - VNTR), no éxon 18, composto por unidades de 54 pares de base que se repetem 4 (*PER3*^{4/4}) ou 5 vezes (*PER3*^{5/5}) o que resulta em uma alteração de 18 aminoácidos na proteína codificada pelos dois alelos diferentes, 4 ou 5 (20,51,68,69).

Os polimorfismos do gene *PER3* quando expressos, estão associados ao processamento cerebral de sinais luminosos, à sensibilidade à luz azul, à regulação do sono homeostático e aos fenótipos circadianos (1,2). Em relação aos fenótipos, verifica-se que os indivíduos que possuem o alelo de 4 repetições do gene *PER3* têm uma tendência à vespertinidade e à síndrome de fase atrasada do sono (SFAS), por outro lado, os que possuem o alelo de 5 repetições têm uma tendência à matutividade (20,35,70).

Entretanto, um estudo mostrou que embora existam relações entre os alelos curto (4 repetições) e longo (5 repetições) com os fenótipos circadianos, como explicitado anteriormente, essa relação é atenuada com a idade e apresenta correlação positiva apenas no grupo mais jovem, entre 18 a 29 anos. Esses resultados ampliam os achados prévios de que existe uma associação entre os polimorfismos do gene *PER3* e a preferência diurna, mas também demonstram que o fenótipo circadiano nos jovens está mais associado com esse polimorfismo do que em outras faixa etárias (70).

Por outro lado, indivíduos homocigotos para o alelo de cinco repetições (*PER3*^{5/5}) são mais sensíveis do que *PER3*^{4/4} para a faixa de comprimento de onda azul. Este resultado

indica claramente que a sensibilidade à luz é diferente de acordo com um polimorfismo do gene do relógio e fornece suporte para a contribuição genética da variabilidade interindividual da expressão sono-vigília (71).

Quanto à regulação da homeostase do sono, uma pesquisa mostrou que indivíduos com o polimorfismo do alelo mais longo ($PER3^{5/5}$) apresentam um decréscimo do desempenho cognitivo quando estão em privação ou com fragmentação do sono, quando comparados aos indivíduos com o polimorfismo ($PER3^{4/4}$). Por outro lado, os ritmos circadianos da melatonina, do cortisol e da expressão periférica de mRNA do gene *PER3* não foram afetados e não são diferentes entre os dois genótipos (2,68).

Quando os ciclos circadianos são modificados, por variações genéticas ou ambientais, podem ocorrer alterações de diversos processos fisiológicos, em razão da relação entre a fisiologia circadiana e outros processos fisiológicos (11). Essas modificações têm implicações para a biologia humana porque é provável que a variação genética nos genes-relógio possa contribuir significativamente para mudanças fisiológicas e, portanto, aumentar a susceptibilidade a doenças (11), o que pode levar a mudanças na fisiologia do ritmo circadiano e do sono.

O gene *PER3*, especialmente seus polimorfismos tem o potencial de servir como biomarcador para avaliar os traços genéticos do sono, bem como dos fenótipos circadianos (2). O estilo de vida atual é muito diferente do passado, especialmente na chamada sociedade “non-stop”, na qual o excesso de trabalho está diretamente ligado à privação de sono aguda e geralmente leva à restrição crônica do sono, o que se associa a um pior desempenho cognitivo (2,72,73). Além disso, verifica-se que um desalinhamento entre os ritmos circadianos endógenos e o CSV, conhecido como desincronização interna, causa escassez de sono e alterações do ritmo circadiano, levando a riscos elevados para acidentes automotivos, doenças

cardiovasculares, doenças metabólicas e transtornos do humor (74,75).

Em função dessas associações, a noção de que os polimorfismos do gene *PER3* poderiam ser um potencial marcador genético para os fenótipos circadianos e de sono de um indivíduo (2) é interessante para relacioná-los a doenças que levam a transtornos de sono, como é o caso da dor crônica. Portanto, predizer o sono e os fenótipos circadianos pode ajudar a desenvolver intervenções para melhorar a qualidade de vida e potencialmente prevenir ou tratar várias doenças (2).

2.2.3 Relação entre ritmo circadiano e dor

A intensidade da dor exhibe variação circadiana, é multifatorial e pode ser afetada por processos neuroendócrinos endógenos e por influências ambientais externas que variam ao longo das 24h, incluindo a atividade física (76). Uma das maneiras de estudar a ritmicidade circadiana da dor é conhecer a faixa de horário de maior intensidade dolorosa, quando ocasionada por diferentes mecanismos fisiopatológicos. O pico de dor da artrite reumatóide (AR), por exemplo, ocorre geralmente no início do dia; já o da osteoartrite (OA), no entanto, apresenta uma exacerbação ao final do dia (76).

Além disso, quando os ritmos circadianos são modificados por variações genéticas ou ambientais, podem ocorrer alterações de diversos processos fisiológicos, em razão da sua relação com a fisiologia circadiana (11). Essas modificações têm implicações para a biologia humana porque é provável que a variação genética nos genes-relógio possa contribuir significativamente para mudanças fisiológicas e podem, portanto, aumentar a susceptibilidade a doenças (11), por provocarem mudanças na fisiologia do ritmo circadiano e do sono. A relação entre a presença de transtornos de sono e a intensificação da dor está clara (77–79) e,

em muitos casos, é mediada por sintomas ansiosos e depressivos, especialmente nos casos mais graves (80).

A dor persistente, tal como acontece na OA e na fibromialgia (FM) por exemplo, interfere negativamente nos estágios, na arquitetura e microarquitetura do sono, diminuindo a eficiência e provocando o sono fragmentado. Além disso, verificou-se que os transtornos de sono podem contribuir para outros sintomas, como sonolência diurna, dor e fadiga, piorando ainda mais a intensidade da dor e a qualidade de vida desses pacientes (81,82). Pacientes fibromiálgicos geralmente apresentam alterações do sono e anormalidade no ciclo circadiano (83,84), o que pode explicar a ausência de sono restaurador nesses pacientes (83).

A tipologia circadiana também pode contribuir para o aumento da percepção de dor. Observa-se que o cronotipo vespertino é mais sensível a estímulos dolorosos (5); além disso, o desalinhamento do ritmo circadiano pode ser um fator de risco para depressão, especialmente em indivíduos que apresentam *jetlag* social maior que 2 horas (85) e esse fator pode agravar quadros dolorosos. A avaliação do cronotipo pode, portanto, auxiliar no melhor manejo da dor pois pode elucidar os processos envolvidos nos sistemas modulatórios ascendentes e descendentes da dor e pode servir como um possível fator a ser considerado no planejamento terapêutico (5). Em função disso, o estudo da neurobiologia da dor favorece um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na cronificação da dor. Além disso, possibilita a compreensão dos fatores individuais envolvidos nesse processo, incluindo os ritmos circadianos e os gene-relógios.

2.3 Neurobiologia da dor – aspectos conceituais e fisiopatológicos

A dor aguda é a consequência fisiológica de uma lesão tecidual, a qual serve como

uma função protetiva vital, compondo um dos sistemas de defesa do organismo (86). As percepções sensoriais podem servir como um alerta com a finalidade de ajustamento e proteção do organismo, o que permite a defesa da integridade a danos potenciais. Essa característica é evidente para a sensação de dor nociceptiva aguda (87) e está associada a dano tecidual real ou potencial e com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais (88), a partir do estímulo aos nociceptores.

A nocicepção é o processo sensorial que forma o componente sensório-discriminativo da dor, sendo o primeiro passo no processamento da conversão de um estímulo nocivo (térmico, químico ou elétrico) detectado por terminações periféricas (mecanotermorreceptores e receptores polimodais) e transmitido sob a forma de impulso nervoso até o encéfalo (89,90). Os nociceptores são terminações nervosas livres cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios trigeminiais (face) e gânglios espinais (corpo). São ativados quando o estímulo atinge um limiar nocivo e sua resposta é progressiva e de acordo com a intensidade do estímulo (89). Os nervos periféricos são constituídos pelos seguintes grupos de fibras: pelas fibras A- α e A- β e pelas fibras A- δ e C, que conduzem os sinais nociceptivos.

As fibras A- α e A- β (mielinizadas grossas), têm diâmetro maior que 10 μm , caracterizadas por condução rápida de estímulos com baixo limiar, como o tato e outros estímulos não nocivos (89). O processamento sináptico destes estímulos acontece em neurônios de lâminas espinais mais profundos, especialmente a lâmina III (Figura 5c) (91). Embora não estejam envolvidas na percepção nociceptiva fisiológica da dor, quando em condições anormais, estas fibras podem ser recrutadas e passam a transmitir sinais percebidos como dor (90).

As fibras A- δ (mielinizadas de pequeno calibre) apresentam condutividade lenta, estão

envolvidas com a primeira sensação de dor (forte e localizada) e transmitem sinais nociceptivos principalmente para neurônios na lâmina I e II (Figura 5c) (91). São divididas em dois tipos: as de limiar alto, as quais respondem apenas à estimulação mecânica intensa e as que respondem ao calor, tanto para as temperaturas nocivas, quanto para as temperaturas inócuas (89).

As fibras C (amielínicas de pequeno calibre) conduzem o sinal lentamente e transmitem os sinais nociceptivos principalmente para neurônios na lâmina I e II do corno posterior da medula (Figura 5c) (91). A maioria delas está envolvida na percepção da “segunda” dor com características difusa e mal localizada e conduzem estímulos captados por receptores polimodais e mecanorreceptores, capazes de responder a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos (89). Os corpos dos neurônios as fibras sensoriais estão situados nos gânglios da raiz dorsal (GRD) e gânglios trigeminais. São fibras que transmitem informações sobre estímulos nocivos e inócuos ao corno dorsal e ao tronco encefálico, local em que a informação nociceptiva é recebida, processada e modulada pelo sistema descendente (92).

A figura 5 identifica e compara os diferentes axônios aferentes primários (Figura 5a) e apresenta as diferentes velocidades de condução e potencial de ação de cada uma delas. A velocidade de condução está diretamente relacionada ao diâmetro das fibras, comprovado pelo potencial de ação advindo de um nervo periférico responsável pelas primeiras (rápidas) e segundas (lentas) respostas de dor provocadas por lesão (Figura 5b) (89). O esquema apresentado na figura 5c mostra do lado direito as lâminas de *Rexed* e do lado esquerdo a organização aproximada das aferências das fibras no corno dorsal da medula espinal (91).

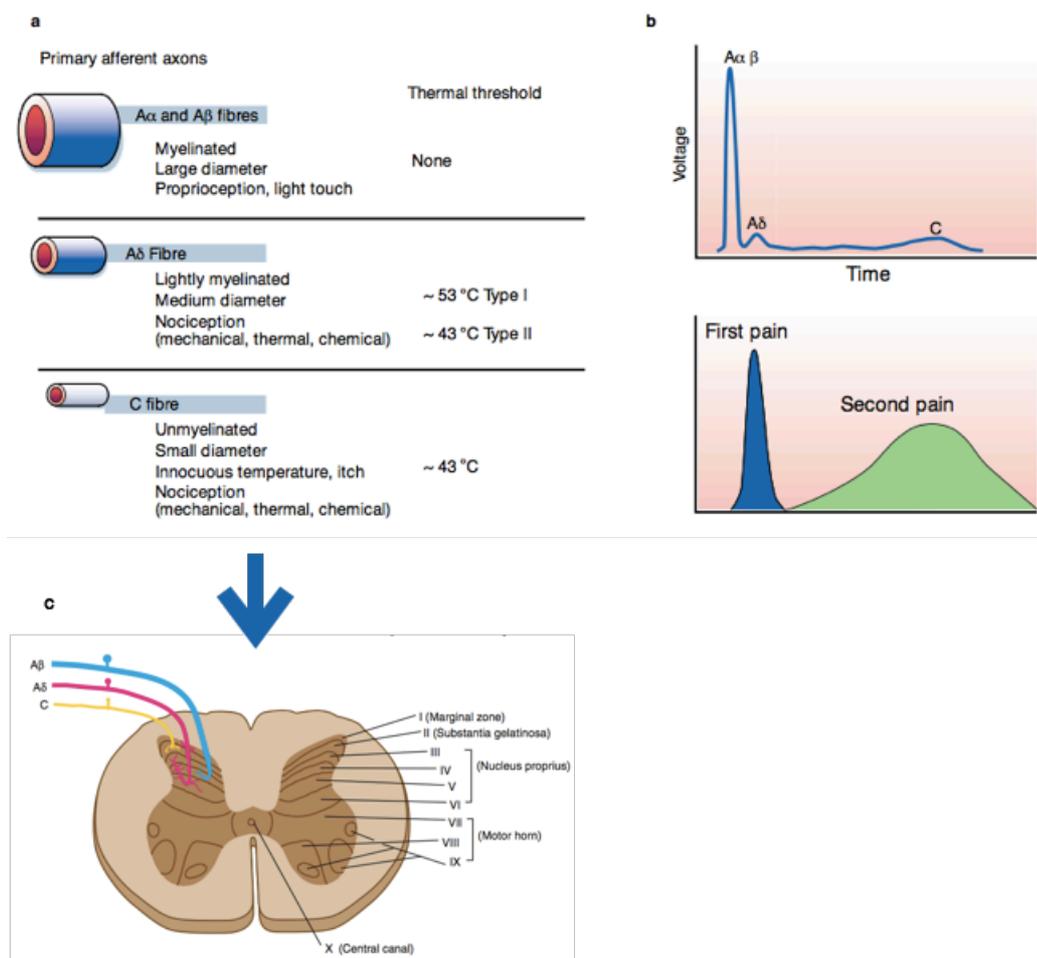


Figura 5: Caracterização dos axônios aferentes primários. Em relação à: a) características, b) velocidade de resposta e c) aferências no corno dorsal. Fonte: adaptado de (89,91).

Então, a partir de uma lesão, uma cascata de eventos ocorre nas vias de sinalização da dor, cujo estímulo é percebido pelos nociceptores, produzindo uma sequência cronológica de eventos. A primeira etapa desse processo é a *transdução*, que ocorre nos terminais periféricos dos neurônios aferentes primários a partir da informação captada pelos nociceptores. Essa informação é convertida em atividade elétrica - potencial de ação (PA), sendo assim capaz de ser transmitida (Figura 6A) (86,89). Esse PA é conduzido aos neurônios de primeira ordem situados no gânglio da raiz dorsal (DRG – do inglês *dorsal root ganglion*), aos neurônios de segunda ordem localizados no corno dorsal da medula espinal (DHSC – do inglês *dorsal horn spinal cord*), aos neurônios de terceira ordem localizados no tálamo e aos de quarta ordem

localizados no córtex, pelo processo de *transmissão* (Figura 6B) (86).

A partir da transmissão, ocorre o processo pelo qual a atividade neural pode ser alterada ao longo da via de transmissão da dor, chamado de *modulação*, que ocorre principalmente dentro do DHSC. Este nível de processamento envolve uma multiplicidade de sistemas de neurotransmissores. A ativação de sistemas de modulação da dor geralmente resulta em menor atividade na via de transmissão da dor a partir de um estímulo nocivo. Exemplos de ativação desse processo incluem analgesia induzida pelo estresse. No entanto, em algumas circunstâncias, a modulação também pode resultar em um aprimoramento da sinalização da dor (Figura 6C) (86).

Tanto as fibras A- δ quanto as C ao se projetarem para o corno posterior da medula espinal, cruzam a linha média e ascendem via sistema anterolateral. Ainda no corno posterior da medula espinal, os axônios desses neurônios decussam para o outro lado e transmitem o estímulo pelos seguintes tratos: o espinotalâmico (STT) e o espinorreticular, que vão para o tronco cerebral e tálamo e então se direcionam para o córtex somatossensorial primário (SI), secundário (SII), ínsula e para o córtex cingulado anterior (ACC), levando à percepção da dor (86). A *percepção* é, portanto, o estágio final do processo de sinalização da dor pelo qual a atividade neural na via de transmissão somatossensorial resulta na sensação subjetiva de dor. Assim, os neurônios talâmicos distribuem a informação nociceptiva para dois locais: o SI, região em que o aspecto sensório-discriminativo da dor é efetivamente processado e para o SII, que parece ter um importante papel no reconhecimento, aprendizado e memória de eventos dolorosos. A ínsula está envolvida nas reações autonômicas ao estímulo doloroso e aspectos afetivos da memória e aprendizados relacionados à dor e por fim, o ACC está relacionado à característica do desprazer da dor, podendo auxiliar na integração do afeto geral, cognição e seleção da resposta frente a estímulos que provoquem dor (93). Por fim,

presume-se que este processo resulte da ativação simultânea dos córtices somatossensorial e límbico primário e secundário (Figura 6D) (86), o que explica a questão subjetiva e emocional relacionada à percepção de dor.

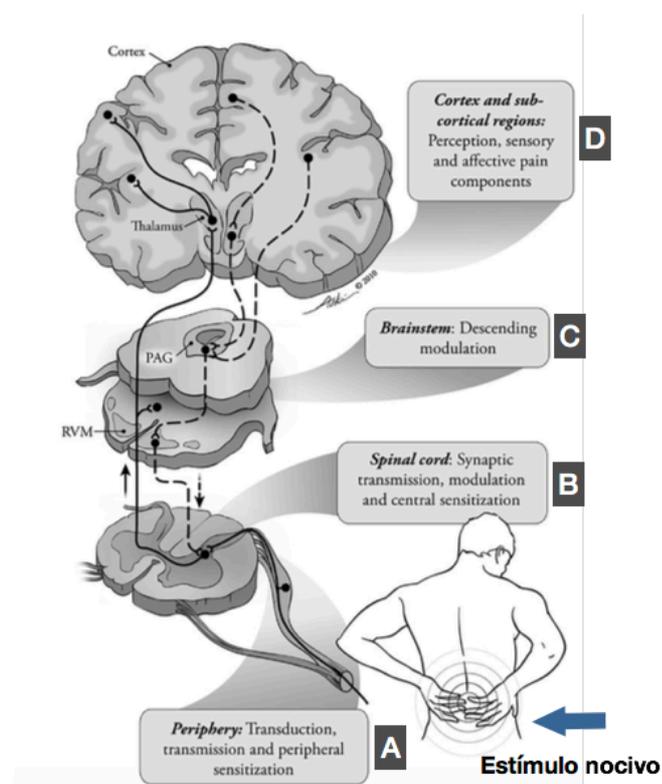


Figura 6: Mecanismos de sinalização da dor. A) transdução, B) transmissão, C) modulação e D) percepção. Fonte: adaptado de (86).

As fibras que transportam informações sensoriais entram pelo DHSC e para a melhor compreensão dos mecanismos de processamento da dor, é importante o aprofundamento de como ele ocorre na medula espinhal. Os neurotransmissores utilizados pelas fibras nociceptivas são produzidos no corpo celular dentro do gânglio espinhal, sendo que as sinapses nesse local são excitatórias. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e atua sobretudo nos receptores α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) e ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), a substância P (SP), que atua sobre o receptor NK1 e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC), que tem um efeito excitatório via receptor PRGC.

Após a ativação do nociceptor, esses neurotransmissores são liberados na sinapse do neurônio de segunda ordem na medula espinhal e periféricamente no local da lesão, o que provoca os sinais de eritema, edema e dor (89).

Após a estimulação de neurônios de segunda ordem a partir de informações nociceptivas provenientes das fibras A- δ e C, dois tipos de neurônios exercem um papel fundamental nos mecanismos inibitórios de supressão da dor. São os chamados *Wide Dynamic Range* (WDR), que respondem a estímulos dolorosos (A- δ e C) e não dolorosos (A- α e A- β) e os neurônios nociceptores específicos (NS) (94). Os neurônios NS são ativados preponderantemente por estímulos dolorosos provenientes das fibras A- δ e C (95). Além de receberem estímulos excitatórios dos nociceptores, os neurônios do DHSC são influenciados por sinapses inibitórias e por células microgлияis, que tem pelo menos dois caminhos (96). No primeiro, ocorre a liberação de glutamato a partir de uma descarga de curta duração ou de baixa frequência que chega ao terminal pré-sináptico. No segundo, o glutamato e SP são liberados simultaneamente, em resposta a um estímulo prolongado ou de alta frequência que chega até a terminação pré-sináptica nociceptora (97,98).

A percepção da dor em seu processamento usual, envolve dois grupos de vias neurais principais: a via aferente e a eferente. A via nociceptiva ascendente envolve os nervos periféricos, que transmitem sinais indutores de dor (nociceptivos) para a medula espinhal e, então, para o tálamo e subsequentemente para o córtex e lá são processados pela via nociceptiva ascendente, que se compõe de dois componentes qualitativos: um componente sensório-discriminativo lateral e um componente afetivo-motivacional medial (89). A via sensório-discriminativa lateral compreende o trato neoespinotalâmico que se projeta até o córtex somatossensorial, o que permite a localização da dor no córtex somatossensorial primário. Essa via medeia a primeira dor, que cursa com sensação forte e bem localizada (97).

As vias afetivo-motivacionais mediais são um conjunto de vias que compreendem as projeções para a formação reticular, o mesencéfalo, o tálamo, o hipotálamo e o sistema límbico (98), os quais influenciam as respostas emocionais e viscerais à dor, assim como à modulação descendente de dor. Este conjunto de vias é composto pelo trato espinomesencefálico, trato espinoreticular, trato paleospinotalâmico e fibras espino-hipotalâmicas e via espinolímbica. Ao final desse processo, a via ascendente da dor emite colaterais que ativam os centros do tronco encefálico que envia fibras modulatórias descendentes para a medula espinal (99).

2.3.1 Sistema modulatório descendente da dor

O sistema modulatório descendente da dor é a via que controla a resposta à dor, o que garante que a intensidade dela seja compatível com o estímulo ocorrido. Conjuntamente ao processamento ascendente da dor, as vias modulatórias descendentes enviam sinais de facilitação e inibição do encéfalo para a medula espinal e na sequência, para a periferia, aumentando ou inibindo os sinais nociceptivos ascendentes (100), o que pode exercer um controle bidirecional sobre a nocicepção.

As vias descendentes da dor se originam de distintas áreas encefálicas, sendo a lâmina II ou substância gelatinosa de Roland um dos principais sítios de modulação. Nesse caso, duas estruturas chaves do mesencéfalo na modulação da dor endógena pela via opioidérgica são a substância cinzenta periaquedutal (PAG) (que recebe entradas de centros cerebrais superiores e é capaz de ativar um forte efeito analgésico) (101) e o núcleo magno da rafe (101,102). Além dessas duas estruturas, o núcleo magno da rafe na medula rostral ventromedial (RVM) exerce influências tanto inibitórias, quanto facilitatórias (100,103). Por sua vez, os córtices

pré-frontal, cíngulo anterior (ACC) e a amígdala, com projeções para a PAG, coordenam as influências inibitórias e facilitatórias da RVM no processamento nociceptivo espinal (101,104,105). Essa via de modulação descendente da dor é chamada de via espinobulboespinal (102).

A PAG é a primeira região do tronco encefálico a ter sido explicitamente demonstrada para ativar o sistema inibidor de dor endógeno (101). Ela influencia a modulação descendente da dor por meio de suas conexões bidirecionais com a RVM e modula as entradas nociceptivas e a percepção da dor por meio das suas interações com projeções ascendentes e descendentes de inúmeras regiões (101).

As vias descendentes inibitórias envolvidas nesse processo são as serotoninérgica, GABAérgica (do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*), adenosinérgica, opioidérgica e noradrenérgica (106–108). As projeções noradrenérgicas descendentes para o DHSC surgem dos grupos celulares adrenérgicos A5, A6 (*locus coeruleus*) e A7, e essas regiões se comunicam com a RVM e PAG (101). Assim, essas projeções noradrenérgicas formam um componente importante da modulação da dor descendente por inibir a transmissão nociceptiva tanto pré-sináptica quanto pós-sináptica (101,109).

Todas essas vias modulam a entrada sensorial de fibras ascendentes e dos neurônios de projeção do DHSC e ativam comportamentos reflexos protetivos que influenciam a percepção da dor (102). Em muitos casos no entanto, as vias neurais fisiológicas, tanto ascendentes quanto descendentes da dor podem tornar-se disfuncionais e levar a estados mal-adaptativos perdendo, assim, a função protetiva original (110) e evoluindo para a dor crônica (DC). Em síntese, a dor pode tornar-se uma doença *per se* quando ocorre na ausência de lesão tecidual ou quando persiste após cicatrização adequada dos tecidos lesados (86), perdendo, assim sua utilidade como um sistema de alerta (89).

2.3.1.1 Avaliação da função do sistema modulatório descendente da dor e de limiares de dor

O sistema modulatório descendente da dor pode ser avaliado por meio da chamada modulação condicionada da dor (*conditioned pain modulation* – CPM), que avalia a resposta das vias endógenas descendentes inibitórias da dor. Na CPM ocorre uma inibição difusa e seletiva dos neurônios WDR no corno dorsal da medula espinal por meio da aplicação de um estímulo condicionante heterotópico, aplicado em áreas remotas a um estímulo teste. Este estímulo condicionante provoca ativação de fibras nociceptivas A- δ e C e induzirá uma redução na percepção da sensação de dor ao estímulo teste (111–113). Esse fenômeno é denominado de contrairritação (dor inibe outra dor) e é conhecido há bastante tempo (114).

Esse fenômeno também é conhecido como *Diffuse Noxious Inhibitory Controls* (DNIC) e é um fenômeno fisiológico estudado em animais anestesiados desde o final da década de 70 e postula que estímulos nocivos exerçam efeitos inibitórios sobre estímulos, sendo eles dolorosos ou não dolorosos (113,115–117).

A diferença primordial entre o paradigma do DNIC para a CPM envolve os sujeitos de pesquisa. Os estudos relativos ao fenômeno fisiológico DNIC avaliaram-no em animais anestesiados (113), mas quando as pesquisas passaram a ser realizadas em humanos conscientes, foi necessário considerar outros sistemas de modulação de dor, como a distração, por exemplo. Em função disso, a consideração de características psicofísicas da dor foi um dos fatores considerados para que um grupo de pesquisadores sugerisse o termo CPM a ser usado quando forem realizados protocolos em humanos. Essa mudança evita a ideia de uma visão mecanicista nos estudos sobre a dor (118).

O protocolo de avaliação da CPM deve ser feito utilizando um estímulo condicionante

heterotópico, aplicado em uma área remota do corpo e um estímulo nociceptivo teste, aplicado em uma área contralateral (119). Podem ser usados uma variedade de estímulos condicionantes para uso em humanos, tais como o estímulo térmico ao frio, o estímulo elétrico e o estímulo isquêmico (119–122). Para o estímulo teste, podem ser usadas as respostas eletrofisiológicas, os limiares de dor à pressão e o estímulo térmico avaliados por meio do teste quantitativo sensorial (*Quantitative sensory testing* - QST) (116,123,124), equipamento validado no Brasil, em 2011 (125) e apresentado na figura 7A. A figura 7B apresenta um exemplo de estímulo condicionante (água entre 0 a 1⁰C), aplicado concomitantemente ao estímulo teste. Todos os estímulos devem obedecer normas de segurança a fim de evitar lesões (119).

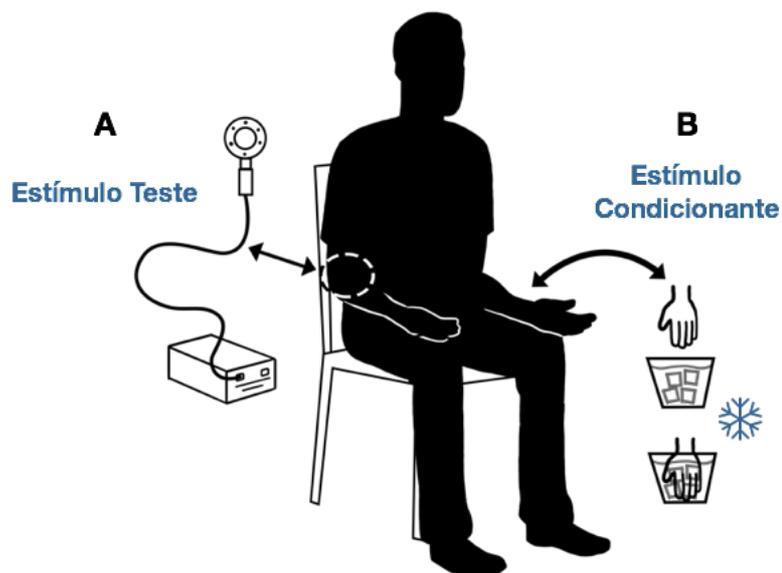


Figura 7: Avaliação da função do sistema descendente de dor com uso do QST. A) Exemplo de estímulo teste - QST. B) Exemplo de estímulo condicionante – estímulo térmico ao frio. Fonte: a autora.

Para a avaliação é necessário mensurar a intensidade da dor percebida por estímulo nociceptivo teste, por meio da escala numérica de dor, em dois momentos: 1) o estímulo nociceptivo aplicado isoladamente até atingir um escore 6 na Escala Numérica de Dor (NPS 010) e 2) durante a aplicação do estímulo condicionante, aplicado em área remota. Neste caso,

aplica-se o estímulo térmico, elétrico ou de pressão com a intensidade para provocar dor 6, aplicado concomitantemente ao estímulo de contraírritação à distância. Calcula-se então o valor de delta (Δ), subtraindo a medida 2, definido por um estímulo moderado na NPS obtido na medida 1. Quando o valor da medida 2 menos a medida 1 for negativo, este resultado indica que o sistema modulador descendente da dor é efetivo; no entanto, quando este valor for zero significa ausência de função do sistema modulador descendente endógeno e quando for positivo, indica efeito de somação (126).

A eficiência da CPM é preditiva de uma variedade de desfechos em saúde. Em indivíduos saudáveis, o processo é ativado em resposta a um estímulo agudo de dor, o que leva, conseqüentemente, à diminuição difusa da sensibilidade dolorosa por meio do aumento do limiar nociceptivo (127). Os desfechos da CPM-task com valor zero ou positivo têm sido associados a várias condições de dor crônica e, no caso de somação, em que há uma resposta aumentada da dor durante o teste, evidencia um prejuízo no funcionamento desse sistema, característico de pacientes com dor crônica (128,129). Esses resultados podem relacionar-se a fatores como transtornos do sono e ao uso de medicação sedativa, comuns em pacientes com dor crônica, e não estão correlacionadas à idade, depressão e ansiedade (128,130).

Outro teste a ser usado para mensuração da dor é o *Cold Pressor Task* (CPT), um teste de “pressão ao frio”, utilizado como uma medida experimental de dor, documentada por Wolf e Hardy há mais de meio século (131). Sua aplicação envolve imersão da mão do indivíduo em um recipiente contendo água fria, com temperatura constante e usualmente entre 0 e 2°C, durante 60-120 segundos (131). A duração que a mão permanecerá em contato com a água fria é controlada por meio de um cronômetro, podendo ser igual ao nível de tolerância do indivíduo ou previamente determinado pelo aplicador da técnica. Cabe salientar a importância de atentar-se ao tempo máximo de permanência com a mão submersa, uma vez que

temperaturas muito baixas podem provocar queimaduras na pele (132).

Na literatura existem distintos protocolos para o uso de diferentes temperaturas, que variam entre crianças, adultos e idosos e também de acordo com a proposta de cada estudo. O bom posicionamento do indivíduo, a utilização de um suporte no membro que será testado, bem como a temperatura ambiente agradável, são fatores que diminuem possíveis erros durante a execução da técnica (131,133).

Através do CPT é possível verificar uma multiplicidade de medidas relacionadas à dor, incluindo limiar de dor, tolerância, classificações de intensidade de dor, além de respostas autonômicas/cardiovasculares. Durante o CPT, estão envolvidas diferentes aferências, como: canais específicos ao frio, fibras A δ cutâneas, nociceptores vasculares, cutâneos e nociceptores C perivasculares (133).

2.3.2 Marcadores biológicos de plasticidade associados à dor

Diversas moléculas têm sido relacionadas ao processamento da dor, entre elas o fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* - BDNF) e a S100 β , considerados potenciais marcadores de neuroplasticidade (134,135).

O BDNF faz parte da classe de neurotrofinas relacionadas aos fatores de crescimento, que modula sinapses, influencia a eficiência sináptica de curto e longo prazos e modula sinais rápidos de excitação (glutamatérgicos) e inibição (GABAérgicos e glicinérgicos) e faz neurotransmissões peptidérgicas lentas na medula espinal (136). A maioria das ações celulares do BDNF são mediadas por seu receptor de alta afinidade, o receptor proteína-tirosina quinase B (*Tropomyosine Receptor Kinase B* – trkB), abundante durante o desenvolvimento, e amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) de animais

adultos, sugerindo um papel contínuo para BDNF durante diferentes fases da vida (136).

Um dos papéis do BDNF parece ser a modulação central de dor. Esta neurotrofina é uma importante moduladora da neurotransmissão sensorial nas vias nociceptivas, tanto em nível da coluna vertebral quanto supraespinal (136). Também atua como um regulador chave da plasticidade sináptica na região periférica e no sistema nervoso central (SNC), o que, na dor aguda, parece ter função adaptativa aumentando a excitabilidade e tendo assim um papel de proteção; no entanto, quando há presença de dor crônica, seu aumento torna-se mal-adaptativo (137). O aumento dos níveis de BDNF são observados em síndromes de dor crônica (135), além disso, ele tem um efeito facilitador no limiar da dor em mulheres, que não observa-se nos homens. Este fato apoia a noção de que o BDNF é um modificador de efeito quando o sexo é considerado no limiar da dor em indivíduos saudáveis (135).

Além disso, no contexto da sensibilização central (SC), presente em pacientes com dor crônica, as células microgliais ativadas por astrócitos também podem liberar BDNF (138). Além disso, na fibromialgia, descobriu-se que ambos os mediadores chave da neuroglia no processo da SC (BDNF e S100- β) estavam inversamente correlacionados com o limiar de dor à pressão (134).

A proteína S100 β (S100 beta) é uma substância que desempenha um papel essencial no metabolismo energético, na regulação do ciclo, crescimento, diferenciação e na motilidade celulares (139). Essa proteína está relacionada aos mecanismos de dor crônica, e um dos mecanismos envolvidos nesse processo é a liberação de substâncias pró-inflamatórias por meio da ativação das células gliais (140,141) que, quando ativadas, regulam positivamente marcadores celulares específicos e liberam substâncias envolvidas na amplificação da dor (142). Dependendo da concentração, a S100 β exerce efeitos tróficos ou tóxicos; quando em mínimas concentrações, ela estimula o crescimento neuronal, aumenta a sobrevivência dos

neurônios durante o desenvolvimento, age como fator neurotrófico e como proteína de sobrevivência neuronal, em resposta à ativação glial secundária à lesão. Quando em altas concentrações, ela acentua a neuroinflamação e a disfunção neuronal, além de estimular as citocinas pró-inflamatórias e induzir a apoptose (140).

2.4 Estimulação transcraniana de corrente contínua (ETCC)

A Estimulação transcraniana por corrente contínua é um método de estimulação cerebral não invasiva capaz de modular a excitabilidade cortical (143,144) utilizando uma corrente elétrica contínua e de baixa intensidade (0,5-2 mA) diretamente para o couro cabeludo na área cerebral de interesse, por meio de eletrodos de esponja embebidos com soro fisiológico ou eletrodos de borracha com gel condutor (145,146). A ETCC tem sido utilizada para a modulação da excitabilidade cortical, que ocorre em áreas próximas aos eletrodos (147). Dentre os efeitos da ETCC, a sua capacidade de modular o potencial transmembrana neuronal, influenciando sua excitabilidade, é dependente da polaridade específica dos eletrodos (148). Por convenção, definiu-se que quando o ânodo é colocado sobre a área a ser modulada, a estimulação é chamada de anódica, em contrapartida, quando o cátodo é colocado, o estímulo é catódico (148). O estímulo anódico aumenta a excitabilidade, enquanto o estímulo catódico causa hiperpolarização, reduzindo a excitabilidade da membrana neuronal (147,149,150).

O posicionamento do eletrodo é crítico para a determinação do fluxo de corrente e, com isso, essencial para a eficácia do tratamento (151,152), pois os efeitos da ETCC são dependentes da posição e tamanho dos eletrodos, bem como da duração e intensidade do estímulo elétrico (153). O efeito tende a ser cumulativo e induzido por sessões repetidas (147,154,155), estando vinculado à neuroplasticidade da transmissão sináptica, tais como a

potenciação de longa duração (LTP), com aumento do processo de facilitação; ou depressão de longa duração (LTD), com decréscimo no potencial de transmissão sináptica (147). A LTP e a LTD expressam o envolvimento dos sistemas glutamatérgico e gabérgico, respectivamente.

Uma das montagens bem estabelecidas para estudo com indivíduos saudáveis é a colocação do eletrodo ânodo sobre o córtex motor primário (M1) e o cátodo sobre a região supraorbital contralateral, o que promove um efeito de aumento de excitabilidade cortical (156,157). Diversas pesquisas foram realizadas com inversão de polaridade, variação no tamanho dos eletrodos, tempos de estimulação distintos e diferentes amplitudes de corrente (de 0,2 a 2 mA) (148,158), além de uso em sessão única ou uso com variada quantidade de sessões (159,160), tanto para indivíduos saudáveis quanto para pacientes (161–163) tendo diversos resultados. Em parte, os experimentos com ETCC datados do final da década de 1980 até hoje, focaram em esclarecer os mecanismos de ação desta técnica (164–166), estabelecer critérios de segurança e *guidelines* confiáveis (167–172), bem como definir quais condições clínicas respondem a essa técnica (173–175) e quais resultados podem ser esperados (176,177).

Embora as pesquisas sobre a ETCC estejam em constante crescimento, são escassos os estudos que avaliam os efeitos da técnica quando realizada em diferentes horários do dia ou relacionando-os à preferência circadiana. A maioria das pesquisas que estudam a variabilidade inter- e intra-sujeito nas respostas terapêuticas tenta explicar a variação dos resultados terapêuticos encontrados, sem, no entanto, os relacionar diretamente com a cronobiologia (134,178–181).

Entretanto, sabe-se que diferentes estados fisiológicos podem afetar a resposta à

ETCC, até mesmo no mesmo indivíduo. Alguns estudos avaliaram a resposta da ETCC nesses diferentes estados, tais como o fechar e abrir os olhos ou durante o sono (178). Por exemplo, a diferença nos estados fisiológicos entre “olhos abertos” e “olhos fechados” durante a aplicação da técnica de ETCC aumentou as ondas α avaliadas por eletroencefalografia (EEG) (182). Além disso, em um estudo em que a ETCC foi aplicada durante o sono, houve uma melhoria na memória declarativa, sendo este momento considerado um importante estado cerebral para a consolidação desse tipo de memória (183,184). Por fim, o cortisol sérico, que mostra variações circadianas ao longo do dia, é relacionado ao impacto na função cerebral e na neuroplasticidade (185). Recentemente, demonstrou-se que os níveis de cortisol influenciam a neuroplasticidade induzida por estimulação magnética transcraniana (TMS), sendo que níveis mais altos de cortisol podem prever uma maior resposta a um protocolo de TMS repetitiva (186). Na verdade, os estudos de TMS normalmente prestaram atenção especial aos sujeitos testados em momentos semelhantes e isso pode ser uma consideração que também é importante para a plasticidade mediada pela ETCC (178).

Por fim, o uso da ETCC para tratamento de transtornos do sono (187,188) é uma ferramenta que tem o potencial de modular o estado cortical devido em parte aos seus efeitos sobre a atividade cortical e excitabilidade no estado de vigília (189). É possível que pesquisas que envolvam o tratamento de transtornos do sono, passem a avaliar o horário de aplicação da técnica como um fator preditivo de respostas (190).

Uma pesquisa conduzida por Kim, *et al* (2017) com ratos jovens mostrou que a ETCC anódica repetida sobre o córtex sensório-motor direito com eletrodo circular (3 mm de diâmetro) a 250 μ A por 20 min por dia durante 7 dias consecutivos induziu um aumento duradouro da excitabilidade cortical que pode aumentar a transcrição dos genes relacionados à plasticidade neuronal. Nesse estudo, foi avaliado em especial o mRNA do BDNF e os

resultados indicaram que a expressão alterada de genes associados à plasticidade no córtex e no hipocampo é um substrato molecular da plasticidade neural induzida por ETCC anódica (160,191).

Como os principais mecanismos envolvidos nos efeitos da ETCC são a mudança no potencial de repouso da membrana e a indução de plasticidade sináptica (192), uma forma de estudar os efeitos dessa técnica é analisar as variações na excitabilidade cortical, que podem ser mensuradas por meio da TMS, na região do córtex motor primário (M1) (149,193).

2.4.1 Avaliação da Excitabilidade Cortical

A excitabilidade cortical reflete o estado da circuitaria cortical por meio da reatividade dos neurônios e da especificidade da resposta dos neurônios corticais a uma estimulação dada e, portanto, é um aspecto fundamental da função cerebral humana (194,195). Para a realização da avaliação da excitabilidade cortical é necessário o uso do equipamento de estimulação magnética transcraniana (TMS) com eletromiógrafo acoplado. O indivíduo deve sentar-se confortavelmente e em seguida, devem ser colocados eletrodos de eletromiografia (EMG) sobre o músculo primeiro interósseo dorsal (FDI – do inglês *first dorsal interosseous*). Posiciona-se a bobina estimulatória da TMS sobre o M1, após a varredura da região e localização do córtex motor primário (Figura 8).

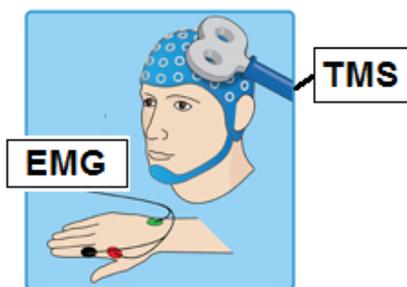


Figura 8: Posicionamento da bobina e eletrodos da TMS. Adaptado de (196).

O primeiro passo é a avaliação do limiar motor (MT), que consiste na varredura do córtex motor primário com a TMS sincronizada ao EMG, aplicando estímulo fixo e localizando o ponto com maior resposta do músculo FDI da mão direita a partir do registro obtido pelo EMG. Após, reduz-se gradativamente a intensidade dos estímulos sobre a mesma área. O MT será definido como a menor intensidade de estímulo capaz de produzir um potencial evocado motor de $50\mu\text{v}$ registrado pelo EMG em 10 estímulos (197). Para a avaliação do Potencial evocado motor (MEP) são feitos 10 estímulos magnéticos com intensidade de 130% do MT. O MEP será considerado a média aritmética da amplitude da onda registrada pelo EMG (197) (Figura 9).

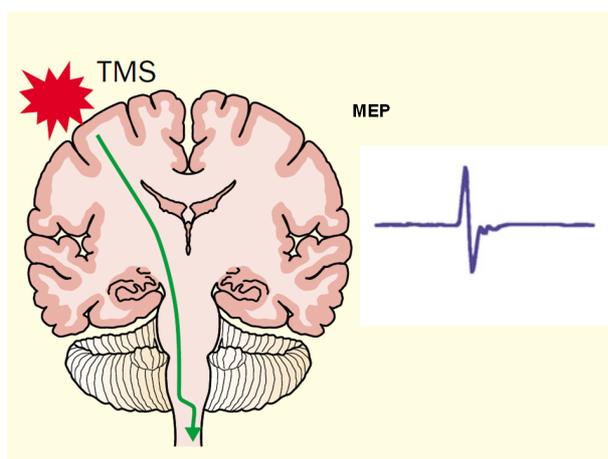


Figura 9: Potencial Evocado Motor (MEP). A figura mostra o potencial evocado motor (MEP) obtido por meio da estimulação magnética transcraniana (TMS). Fonte: Adaptado de (197).

O fator crucial para a excitabilidade cortical e a função básica do cérebro em geral é o equilíbrio entre a rítmica circadiana e a necessidade do sono. A vigília prolongada aumenta progressivamente a excitabilidade cortical (194,195). Além disso, a função e estrutura sináptica têm sido relacionadas como circadiana dependentes (195,198,199) e a excitabilidade corticoespinal, avaliada por TMS, pode relacionar-se com o cronotipo (200) e sofrer influência do horário do dia, independente do tempo de sono (201). Segundo pesquisas

envolvendo a excitabilidade cortical e aspectos do sono, a privação do sono não tem efeito (202) nem diminui a excitabilidade corticoespinal (203), no entanto aumentou a excitabilidade somatossensorial (204). Esses dados não estão estabelecidos de forma conclusiva e há uma controvérsia se a excitabilidade cortical, assim como outros aspectos da função cerebral, é modulada tanto pelo tempo acordado quanto pela fase circadiana (195).

2.4.2 Desenvolvimento e validação de equipamento de ETCC para uso domiciliar

Uma possibilidade terapêutica com boa perspectiva futura para a realização de ensaios clínicos com maior número de pacientes, em que a alocação do horário da aplicação da ETCC seja definida de acordo com marcadores associados à ritmicidade circadiana, tais como o horário de preferência circadiana, é o uso da ETCC domiciliar. Em muitos casos, o uso dessa terapia em longo prazo torna-se impraticável para muitos pacientes com doenças crônicas, uma vez que exige o deslocamento para consultórios ou hospitais, mais de uma vez por semana, retirando-o de suas atividades e tendo um alto custo com deslocamento e sobrecarga do sistema de saúde, que já está sobrecarregado. Em contraste, pesquisas mostram que o efeito da ETCC é cumulativo, exigindo sessões consecutivas por longos períodos de tempo (147,154,155,205).

Por ser uma técnica de baixo custo, com poucos efeitos adversos e de fácil manuseio, a ETCC tornou-se uma alternativa viável para o uso domiciliar, permitindo assim a manutenção do benefício observado em estudos com uso frequente e supervisionado realizado em centros de atendimento (155,171,206). Além disso, o uso domiciliar possibilita o desenho de estudos de longo prazo para avaliar o efeito cumulativo da estimulação com amostras maiores e com a combinação de ETCC com técnicas de reabilitação (206).

Uma das preocupações com o uso da ETCC domiciliar é a impedância de contato eletrodo-pele, que é uma variável importante para garantir a segurança da utilização, bem como certificar-se dos efeitos esperados da técnica (169). Uma elevada impedância pode estar relacionada a mau acoplamento entre o eletrodo e a pele ou ressecamento do eletrodo, situações que podem aumentar a densidade de corrente e provocar lesões cutâneas (207).

Outra questão importante no desenvolvimento de equipamentos domiciliares é a possibilidade de uso indiscriminado da técnica, que deve ser levada em consideração ainda na concepção do aparelho. O uso inadequado envolve a repetição de mais de uma sessão ao dia, falta de critérios de utilização e a dependência a indivíduos não treinados. Todos esses fatores podem representar um perigo real para o uso da técnica, em especial a não reprodutibilidade dos resultados encontrados, o que torna difícil comparar resultados em ensaios clínicos (206) e pode gerar transtornos e lesões aos pacientes. Por isso, a utilização domiciliar de equipamentos projetados exclusivamente para esse fim é fundamental e um *guideline* foi estruturado pensando na minimização desses problemas (155,208).

As pesquisas recentes que abordam o desenvolvimento de ETCC domiciliar trazem propostas que envolvem no geral: 1) uma avaliação basal com treino de aplicação da técnica no centro aplicador, 2) uma ou duas visitas do pesquisador no domicílio do participante para observação do uso da técnica, 3) assistência remota instantânea, em que o participante entra em contato com o centro aplicador via internet em tempo real (com computador cedido pela pesquisa) e assim, é fornecido um código que liberará a sessão, 4) avaliação final e devolução do equipamento (155,167,171,206,209,210).

Além disso, a gestão fácil e o baixo custo dos equipamentos de ETCC permitem o uso doméstico pelo paciente, mas isso pode aumentar as preocupações éticas e legais em relação ao uso potencial ou ao uso excessivo. Em função disso, é necessário ter o cuidado de evitar

aplicações inadequadas desta técnica, assegurando o treinamento rigoroso dos profissionais e a educação dos pacientes (211), além de o equipamento ser protegido por estratégias de segurança que não permitam o mau uso.

Pesquisas dessa natureza envolvem realidades distintas de cada país. Assim sendo, uma alternativa de utilização de equipamento domiciliar criada e desenvolvida no Brasil foi proposta. Para isso, três etapas devem ser seguidas: 1) é feita uma visita ao centro aplicador para avaliação basal, de critérios de elegibilidade e treinamento da técnica (figura 10A); 2) uso do equipamento domiciliar e controle de local adequado de uso em ambiente tranquilo (Figura 10B); 3) anotações dos efeitos adversos apresentados durante e após cada sessão e contato permanente com os responsáveis pela pesquisa a qualquer momento do dia, para esclarecimento de dúvidas ou para reportar qualquer mau funcionamento do equipamento (Figura 10C).

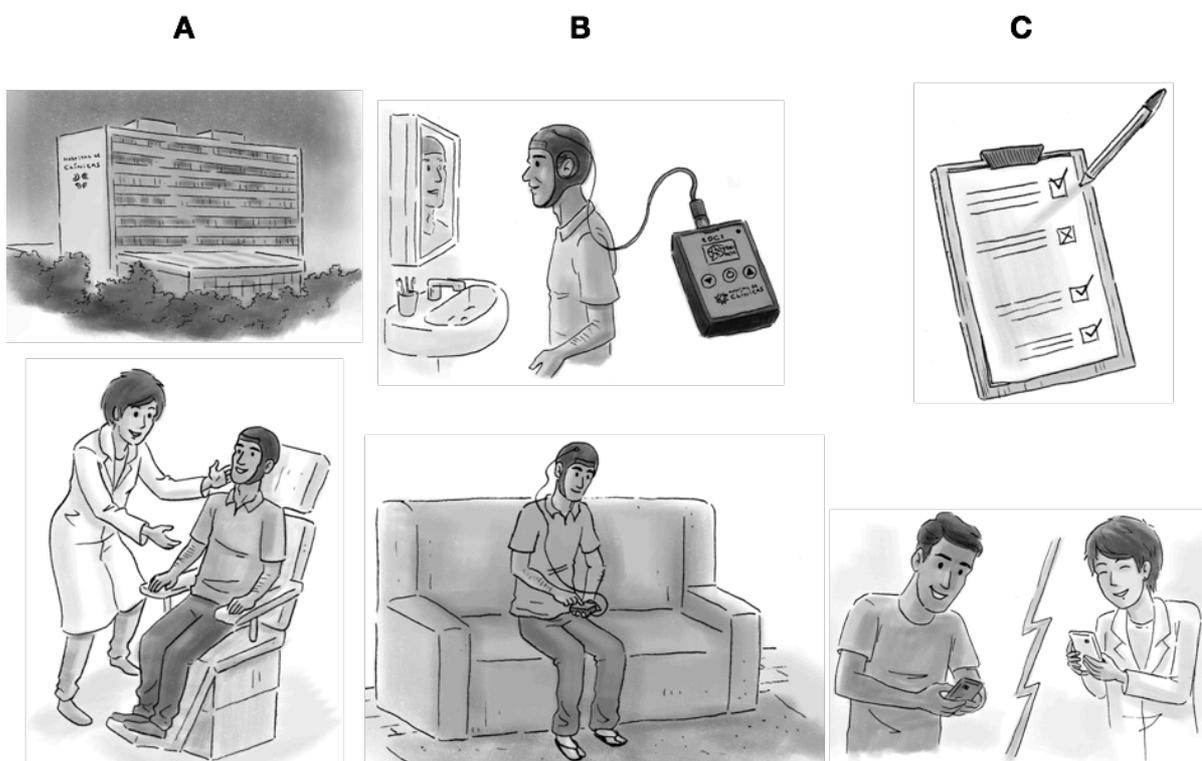


Figura 10: Etapas propostas para a utilização de ETCC domiciliar. (A) Avaliações basais. (B) Uso domiciliar. (C) Anotações e contatos diários com pesquisadores. Fonte: a autora.

3. MARCO CONCEITUAL

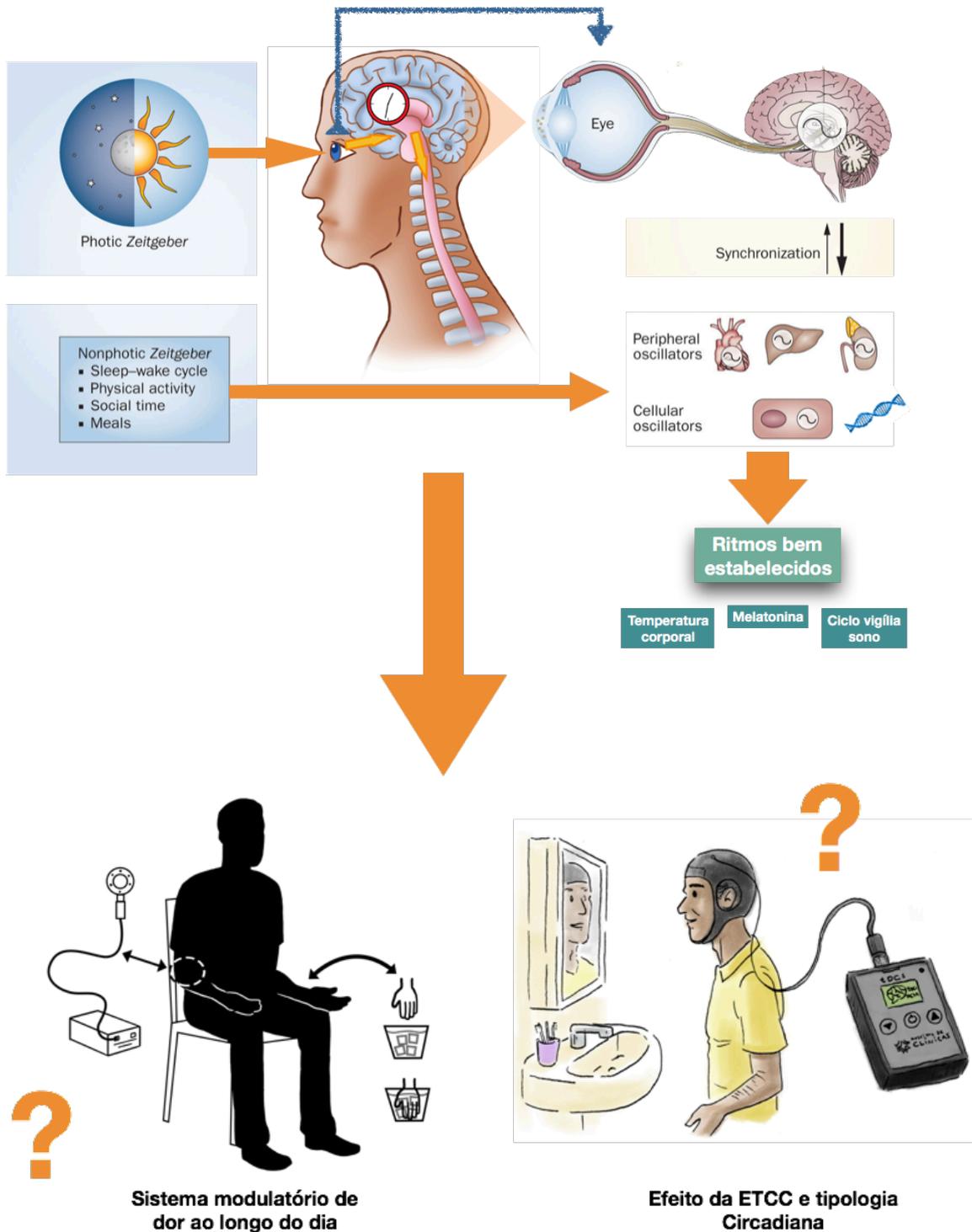


Figura 11: Marco conceitual. Relação da tipologia circadiana, do sistema modulatório descendente da dor e a resposta ao uso da ETCC domiciliar

4. JUSTIFICATIVA

Embora o conhecimento entre as características circadianas fenotípica e dos genes-relógio tenha avançado, é necessária a realização de estudos adicionais para compreender de que maneira estes fatores se relacionam ao processamento da dor e a respostas terapêuticas, especialmente as técnicas de NIBS. Como se pode observar a partir do referencial teórico apresentado e, considerando a relação entre as funções biológicas e a tipologia circadiana, este estudo justifica-se especialmente pelo seu objetivo principal de avaliar como a tipologia circadiana, o *jet lag* social e o gene relógio *PER3* se relacionam com a excitabilidade cortical, com marcadores de neuroplasticidade como a modulação descendente da dor e com o BDNF.

Além disso, as técnicas neuromodulatórias, em especial a ETCC, poderiam ter seus efeitos de neuroplasticidade afetados de acordo com o horário circadiano preferido, o que ainda não foi estudado até o presente momento. Ao se pensar em individualização de tratamentos de maneira a atender às demandas da terapia individualizada, é evidente que a ritmicidade circadiana é um marcador central para orientar a alocação do tratamento de maneira particularizada. Portanto, é fundamental compreender como as variações circadianas se relacionam com as funções fisiológicas e fisiopatológicas ao longo do dia, as quais ainda não foram suficientemente empreendidas para os tratamentos não-farmacológicos, em especial à NIBS (8). Então é plausível argumentar que uma modulação externa da atividade cortical pode ser adequada para afetar alterações específicas, incluindo a sincronização neural e a conectividade funcional. Deve-se considerar que a resposta e o efeito dos métodos de neuromodulação farmacológica ou não farmacológica são mediados por processos de neuroplasticidade, o que justifica a realização dos estudos propostos.

Por fim, o desenvolvimento de um equipamento de ETCC a domicílio justifica-se nesta pesquisa, pois permite que o indivíduo aplique a estimulação no horário mais confortável. Se a hora de uso estiver relacionada ao efeito da ETCC, o uso em casa permite que o sujeito aplique a estimulação na hora do dia em que geraria melhores resultados e, nem sempre esses horários são fáceis de serem manejados em pesquisas, especialmente nas de longo prazo. O desenvolvimento desse equipamento, por conseguinte, ampliará a possibilidade de protocolos de pesquisa nas áreas de Cronobiologia e Neuromodulação, o que poderá ampliar no futuro o incremento de terapias cada vez mais individualizadas e mais direcionais.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

A presente tese teve como finalidade investigar como a tipologia circadiana, o *jet lag* social e o gene relógio *PER3* se relacionam com a excitabilidade cortical, com marcadores de neuroplasticidade como a modulação descendente da dor, o BDNF e S100- β . Sobretudo, investigou-se a relação entre a tipologia circadiana e o efeito da ETCC aplicada em domicílio.

5.2 Objetivos secundários

Para responder ao objetivo geral desta tese desenvolveram-se quatro estudos, cujos objetivos são os que seguem:

Estudo 1. Avaliar a interação entre fatores geográficos associados à latitude, parâmetros circadianos e sono. Para responder a esta questão, foram avaliados o polimorfismo do gene *PER3*, parâmetros do sono e variáveis do ritmo circadiano de indivíduos residentes em três diferentes latitudes do Brasil.

Estudo 2. Avaliar a variação do sistema modulador descendente de dor pela alteração na escala numérica de dor (NPS 0-10) durante a tarefa de modulação de dor condicionada (CPM-task) entre os polimorfismos do gene relógio *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5}. Além disso, avaliou-se a relação desses genes com as medidas da dor [limiar de dor ao calor, tolerância à dor, *cold pressor task* (CPT)], S-100- β e BDNF.

Estudo 3. Avaliar o efeito de 10 sessões de estimulação transcraniana de corrente contínua (ETCC) de uso domiciliar, tanto no potencial evocado motor (MEP) quanto no Fator

Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), de acordo com a tipologia circadiana (matutinos ou vespertinos) determinada pelo Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ).

Estudo 4. Avaliar a adesão e impedância de contato como medidas de factibilidade do equipamento de ETCC domiciliar, nos seguintes desfechos:

- Controle de adesão das sessões propostas;
- Valores de impedância de contato do equipamento;
- Presença de efeitos adversos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dijk DJ, Archer SN. PERIOD3, circadian phenotypes, and sleep homeostasis. *Sleep Med Rev.* 2010;14(3):151–60.
2. Hida A, Kitamura S, Katayose Y, Kato M, Ono H, Kadotani H, et al. Screening of Clock Gene Polymorphisms Demonstrates Association of a PER3 Polymorphism with Morningness–Eveningness Preference and Circadian Rhythm Sleep Disorder. *Sci Rep.* 2015;4(1):6309.
3. Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA, et al. Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep.* 2005/02/11. 2005;28(1):29–32.
4. Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J, et al. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep.* 2003 Jun;26(4):413–5.
5. Jankowski KS. Morning types are less sensitive to pain than evening types all day long. *Eur J Pain (United Kingdom).* 2013;17(7):1068–73.
6. Adan A, Archer SN, Hidalgo MP, Di Milia L, Natale V, Randler C. Circadian Typology: A Comprehensive Review. *Chronobiol Int.* 2012;29(9):1153–75.
7. Nitsche MA, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology.* 2001;57(10):1899–901.
8. Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N, Hamdan A. Molecular basis of chronopharmaceutics. Vol. 100, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2011. p. 3560–76.
9. Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, et al. Epidemiology of the human circadian clock. Vol. 11, *Sleep Medicine Reviews.* 2007. p. 429–38.
10. Menna-Barreto L, Díez-Noguera A. External temporal organization in biological rhythms. *Biol Rhythm Res.* 2012;43(1):3–14.
11. Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet.* 2008;9(10):764–75.
12. Tankova I, Adan A, Buela-Casal G. Circadian typology and individual differences. A review. *Pers Individ Dif.* 1994;16(5):671–84.
13. Aschoff J, Fatranska M, Giedke H, Doerr P, Stamm D, Wisser H. Human circadian rhythms in continuous darkness: Entrainment by social cues. *Science (80-).* 1971;171(3967):213–5.
14. Czeisler CA, Kronauer RE, Allan JS, Duffy JF, Jewett ME, Brown EN, et al. Bright light induction of strong (type 0) resetting of the human circadian pacemaker. *Science (80-).* 1989;244(4910):1328–33.
15. Dijk DJ, Visscher CA, Bloem GM, Beersma DG, Daan S. Reduction of human sleep duration after bright light exposure in the morning. *Neurosci Lett.* 1987 Jan;73(2):181–

- 6.
16. Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*. 2000 Jan;20(2):600–5.
17. Smolensky MH, Sackett-Lundeen LL, Portaluppi F. Nocturnal light pollution and underexposure to daytime sunlight: Complementary mechanisms of circadian disruption and related diseases. *Chronobiol Int*. 2015 Sep;1–20.
18. Thorne HC, Jones KH, Peters SP, Archer SN, Dijk D-J. Daily and Seasonal Variation in the Spectral Composition of Light Exposure in Humans. *Chronobiol Int*. 2009 Jan;26(5):854–66.
19. Miguel M, Oliveira V, Pereira D, Pedrazzoli M. Detecting chronotype differences associated to latitude: a comparison between Horne-Östberg and Munich Chronotype questionnaires. *Ann Hum Biol*. 2014;41(2):105–8.
20. Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA, et al. Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep*. 2005;28:29–32.
21. Ohdo S. Chronopharmacology Focused on Biological Clock. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2007;22(1):3–14.
22. Gibertini M, Graham C, Cook MR. Self-report of circadian type reflects the phase of the melatonin rhythm. *Biol Psychol*. 1999;50(1):19–33.
23. Duffy JF, Dijk DJ, Hall EF, Czeisler CA. Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. Vol. 47, *J Investig Med*. 1999. p. 141–50.
24. Valdez P, Ramirez C, Garcia A. Circadian rhythms in cognitive performance: implications for neuropsychological assessment. *ChronoPhysiology Ther*. 2012;2:81–92.
25. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Mellow M. Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *J Biol Rhythms*. 2003;18(1):80–90.
26. Roenneberg T. What is chronotype? *Sleep and Biological Rhythms*. 2012;10(2):75–6.
27. Monk TH, Buysse DJ, Potts JM, DeGrazia JM, Kupfer DJ. Morningness-eveningness and lifestyle regularity. *Chronobiol Int*. 2004;21(3):435–43.
28. Liu X, Uchiyama M, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Tagaya H, et al. Diurnal preference, sleep habits, circadian sleep propensity and melatonin rhythm in healthy human subjects. *Neurosci Lett*. 2000;280(3):199–202.
29. Buresova M, Dvorakova M, Zvolsky P, Illnerova H. Early morning bright light phase advances the human circadian pacemaker within one day. *Neurosci Lett*. 1991;121:47–50.
30. Horne J a., Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. Vol. 4, *Int J Chronobiol*. 1976. p. 97–110.
31. Benedito-Silva AA, Menna-Barreto L, Marques N, Tenreiro S. A self-assessment for the determination of morningness–eveningness types in Brazil. Vol. 341B, *Chronobiology: it’s role in clinical medicine, general biology, and agriculture*. 1990.

89-98 p.

32. Levandovski R, Sasso E, Hidalgo MP. Chronotype: a review of the advances, limits and applicability of the main instruments used in the literature to assess human phenotype. *Trends psychiatry Psychother.* 2013;35(1):3–11.
33. Toh KL. An hPer2 Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome. *Science (80-)*. 2001;291(5506):1040–3.
34. Vink JM, Vink JM, Groot AS, Kerkhof GA, Boomsma DI. Genetic Analysis of Morningness and Eveningness. *Chronobiol Int.* 2001;18(5):809–22.
35. Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J, et al. A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep.* 2003;26(4):413–5.
36. Adan A, Natale V. Gender Differences in Morningness–Eveningness Preference. *Chronobiol Int.* 2002;19(4):709–20.
37. Daneault V, Vandewalle G, Najjar R, Mongrain V, Dumont M, Hébert M, et al. Age-related changes in circadian rhythms during adulthood. Vol. 3, *The Encyclopedia of Sleep.* Elsevier Inc.; 2013. 113-117 p.
38. Carskadon MA, Labyak SE, Acebo C, Seifer R. Intrinsic circadian period of adolescent humans measured in conditions of forced desynchrony. Vol. 260, *Neuroscience Letters.* 1999. p. 129–32.
39. Dijk D-J, Duffy JF, Czeisler CA. Contribution of Circadian Physiology and Sleep Homeostasis To Age-Related Changes in Human Sleep. *Chronobiol Int.* 2000;17(3):285–311.
40. Duffy JF, Czeisler CA. Age-related change in the relationship between circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans. *Neurosci Lett.* 2002;318(3):117–20.
41. Roenneberg T, Merrow M. The network of time: understanding the molecular circadian system. *CurrBiol.* 2003;13(0960–9822 (Print)):R198–207.
42. Roenneberg T, Merrow M. Entrainment of the human circadian clock. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 2007. p. 293–9.
43. Valdez P, Ramírez C, García a, Ramírez C, Garcia A. Delaying and extending sleep during weekends: sleep recovery or circadian effect? *Chronobiol Int.* 1996;13(3):191–8.
44. Wittmann M, Dinich J, Merrow M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int.* 2006;23(1–2):497–509.
45. Banks S, Dinges DF. Behavioral and physiological consequences of sleep restriction. *J Clin Sleep Med.* 2007;3(5):519–28.
46. Monk TH, Buysse DJ, Rose LR, Hall J a, Kupfer DJ. The sleep of healthy people--a diary study. *Chronobiol Int.* 2000;17(1):49–60.
47. Aschoff J. Circadian Rhythms in Man. *Science (80-)*. 1965;148(3676):1427–32.
48. Aschoff J, Wever R. Human circadian rhythms: a multioscillatory system. *Fed Proc.*

- 1976;35(12):232–6.
49. Aschoff J. Circadian systems in man and their implications. *Hosp Pract.* 1976;11(5):51–97.
 50. Fuller PM, Gooley JJ, Saper CB. Neurobiology of the Sleep-Wake Cycle: Sleep Architecture, Circadian Regulation, and Regulatory Feedback. *J Biol Rhythms.* 2006;21(6):482–93.
 51. Archer SN, Carpen JD, Gibson M, Lim GH, Johnston JD, Skene DJ, et al. Polymorphism in the PER3 promoter associates with diurnal preference and delayed sleep phase disorder. *Sleep.* 2010;33(5):695–701.
 52. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. 1972;69(6):1583–6.
 53. Moore, Robert Y; Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42, 201–206. 1972;42:201–6.
 54. Buttgereit F, Smolen JS, Coogan AN, Cajochen C. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(6):349–56.
 55. Benca R, Duncan MJ, Frank E, McClung C, Nelson RJ, Vicentic A. Biological rhythms, higher brain function, and behavior: Gaps, opportunities, and challenges. *Brain Res Rev.* 2009;62(1):57–70.
 56. Benarroch EE. Locus coeruleus. *Cell Tissue Res.* 2017;
 57. Aston-Jones G, Chen S, Zhu Y, Oshinsky ML. A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci.* 2001;4(7):732–8.
 58. Gonzalez MMC, Aston-Jones G. Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(12):4898–903.
 59. Chaudhury D, Wang LM, Colwell CS. Circadian Regulation of Hippocampal Long-Term Potentiation. *June.* 2005;28(2):225–36.
 60. Lowrey PL. Positional Syntenic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation tau. *Science (80-).* 2000;288(5465):483–91.
 61. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell.* 2002;110(2):251–60.
 62. Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature.* 2002;419(6909):841–4.
 63. Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whiteley A, et al. Mammalian circadian autoregulatory loop: A timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron.* 1998;21(5):1101–13.
 64. Shafer OT, Levine JD, Truman JW, Hall JC. Flies by night: Effects of changing day length on *Drosophila*'s circadian clock. *Curr Biol.* 2004;14(5):424–32.

65. Smith MT, Haythornthwaite JA. How do sleep disturbance and chronic pain interrelate? Insights from the longitudinal and cognitive-behavioral clinical trials literature. Vol. 8, *Sleep Medicine Reviews*. 2004. p. 119–32.
66. Benca R. Sleep in Psychiatric Disorders. *Neurol Clin*. 1996;14(4).
67. Mansour HA, Wood J, Logue T, Chowdari K V., Dayal M, Kupfer DJ, et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes, Brain Behav*. 2006;5(2):150–7.
68. Viola AU, Archer SN, James LM, Groeger JA, Lo JCY, Skene DJ, et al. PER3 Polymorphism Predicts Sleep Structure and Waking Performance. *Curr Biol*. 2007;17(7):613–8.
69. Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M, et al. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep*. 2001;2(4):342–6.
70. Jones KHS, Ellis J, Von Schantz M, Skene DJ, Dijk DJ, Archer SN. Age-related change in the association between a polymorphism in the PER3 gene and preferred timing of sleep and waking activities. *J Sleep Res*. 2007;16(1):12–6.
71. Chellappa SL, Viola AU, Schmidt C, Bachmann V, Gabel V, Maire M, et al. Human melatonin and alerting response to blue-enriched light depend on a polymorphism in the clock gene PER3. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Mar;97(3):E433-7.
72. King AC, Belenky G, Van Dongen HP. Performance impairment consequent to sleep loss: determinants of resistance and susceptibility. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15(6):559–64.
73. Van Dongen HPA, Maislin G, Mullington JM, Dinges DF. The Cumulative Cost of Additional Wakefulness: Dose-Response Effects on Neurobehavioral Functions and Sleep Physiology From Chronic Sleep Restriction and Total Sleep Deprivation. *Sleep*. 2003;26(2):117–26.
74. Dinges JDF, Pack F, Williams K, Gillen KA, Powell JW, Ott GE, et al. Cumulative Sleepiness, Mood Disturbance, and Psychomotor Vigilance Performance Decrements During a Week of Sleep Restricted to 4–5 Hours per Night. *Sleep*. 1997;20(September):267–77.
75. Scheer FAJL, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(11):4453–8.
76. Vieira WS, Hidalgo MPL, Torres IDSL, Caumo W. Biological rhythms of spinal-epidural labor analgesia. *Chronobiol Int*. 2010;27(4):865–78.
77. Frange C, Hachul H, Tufik S, Andersen ML. Circadian rhythms, insomnia and osteoarthritis pain. *Chronobiol Int*. 2015;32(9):1323–4.
78. Finan PH, Goodin BR, Smith MT. The association of sleep and pain: An update and a path forward. Vol. 14, *Journal of Pain*. 2013. p. 1539–52.
79. Tang NKY, Goodchild CE, Sanborn AN, Howard J, Salkovskis PM. Deciphering the temporal link between pain and sleep in a heterogeneous chronic pain patient sample: A multilevel daily process study. *Sleep*. 2012;35(5):675–87A.

80. Parmelee PA, Tighe CA, Dautovich ND. Sleep disturbance in osteoarthritis: Linkages with pain, disability, and depressive symptoms. *Arthritis Care Res.* 2015;67(3):358–65.
81. Silva A, Andersen ML, Tufik S. Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain.* 2008;140(3):446–55.
82. Pickering ME, Chapurlat R, Kocher L, Peter-Derex L. Sleep Disturbances and Osteoarthritis. Vol. 16, *Pain Practice.* 2016. p. 237–44.
83. Wood PB, Glabus MF, Simpson R, Patterson JC. Changes in Gray Matter Density in Fibromyalgia: Correlation With Dopamine Metabolism. *J Pain.* 2009;10(6):609–18.
84. Mahdi AA, Fatima G, Das SK, Verma NS. Abnormality of circadian rhythm of serum melatonin and other biochemical parameters in fibromyalgia syndrome. *Indian J Biochem Biophys.* 2011;48(2):82–7.
85. Levandovski R, Dantas G, Fernandes LC, Caumo W, Torres I, Roenneberg T, et al. Depression Scores Associate With Chronotype and Social Jetlag in a Rural Population. *Chronobiol Int.* 2011;28(9):771–8.
86. Raja SN, Hoot MR, Dougherty PM. Chapter 1 - Anatomy and physiology of somatosensory and pain processing. Third Edit. *Essentials of Pain Medicine (Third Edition).* Elsevier Inc.; 2011. 1-7 p.
87. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. Vol. 55, *Neuron.* 2007. p. 353–64.
88. Williams AC de C, Craig KD. Updating the definition of pain. *Pain.* 2016;157(11):2420–3.
89. Julius D. Molecular mechanisms of nociception . *Nature.* 2001;413(September):203–10.
90. Arcourt A, Lechner SG. Peripheral and spinal circuits involved in mechanical allodynia. *Pain.* 2015;156(2):220–1.
91. Yaksh TL. Dynamics of the Pain Processing System. Second Edi. Vol. 1, *Pain Management.* Elsevier Inc.; 2006. 21-32 p.
92. Sandkuhler J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiol Rev.* 2009;89(2):707–58.
93. Schnitzler A, Ploner M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *J Clin Neurophysiol.* 2000;17(6):592–603.
94. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. Vol. 1000, *Brain Research.* 2004. p. 40–56.
95. Price DD, Greenspan JD, Dubner R. Neurons involved in the exteroceptive function of pain. Vol. 106, *Pain.* 2003. p. 215–9.
96. Mense S. Muscle Pain: Understanding the Mechanisms. 2010. 105-175 p.
97. Baranauskas G, Nistri A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: Cellular mechanisms. Vol. 54, *Progress in Neurobiology.* 1998. p. 349–65.
98. Sandkühler J. Learning and memory in pain pathways. Vol. 88, *Pain.* 2000. p. 113–8.
99. Bee L, Dickenson A. Descending modulation of pain. In: *Synaptic Plasticity in Pain.*

2009. p. 307–35.
100. Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: Inhibitory or facilitatory? Vol. 46, *Brain Research Reviews*. 2004. p. 295–309.
 101. Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014;8(2):143–51.
 102. Millan MJ. Descending control of pain. Vol. 66, *Progress in Neurobiology*. 2002. p. 355–474.
 103. Fields HL, Rowbotham M, Baron R. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. *Neurobiol Dis*. 1998;5(4):209–27.
 104. Kobayashi S. Organization of neural systems for aversive information processing: Pain, error, and punishment. *Frontiers in Neuroscience*. 2012.
 105. Mobbs D, Marchant JL, Hassabis D, Seymour B, Tan G, Gray M, et al. From Threat to Fear: The Neural Organization of Defensive Fear Systems in Humans. *J Neurosci*. 2009;29(39):12236–43.
 106. Camarata PJ, Yaksh TL. Characterization of the spinal adrenergic receptors mediating the spinal effects produced by the microinjection of morphine into the periaqueductal gray. *Brain Res*. 1985;336(1):133–42.
 107. Yaksh TL. Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Res*. 1979;160(1):180–5.
 108. Yaksh TL, Tyce GM. Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain Res*. 1979;171(1):176–81.
 109. Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. Vol. 80, *Progress in Neurobiology*. 2006. p. 53–83.
 110. Woolf CJ. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. Vol. 140, *Annals of Internal Medicine*. 2004. p. 441–51.
 111. Lefebvre C, Fisher K, Cahill CM,Coderre TJ. Evidence that DHPG-induced nociception depends on glutamate release from primary afferent C-fibres. *Neuroreport*. 2000;11(8):1631–5.
 112. Le Bars D, Villanueva L, Bouhassira D, Willer JC, LeBars D, Villanueva L, et al. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man. *Patol Fiziol i Eksp Ter*. 1992;4(4):55–65.
 113. Le Bars D, Dickenson AH, Besson J-M. Diffuse Noxious Inhibitory Controls. I. Effects on Dotal Horn Convergent Neurones in the Rat. *Pain*. 1979;6(August 2014):283–304.
 114. Schweinhardt P. The many faces of counter-irritation. Vol. 152, *Pain*. 2011. p. 1445–6.
 115. Bars DLE, Dickenson AH, Besson J. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. 1979;6:305–27.
 116. Pud D, Granovsky Y, Yarnitsky D. The methodology of experimentally induced diffuse noxious inhibitory control (DNIC)-like effect in humans. Vol. 144, *Pain*. 2009.

- p. 16–9.
117. Botelho LM, Morales-Quezada L, Rozisky JR, Brietzke AP, Torres ILS, Deitos A, et al. A Framework for Understanding the Relationship between Descending Pain Modulation, Motor Corticospinal, and Neuroplasticity Regulation Systems in Chronic Myofascial Pain. *Front Hum Neurosci*. 2016;10.
 118. Yarnitsky D. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2010;23(5):611–5.
 119. Yarnitsky D, Arendt-Nielsen L, Bouhassira D, Edwards RR, Fillingim RB, Granot M, et al. Recommendations on terminology and practice of psychophysical DNIC testing. Vol. 14, *European Journal of Pain*. 2010. p. 339.
 120. Arendt-Nielsen L, Gotliebsen K. Segmental inhibition of laser-evoked brain potentials by ipsi- and contralaterally applied cold pressor pain. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1992;64(1):56–61.
 121. Motohashi K, Umino M. Heterotopic painful stimulation decreases the late component of somatosensory evoked potentials induced by electrical tooth stimulation. *Cogn Brain Res*. 2001;11(1):39–46.
 122. Fujii K, Motohashi K, Umino M. Heterotopic ischemic pain attenuates somatosensory evoked potentials induced by electrical tooth stimulation: Diffuse noxious inhibitory controls in the trigeminal nerve territory. *Eur J Pain*. 2006;10(6):495–504.
 123. Le Pera D, De Armas L, Maiese T, Tonali PA, Tinazzi M, Arendt-Nielsen L, et al. Inhibitory effect of capsaicin evoked trigeminal pain on warmth sensation and warmth evoked potentials. *Int Congr Ser*. 2005;1278:389–92.
 124. Lautenbacher S, Kunz M, Burkhardt S. The effects of DNIC-type inhibition on temporal summation compared to single pulse processing: Does sex matter? *Pain*. 2008;140(3):429–35.
 125. Schestatsky P, Stefani LC, Sanches PR, Silva Júnior DP da, Torres ILS, Dall-Agnol L, et al. Validation of a Brazilian quantitative sensory testing (QST) device for the diagnosis of small fiber neuropathies. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011;69(6):943–8.
 126. Popescu A, Leresche L, Truelove EL, Drangsholt MT. Gender differences in pain modulation by diffuse noxious inhibitory controls: A systematic review. Vol. 150, *Pain*. 2010. p. 309–18.
 127. Lee YC, Nassikas NJ, Clauw DJ. The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(2):211.
 128. Paul-Savoie E. Is the Deficit in Pain Inhibition in Fibromyalgia Influenced by Sleep Impairments? *Open Rheumatol J*. 2012;6(1):296–302.
 129. Hilgenberg-Sydney PB, Kowacs PA, Conti PCR. Somatosensory evaluation in Dysfunctional Syndrome patients. *J Oral Rehabil*. 2016;43(2):89–95.
 130. Normand E, Potvin S, Gaumond I, Cloutier G, Corbin JF, Marchand S. Pain inhibition is deficient in chronic widespread pain but normal in major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*. 2011;72(2):219–24.

131. Von Baeyer CL, Piira T, Chambers CT, Trapanotto M, Zeltzer LK. Guidelines for the cold pressor task as an experimental pain stimulus for use with children. Vol. 6, *Journal of Pain*. 2005. p. 218–27.
132. Mitchell LA, MacDonald RA, Brodie EE. Temperature and the cold pressor test. *J Pain*. 2004;5(4):233–7.
133. Bali A, Jaggi AS. Clinical experimental stress studies: Methods and assessment. *Rev Neurosci*. 2015;26(5):555–79.
134. Zanette SA, Dussan-Sania JA, Souza A, Deitos A, Torres ILS, Caumo W. Higher Serum S100B and BDNF Levels are Correlated with a Lower Pressure-Pain Threshold in Fibromyalgia. *Mol Pain*. 2014;10:1744-8069-10–46.
135. Stefani LC, Torres IL da S, De Souza ICC, Rozisky JR, Fregni F, Caumo W. BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects. *Neurosci Lett*. 2012;514(1):62–6.
136. Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, et al. BDNF as a pain modulator. Vol. 85, *Progress in Neurobiology*. 2008. p. 297–317.
137. Bao Y, Hou W, Liu R, Gao Y, Kong X, Yang L, et al. PAR2-Mediated Upregulation of BDNF Contributes to Central Sensitization in Bone Cancer Pain. *Mol Pain*. 2014;10:1744-8069-10–28.
138. Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K. Contribution of Microglia and Astrocytes to the Central Sensitization, Inflammatory and Neuropathic Pain in the Juvenile Rat. *Mol Pain*. 2012;8:1744-8069-8–43.
139. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: From evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). Vol. 322, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. p. 1111–22.
140. Watkins LR, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Johnston I, Maier SF. Chapter 22 Contribution of glia to pain processing in health and disease. *Handb Clin Neurol*. 2006;81:309–23.
141. Narita M, Kuzumaki N, Narita M, Kaneko C, Hareyama N, Miyatake M, et al. Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical δ -opioid receptor dysfunction. *J Neurochem*. 2006;97(5):1369–78.
142. Watkins LR, Hutchinson MR, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Glia as the “bad guys”: Implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun*. 2007;21(2):131–46.
143. Ammann C, Lindquist MA, Celnik PA. Response variability of different anodal transcranial direct current stimulation intensities across multiple sessions. *Brain Stimul*. 2017;10(4):757–63.
144. Inukai Y, Saito K, Sasaki R, Tsuiki S, Miyaguchi S, Kojima S, et al. Comparison of Three Non-Invasive Transcranial Electrical Stimulation Methods for Increasing Cortical Excitability. *Front Hum Neurosci*. 2016;10.
145. DaSilva AF, Volz MS, Bikson M, Fregni F. Electrode positioning and montage in transcranial direct current stimulation. *J Vis Exp*. 2011;(51):e2744.

146. Minhas P, Bansal V, Patel J, Ho JS, Diaz J, Datta A, et al. Electrodes for high-definition transcutaneous DC stimulation for applications in drug delivery and electrotherapy, including tDCS. *J Neurosci Methods*. 2010;190(2):188–97.
147. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. Vol. 1, *Brain Stimulation*. 2008. p. 206–23.
148. Stagg CJ, Best JG, Stephenson MC, O’Shea J, Wylezinska M, Kincses ZT, et al. Polarity-Sensitive Modulation of Cortical Neurotransmitters by Transcranial Stimulation. *J Neurosci*. 2009;29(16):5202–6.
149. Nitsche M. A, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. Vol. 527 Pt 3, *The Journal of physiology*. 2000. p. 633–9.
150. Lang N, Siebner HR, Ward NS, Lee L, Nitsche MA, Paulus W, et al. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *Eur J Neurosci*. 2005;22(2):495–504.
151. DaSilva AF, Volz MS, Bikson M, Fregni F. Electrode Positioning and Montage in Transcranial Direct Current Stimulation. *J Vis Exp*. 2011;(51).
152. Utz KS, Dimova V, Oppenländer K, Kerkhoff G. Electrified minds: Transcranial direct current stimulation (tDCS) and Galvanic Vestibular Stimulation (GVS) as methods of non-invasive brain stimulation in neuropsychology-A review of current data and future implications. Vol. 48, *Neuropsychologia*. 2010. p. 2789–810.
153. Jacobson L, Koslowsky M, Lavidor M. TDCS polarity effects in motor and cognitive domains: A meta-analytical review. Vol. 216, *Experimental Brain Research*. 2012. p. 1–10.
154. Fregni F, Boggio PS, Lima MC, Ferreira MJL, Wagner T, Rigonatti SP, et al. A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury. *Pain*. 2006;122(1–2):197–209.
155. Charvet LE, Kasschau M, Datta A, Knotkova H, Stevens MC, Alonzo A, et al. Remotely-supervised transcranial direct current stimulation (tDCS) for clinical trials: guidelines for technology and protocols. *Front Syst Neurosci*. 2015;9(March):26.
156. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol*. 2000;527(3):633–9.
157. Priori A, Berardelli A, Rona S, Accornero N, Manfredi M. Polarization of the human motor cortex through the scalp. *Neuroreport*. 1998;9(10):2257–60.
158. Sehm B, Kipping J, Schäfer A, Villringer A, Ragert P. A Comparison between Uni- and Bilateral tDCS Effects on Functional Connectivity of the Human Motor Cortex. *Front Hum Neurosci*. 2013;7.
159. Boggio PS, Nunes A, Rigonatti SP, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Fregni F. Repeated sessions of noninvasive brain DC stimulation is associated with motor function improvement in stroke patients. *Restor Neurol Neurosci*. 2007;25(2):123–9.
160. Kim MS, Koo H, Han SW, Paulus W, Nitsche MA, Kim YH, et al. Repeated anodal transcranial direct current stimulation induces neural plasticity-associated gene

- expression in the rat cortex and hippocampus. *Restor Neurol Neurosci.* 2017;35(2):137–46.
161. DosSantos MF, Love TM, Martikainen IK, Nascimento TD, Fregni F, Cummiford C, et al. Immediate effects of tDCS on the μ -opioid system of a chronic pain patient. *Front Psychiatry.* 2012;3(NOV).
 162. Luedtke K, May A, Jürgens TP. No effect of a single session of transcranial direct current stimulation on experimentally induced pain in patients with chronic low back pain--an exploratory study. *PLoS One.* 2012;7(11):e48857.
 163. Kuo HI, Bikson M, Datta A, Minhas P, Paulus W, Kuo MF, et al. Comparing cortical plasticity induced by conventional and high-definition 4 x 1 ring tDCS: A neurophysiological study. *Brain Stimul.* 2013;6(4):644–8.
 164. Medeiros LF, de Souza ICC, Vidor LP, de Souza A, Deitos A, Volz MS, et al. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: A review. Vol. 3, *Frontiers in Psychiatry.* 2012.
 165. Edwards D, Cortes M, Datta A, Minhas P, Wassermann EM, Bikson M. Physiological and modeling evidence for focal transcranial electrical brain stimulation in humans: A basis for high-definition tDCS. *Neuroimage.* 2013;74:266–75.
 166. Stagg CJ, Nitsche MA. Physiological Basis of Transcranial Direct Current Stimulation. *Neurosci.* 2011;17(1):37–53.
 167. Brunoni AR, Nitsche MA, Bolognini N, Bikson M, Wagner T, Merabet L, et al. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): Challenges and future directions. Vol. 5, *Brain Stimulation.* 2012. p. 175–95.
 168. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol.* 2012;120(12):323–30.
 169. Bikson M, Datta A, Elwassif M. Establishing safety limits for transcranial direct current stimulation. *Clinical Neurophysiology.* 2009;120(6):1033–4.
 170. Woods AJ, Antal A, Bikson M, Boggio PS, Brunoni AR, Celnik P, et al. A technical guide to tDCS, and related non-invasive brain stimulation tools. Vol. 127, *Clinical Neurophysiology.* 2016. p. 1031–48.
 171. Bikson M, Grossman P, Thomas C, Zannou AL, Jiang J, Adnan T, et al. Safety of Transcranial Direct Current Stimulation: Evidence Based Update 2016. Vol. 9, *Brain Stimulation.* 2016. p. 641–61.
 172. Fregni F, Nitsche MA, Loo CK, Brunoni AR, Marangolo P, Leite J, et al. Regulatory considerations for the clinical and research use of transcranial direct current stimulation (tDCS): Review and recommendations from an expert panel. *Clin Res Regul Aff.* 2015;32(1):22–35.
 173. Liebetanz D, Fregni F, Monte-Silva KK, Oliveira MB, Amâncio-dos-Santos Â, Nitsche MA, et al. After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. *Neurosci Lett.* 2006;398(1–2):85–90.
 174. Brunoni AR, Moffa AH, Fregni F, Palm U, Padberg F, Blumberger DM, et al. Transcranial direct current stimulation for acute major depressive episodes: meta-

- analysis of individual patient data. *Br J Psychiatry* [Internet]. 2016;10:1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27056623>
175. Nitsche MA, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A. Treatment of depression with transcranial direct current stimulation (tDCS): A Review. Vol. 219, *Experimental Neurology*. 2009. p. 14–9.
 176. Meron D, Hedger N, Garner M, Baldwin DS. Transcranial direct current stimulation (tDCS) in the treatment of depression: Systematic review and meta-analysis of efficacy and tolerability. Vol. 57, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2015. p. 46–62.
 177. Nitsche MA, Paulus W. Transcranial direct current stimulation - Update 2011. Vol. 29, *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2011. p. 463–92.
 178. Li LM, Uehara K, Hanakawa T. The contribution of interindividual factors to variability of response in transcranial direct current stimulation studies. *Front Cell Neurosci*. 2015;9.
 179. Bashir S, Kyoung Yoo W, Ahmad S, Alatefi M, Abu Juma A. Inter-individual variability in motor Cortex excitability assessment induced by Transcranial direct current stimulation in humans. *Brain Stimul*. 2017;10(2):357.
 180. López-Alonso V, Cheeran B, Río-Rodríguez D, Fernández-Del-Olmo M. Inter-individual variability in response to non-invasive brain stimulation paradigms. *Brain Stimul*. 2014;7(3):372–80.
 181. Wiethoff S, Hamada M, Rothwell JC. Variability in response to transcranial direct current stimulation of the motor cortex. *Brain Stimul*. 2014;7(3):468–75.
 182. Neuling T, Rach S, Herrmann CS. Orchestrating neuronal networks: sustained after-effects of transcranial alternating current stimulation depend upon brain states. *Front Hum Neurosci*. 2013;7.
 183. Marshall L. Transcranial Direct Current Stimulation during Sleep Improves Declarative Memory. *J Neurosci*. 2004;24(44):9985–92.
 184. Prehn-Kristensen A, Munz M, Göder R, Wilhelm I, Korr K, Vahl W, et al. Transcranial oscillatory direct current stimulation during sleep improves declarative memory consolidation in children with attention-deficit/hyperactivity disorder to a level comparable to healthy controls. *Brain Stimul*. 2014;7(6):793–9.
 185. Nader N, Chrousos GP, Kino T. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. Vol. 21, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2010. p. 277–86.
 186. Clow A, Law R, Evans P, Vallence A-M, Hodyl NA, Goldsworthy MR, et al. Day differences in the cortisol awakening response predict day differences in synaptic plasticity in the brain. *Stress*. 2014;17(3):219–23.
 187. Rivera-Urbina GN, Nitsche MA, Molero-Chamizo A. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) in the Context of Sleep and Insomnia. *J Sleep Med Disord*. 2016;3(5):1060.
 188. Acler M, Bocci T, Valenti D, Turri M, Priori A, Bertolasi L. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) for sleep disturbances and fatigue in patients with post-polio syndrome. *Restor Neurol Neurosci*. 2013;31(5):661–8.

189. Polanía R, Nitsche MA, Paulus W. Modulating functional connectivity patterns and topological functional organization of the human brain with transcranial direct current stimulation. *Hum Brain Mapp.* 2011;32(8):1236–49.
190. Reis J, Fischer JT, Prichard G, Weiller C, Cohen LG, Fritsch B. Time- but not sleep-dependent consolidation of tDCS-enhanced visuomotor skills. *Cereb Cortex.* 2015;25(1):109–17.
191. Caumo W, Deitos A, Carvalho S, Leite J, Carvalho F, Dussan-Sarria JA, et al. Motor Cortex Excitability and BDNF Levels in Chronic Musculoskeletal Pain According to Structural Pathology. *Front Hum Neurosci.* 2016;10(July):357.
192. Nitsche MA, Jaussi W, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, Paulus W. Consolidation of Human Motor Cortical Neuroplasticity by D-Cycloserine. *Neuropsychopharmacology.* 2004;29(8):1573–8.
193. Kwon YH, Ko M-H, Ahn SH, Kim Y-H, Song JC, Lee C-H, et al. Primary motor cortex activation by transcranial direct current stimulation in the human brain. *Neurosci Lett.* 2008;435(1):56–9.
194. Huber R, Mäki H, Rosanova M, Casarotto S, Canali P, Casali AG, et al. Human cortical excitability increases with time awake. *Cereb Cortex.* 2013;23(2):332–8.
195. Ly JQM, Gaggioni G, Chellappa SL, Papachilleos S, Brzozowski A, Borsu C, et al. Circadian regulation of human cortical excitability. *Nat Commun.* 2016;7:11828.
196. Freitas C, Farzan F, Pascual-Leone A. Assessing brain plasticity across the lifespan with transcranial magnetic stimulation: Why, how, and what is the ultimate goal? *Front Neurosci.* 2013;(7 APR).
197. Kobayashi M, Pascual-Leone A. Transcranial magnetic stimulation in neurology. *Lancet Neurol.* 2003;2(3):145–56.
198. Frank MG, Cantera R. Sleep, clocks, and synaptic plasticity. Vol. 37, *Trends in neurosciences.* 2014. p. 491–501.
199. Appelbaum L, Wang G, Yokogawa T, Skariah GM, Smith SJ, Mourrain P, et al. Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. *Neuron.* 2010;68(1):87–98.
200. Tamm AS, Lagerquist O, Ley AL, Collins DF. Chronotype Influences Diurnal Variations in the Excitability of the Human Motor Cortex and the Ability to Generate Torque during a Maximum Voluntary Contraction. *J Biol Rhythms.* 2009;24(3):211–24.
201. Lang N, Rothkegel H, Reiber H, Hasan A, Sueske E, Tergau F, et al. Circadian modulation of GABA-mediated cortical inhibition. *Cereb Cortex.* 2011;21(10):2299–306.
202. Doeltgen SH, Ridding MC. Behavioural exposure and sleep do not modify corticospinal and intracortical excitability in the human motor system. *Clin Neurophysiol.* 2010;121(3):448–52.
203. De Gennaro L, Marzano C, Veniero D, Moroni F, Fratello F, Curcio G, et al. Neurophysiological correlates of sleepiness: A combined TMS and EEG study. *Neuroimage.* 2007;36(4):1277–87.

204. Gorgoni M, Ferlazzo F, Moroni F, D'Atri A, Donarelli S, Fanelli S, et al. Sleep deprivation affects somatosensory cortex excitability as tested through median nerve stimulation. *Brain Stimul.* 2014;7(5):732–9.
205. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJL, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2006;54(12):3988–98.
206. Kasschau M, Reisner J, Sherman K, Bikson M, Datta A, Charvet LE. Transcranial Direct Current Stimulation Is Feasible for Remotely Supervised Home Delivery in Multiple Sclerosis. *Neuromodulation.* 2016;19(8):824–31.
207. Lefaucheur J-P, Antal A, Ayache SS, Benninger DH, Brunelin J, Cogiamanian F, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of transcranial direct current stimulation (tDCS). *Clin Neurophysiol.* 2017 Jan;128(1):56–92.
208. Poreisz C, Boros K, Antal A, Paulus W. Safety aspects of transcranial direct current stimulation concerning healthy subjects and patients. *Brain Res Bull.* 2007;72(4–6):208–14.
209. Kasschau M, Sherman K, Haider L, Frontario A, Shaw M, Datta A, et al. A Protocol for the Use of Remotely-Supervised Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) in Multiple Sclerosis (MS). *J Vis Exp.* 2015;(106):e53542.
210. Charvet L, Shaw M, Dobbs B, Frontario A, Sherman K, Bikson M, et al. Remotely Supervised Transcranial Direct Current Stimulation Increases the Benefit of At-Home Cognitive Training in Multiple Sclerosis. *Neuromodulation.* 2017;
211. Lefaucheur J-P, Antal A, Ayache SS, Benninger DH, Brunelin J, Cogiamanian F, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of transcranial direct current stimulation (tDCS). *Clin Neurophysiol.* 2017;128(1):56–92.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com esta tese de doutorado permitem as seguintes conclusões:

- A variação diferencial no ciclo claro/escuro natural ao longo do ano, que está absolutamente ligada à latitude, gera, por meio do processo de arrastamento, diferentes resultados no sono e fenótipos circadianos e que o gene *PER3* modula a maneira como o sistema circadiano humano sincroniza.

- Há uma relação entre os polimorfismos dos genes relógio *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5} e o padrão temporal da função do sistema modulador da dor descendente. Há uma eficiência maior do sistema de modulação descendente da dor nos sujeitos *PER3*^{5/5} pela manhã, enquanto que nos *PER3*^{4/4} esse sistema foi mais eficiente à tarde.

- A privação do sono é um fator que propicia uma menor eficiência do sistema modulador de dor descendente, apesar do efeito do gene clock *PER3*. Por outro lado, uma menor variação da proteína sérica S100-β ao longo do dia foi inversamente correlacionada com a modulação *top-down* ao longo do dia.

- O efeito da ETCC na plasticidade cortical, bem como na secreção de BDNF, está relacionado à tipologia circadiana. Esses resultados sugerem que a diferença no efeito de ETCC sobre a secreção de BDNF é, pelo menos em parte, regulada pela privação de sono.

- Além disso, os resultados sugerem que a hora do uso de ETCC não tem impacto na excitabilidade cortical, mas influenciou a secreção de BDNF. No geral, esses achados sugerem que a magnitude do efeito anodal de TDCS em M1 é um estado de plasticidade dependente modulado pela ritmicidade circadiana endógena.

- Os resultados do desenvolvimento de um equipamento de ETCC para uso doméstico sugerem que o dispositivo desenvolvido é viável para uso domiciliar, com monitoramento

adequado da aderência (93,25% em 650 sessões) e impedância de contato (menos de 3 k Ω). Houve relatos de alguns efeitos adversos, que não diferem dos relatados no tratamento sob supervisão direta nos centros, conforme relatado na literatura.

12. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta tese de doutorado corrobora para o fortalecimento e solidificação de uma linha de pesquisa que estuda a relação do gene-relógio PER3, da tipologia circadiana e dos efeitos de uma técnica de neuromodulação – ETCC - realizada em domicílio e que visa gerar conhecimento que pode ser útil no processo de tomada de decisão clínica para o tratamento individualizado.

Além disso, a expressão gênica, que é o processo em que a informação codificada por um determinado gene é codificada em uma proteína, pode ser avaliada em futuras pesquisas e, com isso, dispor de possíveis marcadores diagnósticos e de tratamentos padrão-ouro individualizados.

ANEXOS

ANEXO 1: TCLE ESTUDO 1 E 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: Caracterização fenotípica de ritmos circadianos em indivíduos com diferentes genótipos para polimorfismos nos genes relógio em diferentes regiões do Brasil: ênfase na investigação do gene Per3 e o efeito latitude

Sub-Estudo: Estudo da relação entre tipologia circadiana, aspectos comportamentais e excitabilidade cortical em indivíduos saudáveis.

Você está sendo convidado para participar do estudo e do sub-estudo acima mencionado. A finalidade do estudo é verificar se existe associação entre polimorfismos nos “genes relógio” e nos genes AANAT e HIOMT com o cronotipo, bem como entre o VNTR do gene PER3 e a regulação circadiana dependente da duração da fotofase associada ao clima latitudinal. Este estudo está sendo proposto pela Universidade de São Paulo, juntamente com a UFRGS e HCPA. Os pesquisadores responsáveis são Mário Pedrazzoli (USP) e Wolnei Caumo (UFRGS/HCPA). A finalidade do sub-estudo é analisar a forma com que o cérebro responde ao estímulo doloroso e a relação com a cronobiologia. O estudo também tem como objetivo verificar o catastrofismo (sentimento da pessoa a respeito da dor), sintomas depressivos, resiliência (a maneira com que ocorre a adaptação do indivíduo frente às adversidades da vida) e coping (como são as estratégias usadas para sair dessas adversidades). O pesquisador responsável pelo sub-estudo é Wolnei Caumo, juntamente com os demais pesquisadores, Rafael Vercelino e Fabiana Carvalho.

Sua participação é totalmente voluntária e não possui nenhum tipo de relação com avaliação de desempenho acadêmico ou curricular. Você também poderá desistir de sua participação, mesmo após consentir em participar do estudo, sem que isso traga prejuízos a você.

Se você aceitar participar, os procedimentos envolvidos no estudo são os seguintes:

- Etapa 1: Você deverá preencher questionários que verificarão seu cronotipo (matutino ou vespertino) e fornecer material biológico para a identificação dos genes investigados através da coleta de células da mucosa da boca pelo contato de um tipo de cotonete na parte interna da bochecha.

Caso seja selecionado(a), será solicitado(a) a usar um actímetro (instrumento parecido com um relógio de pulso, que mede a atividade/repouso, a temperatura e a luminosidade ambiental) por três semanas, duas vezes no ano, e a responder a um diário de sono durante toda a coleta dos dados.

- Etapa 2: Também deverá responder a três questionários (Escala de pensamentos catastróficos sobre dor, Escala de depressão de Beck e Escala breve de coping resiliente). Para avaliar a forma com que seu cérebro reage ao estímulo doloroso, será aplicado um estímulo térmico em seu braço e verificado o seu limiar de dor, que é a menor temperatura percebida como dolorosa. Será treinado(a) a pressionar um botão quando atingir o limiar, e se ele for superior a 50°C, o dispositivo retornará automaticamente para o valor inicial e será registrado o valor de 50°C. Será realizada a aferição da excitabilidade cortical antes do estímulo doloroso, durante e após o estímulo.

As avaliações serão realizadas no Laboratório de Dor & Neuromodulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O tempo necessário para esta etapa é de aproximadamente 3 horas.

Possíveis riscos: Raramente pode ocorrer um leve desconforto, como coceira, causado pelo uso do actímetro. Pode ocorrer desconforto no momento da resposta aos questionários.

Possíveis benefícios: Você poderá obter maior conhecimento sobre seu cronotipo e contribuir para o aumento do conhecimento sobre o assunto pesquisado.

Os resultados obtidos serão mantidos e serão divulgados em publicações científicas, sendo que dados pessoais de identificação dos participantes não serão mencionados.

A participação neste projeto não acarretará qualquer despesa financeira ou remuneração com relação aos procedimentos efetuados no estudo.

Em caso de dúvidas você poderá contatar o pesquisador responsável por este estudo, Prof. Wolnei Caumo, que poderá ser encontrado no 2º andar do HCPA – Laboratório de Dor & Neuromodulação, sala 2201E, ou através do fone (51) 9981.3977.

Em caso de dúvidas também poderá ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que fica no 2º andar, sala 2227, no telefone (51) 33597640, de segunda a sexta, das 8h às 17h.

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas e que estou recebendo uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa

Nome

Assinatura do voluntário

Nome

Assinatura do pesquisador que
aplicou o TCLE

Porto Alegre, __/__/__

ANEXO 2: ADENDO TCLE ESTUDO 1 E 2

ADENDO AO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto CAAE: 00614812.4.2003.5327

Título do Projeto: Caracterização fenotípica de ritmos circadianos em indivíduos com diferentes genótipos para polimorfismos nos genes relógio em diferentes regiões do Brasil: ênfase na investigação do gene Per3 e o efeito latitude

Sub-Estudo: Estudo da relação entre tipologia circadiana, aspectos comportamentais e excitabilidade cortical em indivíduos saudáveis.

Você está participando do projeto acima mencionado, realizado pelo Laboratório de Dor & Neuromodulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e já concluiu a participação na etapa 1.

Na data _____, você assinou o termo de consentimento que também previa a realização da etapa 2 do projeto. Ao longo da execução do projeto, verificamos a necessidade de modificar a etapa 2 e incluir algumas avaliações. Por isso, além dos procedimentos previstos anteriormente para analisar a forma com que o seu cérebro responde ao estímulo doloroso e a relação com a cronobiologia, iremos avaliar também o seu desempenho cognitivo em dois momentos diferentes do dia e realizar mais uma análise de seu DNA para avaliar se você tem um polimorfismo do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), que é um marcador sanguíneo relacionado à capacidade do cérebro de se remodelar.

Então, nesta etapa da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

1) Avaliação da dor:

Você deverá responder a três questionários (Escala de pensamentos catastróficos sobre dor, Escala de depressão de Beck e Escala breve de coping resiliente). Para avaliar a forma com que seu cérebro reage ao estímulo doloroso, será aplicado um estímulo térmico em seu braço e verificado o seu limiar de dor, que é a menor temperatura percebida como dolorosa. Será treinado (a) a pressionar um botão quando atingir o limiar, e se ele for superior a 50°C, o dispositivo retornará automaticamente para o valor inicial e será registrado o valor de 50°C. Será realizada a aferição da excitabilidade cortical antes do estímulo doloroso, durante e após o estímulo.

2) Avaliação do desempenho cognitivo:

Seu desempenho cognitivo será avaliado pela manhã e pela tarde, com uso do aparelho de eletroencefalograma para avaliar as mudanças em seu cérebro durante a realização dos testes. Usaremos estes testes cognitivos, que são questionários e escalas que avaliarão a sua memória, inteligência, atenção, personalidade, flexibilidade cognitiva e tomada de decisão. Os questionários serão aplicados por psicólogos e as escalas serão respondidas por auto-relato (você responderá sozinho).

3) Coleta de sangue:

Será realizada para verificar a presença de um polimorfismo do BDNF. Será necessário coletar duas amostras de sangue, o volume é de 10 ml, o equivalente a duas colheres de sopa.

As avaliações ocorrerão em dois dias, que podem ser realizados com 7 dias de intervalo. No dia 1, você irá realizar os procedimentos de avaliação da dor em dois momentos do mesmo dia (manhã e tarde), com duração de 1h30 em cada turno. No dia 2, você irá realizar a coleta de sangue pela manhã e a avaliação cognitiva em dois momentos do mesmo dia (manhã e tarde), com duração de 1h30 em cada turno. Estes encontros serão definidos

previamente com você, conforme sua disponibilidade.

Poderá ocorrer desconforto na coleta de sangue, podendo sentir um pouco de dor e ter uma mancha roxa no local da coleta (hematoma). Você poderá sentir desconforto no momento de resposta aos questionários e na aplicação do EEG, pois utilizaremos uma touca em sua cabeça no momento da mensuração das ondas cerebrais.

O possível benefício direto decorrente da sua participação na pesquisa envolve conhecer em qual horário do dia você apresenta melhor desempenho cognitivo. Os resultados desta pesquisa ajudarão a entender melhor como o desempenho cognitivo muda durante o dia, podendo beneficiar futuros pacientes que apresentem disfunções cognitivas.

Lembramos que sua participação é totalmente voluntária e não possui nenhum tipo de relação com avaliação de desempenho acadêmico ou curricular. Você também poderá desistir de sua participação, mesmo após ter consentido em participar do estudo, sem que isso traga prejuízos a você.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá ser ressarcido por despesas decorrentes de sua participação, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Gostaríamos de armazenar as amostras coletadas para verificar outras características em estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, a nova pesquisa será avaliada pelo comitê de ética, e você será chamado para consentir novamente.

() Aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para pesquisas futuras.

() Não aceito que minhas amostras restantes sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof. Wolnei Caumo e/ou Fabiana Carvalho pelo telefone (51) 3359-8943 ou (51) 3359-7604, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO 3: TCLE ESTUDO 3 E 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) participar do estudo: “Desenvolvimento de aparato de estimulação transcraniana de corrente contínua (ETCC) para uso domiciliar”.

1. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A ETCC tem sido estudada e utilizada para o tratamento de diversas doenças, especialmente na neuropsiquiatria (tratamento de doenças psiquiátricas), na reabilitação (tratamento de síndromes dolorosas e síndromes neurológicas) e na melhora do aprendizado. Em função disso, a intenção deste estudo é desenvolver e validar um aparelho de estimulação transcraniana de corrente contínua para uso domiciliar.

Para isso iremos comparar o efeito do ETCC de uso ambulatorial e domiciliar para verificar se a forma de uso domiciliar terá o mesmo resultado do uso ambulatorial que já foi amplamente estudado. O desenvolvimento do ETCC domiciliar possibilitará a manutenção dos benefícios já encontrados no tratamento ambulatorial, possibilitando que futuramente os pacientes possam realizar o tratamento na sua residência, sem custo com deslocamento nem sobrecarga do sistema de saúde.

2. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você aceitar participar deste estudo, você será sorteado para um dos quatro grupos:

1) ETCC ativo ambulatorial (Figura A): O procedimento iniciará com a localização do ponto em que usaremos os eletrodos. Após, eles serão colocados e presos em dois locais na sua cabeça. Depois o aparelho será ligado nos parâmetros pré-estabelecidos durante 20

minutos. Será realizada uma sessão única, que será feita no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A sala usada para o atendimento fica no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do hospital. O tempo total, com avaliação inicial, sessão de ETCC e avaliação final será de aproximadamente 4 horas.

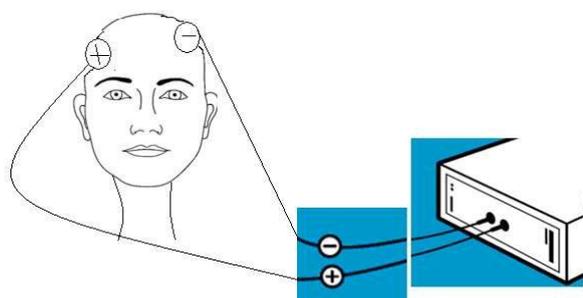
2) ETCC *sham* ambulatorial: Mesmo procedimento e tempo que o anterior, porém o aparelho estará na modalidade *sham* (inativo). Neste grupo também será realizada uma sessão única, que será feita no HCPA. A sala usada para o atendimento fica no CPC do hospital. O tempo total, com avaliação inicial, sessão de ETCC e avaliação final será de aproximadamente 4 horas.

3) ETCC ativo de uso domiciliar (Figura B): O procedimento será exatamente da mesma forma e tempo de estimulação que o ETCC de uso ambulatorial, porém será utilizado o aparato de uso domiciliar. Será explicado para o participante a forma de colocação da touca e o manejo do aparelho. Neste grupo serão feitas 11 sessões de ETCC, sendo a primeira realizada no HCPA, com supervisão do pesquisador, e as demais 10 serão realizadas no domicílio do participante. No 5º dia de aplicação o pesquisador ligará para o participante e fará perguntas sobre o uso do equipamento. Ao final das 10 sessões o participante se deslocará ao HCPA para entrega do aparelho e responderá novamente às perguntas sobre uso do equipamento. O participante se deslocará para o HCPA duas vezes. O tempo total do primeiro encontro, com avaliação inicial, sessão de ETCC e avaliação final será cerca de 4 horas. O tempo da última avaliação será de aproximadamente 1 hora.

4) ETCC *sham* de uso domiciliar: Mesmo procedimento e tempo que o ativo de uso domiciliar, porém o aparelho estará na modalidade *sham* (inativo). Neste grupo também serão realizadas 11 sessões, sendo a primeira realizada no HCPA, com supervisão do

pesquisador, e as demais 10 serão realizadas no domicílio do participante. A sala usada para o atendimento fica no CPC do hospital. O participante se deslocará para o HCPA duas vezes. O tempo total do primeiro encontro, com avaliação inicial, sessão de ETCC e avaliação final será cerca de 4 horas. O tempo da última avaliação será de aproximadamente 1 hora.

Figura ilustrativa das duas formas de uso do ETCC.



A. ETCC ambulatorial



B. ETCC domiciliar

Você deverá preencher questionários que verificarão seu perfil, hábitos de vida e sua qualidade de sono. Será necessário coletar duas amostras de sangue, o volume é de 10 ml a cada coleta, o equivalente a duas colheres de sopa. As amostras de sangue serão coletadas antes de iniciar o estudo e ao final da primeira intervenção. Para os grupos domiciliares, será feita mais uma coleta ao final dos 10 dias. O sangue será coletado para avaliação dos efeitos do equipamento testado, por meio da avaliação de marcadores sanguíneos relacionados à capacidade do cérebro de se remodelar – BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro). Todos os participantes realizarão uma avaliação dos sinais emitidos pelo cérebro (excitabilidade cortical) e uma avaliação do limiar de dor aos estímulos térmicos e de pressão antes e após a aplicação do ETCC (ambulatorial ou domiciliar). O estímulo de pressão será

realizado aplicando-se uma pressão em seu braço com um dispositivo com mola até atingir o seu limite de dor. Para o estímulo térmico, será colocado um dispositivo em seu braço que esquenta gradualmente. Você será treinado (a) a pressionar um botão quando atingir o seu limite de dor. Caso a temperatura seja superior a 52°C, o dispositivo retornará automaticamente para o valor inicial e será registrado o valor de 52°C.

Nem você nem o pesquisador responsável saberão qual dos grupos de ETCC ambulatorial ou domiciliar está. Ao final do estudo o grupo será desvendado.

Os grupos *Sham* têm uma importante função neste estudo, pois estes grupos nos permitirão verificar se o tratamento ambulatorial e domiciliar teve efeito e também comparar os resultados encontrados em cada um deles.

3. BENEFÍCIOS, RISCOS E DESCONFORTOS

Possíveis benefícios: a sua participação no estudo não trará benefício direto para você, mas os resultados deste estudo poderão beneficiar pacientes com dor crônica, doenças psiquiátricas ou síndromes neurológicas que poderão ter uma nova alternativa de tratamento de uso domiciliar.

Possíveis riscos e desconfortos: um possível desconforto do presente estudo poderá ser sentido, em algumas pessoas, na coleta de sangue. O tratamento pode produzir algum risco ou desconforto durante a aplicação. Poderá ocorrer vermelhidão, sensações de coceira, leve formigamento no local onde serão colocados os eletrodos. Você também poderá sentir sonolência, porém não necessita de acompanhante na aplicação ambulatorial, pois a sonolência é de intensidade leve. Pode ocorrer desconforto no momento da resposta aos questionários.

4. VOLUNTARIEDADE

Sua participação no estudo é totalmente voluntária e a não participação ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhum tipo de prejuízo para você.

Se você se recusar em participar ou desistir do estudo, isso não acarretará em nenhum prejuízo no seu atendimento na instituição.

5. RESSARCIMENTO

A participação neste projeto não acarretará qualquer despesa financeira em relação aos procedimentos envolvidos e nenhum tipo de remuneração por sua participação no estudo.

6. CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS

Todas as informações obtidas deste estudo poderão ser publicadas com finalidades científicas, preservando os dados de identificação. Os resultados deste estudo quando forem apresentados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação individual dos participantes do estudo.

7. ESCLARECIMENTOS E CONTATO DOS PESQUISADORES

Todas as suas dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, por meio do contato com pesquisador responsável: Prof^o Dr. Wolnei Caumo ou preferencialmente com a pesquisadora **Fabiana Carvalho** (51) 3362.1686 ou (45) 9124.1109. Os dois pesquisadores poderão ser encontrados no 2º andar do HCPA Laboratório de Dor & Neuromodulação - sala 2201E – telefone (51) 3359-8083.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas poderá ser contatado para o esclarecimento de dúvidas, no 2º andar do HCPA, sala 2227 ou por meio do telefone: (51) 3359.7640, das 08h às 17h, de segunda a sexta-feira.

8. CONSENTIMENTO

Este termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em duas vias, sendo entregue uma via para você e outra será arquivada pelo pesquisador. As duas vias serão assinadas e rubricadas em todas as páginas por ambos.

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

Nome do participante:

Assinatura do participante:

Nome do pesquisador:

Assinatura do pesquisador:

Porto Alegre, de de 201__.

ANEXO 4: PRODUÇÃO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

ARTIGO



ORIGINAL RESEARCH
published: 15 July 2016
doi: 10.3389/fnhum.2016.00357



Motor Cortex Excitability and BDNF Levels in Chronic Musculoskeletal Pain According to Structural Pathology

Wolnei Caumo^{1,2,3,4*}, Alicia Deitos^{1,2}, Sandra Carvalho⁵, Jorge Leite⁵, Fabiana Carvalho^{1,2}, Jairo Alberto Dussán-Sarria^{1,2}, Maria da Graça Lopes Tarragó^{1,2}, Andressa Souza⁶, Iraci Lucena da Silva Torres^{1,7} and Felipe Fregni⁸

APRESENTAÇÃO ORAL



Certificamos que o trabalho "DESENVOLVIMENTO DE EQUIPAMENTO PARA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA" (n.267) de Paulo Roberto Sanches, Danton Pereira Silva Jr, André Frotta Müller, Paulo Ricardo Oppermann Thomé, Bruno Tondin, Alessandro Schildt, Fabiana Carvalho, Assunta Gasparin e Wolnei Caumo foi apresentado no XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, realizado na cidade de Foz do Iguaçu, Paraná, de 17 a 20 de outubro de 2016.



APRESENTAÇÃO PAINEL 1



APRESENTAÇÃO PAINEL 2



APRESENTAÇÃO PAINEL 3



Promovendo a Troca de Conhecimento em Medicina e Saúde Pública

São Paulo, 04 de outubro de 2017

IX Simpósio Internacional em Neuromodulação

CERTIFICADO

Certifico que o resumo intitulado:

“Desenvolvimento e avaliação de viabilidade do equipamento de estimulação transcraniana de corrente contínua (ETCC) para uso domiciliar”

foi aceito e apresentado sob a forma de **PÔSTER** durante o *IX Simpósio Internacional em Neuromodulação*, ocorrido nos dias 18 a 20 de Setembro de 2017 em São Paulo/SP, tendo como autores:

Fabiana Carvalho
~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~
Assunta Gasparin
Aline Patrícia Brietzke
Franciele Pereira
José Ary Berniger Romariz
Paulo Roberto Stefani Sanches
Danton Pereira da Silva Jr.
Iraci Lucena Silva Torres
Wolnei Caumo



Co-Diretor do Simpósio:
Felipe Fregni, MD, PhD, MPH
Diretor do Spaulding Neuromodulation Center,
Spaulding Rehabilitation Hospital/MGH/Harvard Medical School - Boston
Fundador e Conselheiro Educacional, Instituto Scala

Instituto SCALA
Avenida das Nações Unidas, 14171 – 15^o andar | São Paulo - SP
[11] 3568-2151 | contato@institutoscala.com.br | www.institutoscala.com.br

ANEXO 5: STROBE

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

			Art1	Art2
	Item No	Recommendation		
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	90	108
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	90	109-110
Introduction				
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	91 - 93	111-113
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	93	113
Methods				
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	93, 94	113
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	93, 94	114
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	94	113-114
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	93, 92	114-117
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	94	114-117
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	NA	NA

Study size	10	Explain how the study size was arrived at	NA	NA
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	94	114-117
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	94-95	118
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	94-95	118
		(c) Explain how missing data were addressed	NA	NA
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	NA	118
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA	118
Results				
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	93-94	119
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	NA	NA
		(c) Consider use of a flow diagram	NA	134
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	104	119 e 135
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	NA	NA
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	104	119
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and	104, 105 e 106	119, 120, 136,

		why they were included		137 e 138
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	NA	NA
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	NA	NA
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	NA	120, 122, 138 e 139
Discussion				
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	96	122
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	97, 98	123
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	96 a 98	122 a 127
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	99	127
Other information				
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	99	127

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

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

ANEXO 6: CONSORT 2010

Checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page ART 3	Reported on page ART 4
Title and abstract				
	1a	Identification as a randomised trial in the title	NA	NA
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	NA	NA
Introduction				
Background and objectives	2a	Scientific background and explanation of rationale	144 a 146	175, 176
	2b	Specific objectives or hypotheses	146	176
Methods				
Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	146	177
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	NA	NA
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	147	177
	4b	Settings and locations where the data were collected	147, 148	176
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	147, 148	177, 180
Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	149,150	176
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	NA	NA
Sample size	7a	How sample size was determined	NA	NA
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	NA	NA
Randomisation				

Sequence generation	8a	Method used to generate the random allocation sequence	NA	NA
	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	NA	NA
Allocation concealment mechanism	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	NA	NA
Implementation	10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	NA	NA
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and how	NA	NA
	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	NA	NA
Statistical methods	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	NA	150
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	NA	150
Results				
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	187	152
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	NA	152
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	NA	NA
	14b	Why the trial ended or was stopped	NA	NA
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	181	152, 153, 165

Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	181	152
Outcomes and estimation	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	NA	153, 154, 155
	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	NA	NA
Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	NA	NA
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	NA	NA
Discussion				
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	NA	155 a 160
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	NA	160
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	183	155 a 160
Other information				
Registration	23	Registration number and name of trial registry	NA	NA
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	NA	NA
Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	184	160, 161

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.