

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

**SISTEMA MODULADOR DESCENDENTE DA DOR NA FIBROMIALGIA:
MEDIADORES SÉRICOS E EFEITO DA MELATONINA
ENSAIO CLÍNICO FASE II, *DOUBLE-DUMMY*, CONTROLADO**

SIMONE DE AZEVEDO ZANETTE

Porto Alegre

2014

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

**SISTEMA MODULADOR DESCENDENTE DA DOR NA FIBROMIALGIA:
MEDIADORES SÉRICOS E EFEITO DA MELATONINA
ENSAIO CLÍNICO FASE II, *DOUBLE-DUMMY*, CONTROLADO**

SIMONE DE AZEVEDO ZANETTE

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

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

de Azevedo Zanette, Simone
SISTEMA MODULADOR DESCENDENTE DA DOR NA
FIBROMIALGIA: MEDIADORES SÉRICOS E EFEITO DA
MELATONINA: ENSAIO CLINICO FASE II, DOUBLE-DUMMY,
CONTROLADO / Simone de Azevedo Zanette. -- 2014.
160 f.

Orientador: Wolnei Caumo.

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

1. fibromialgia. 2. sensibilização central. 3.
sistema modulatório da dor. 4. CPM. 5. PPT. I. Caumo,
Wolnei, orient. II. Título.

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is to not stop questioning.”

— Albert Einstein, *Relativity: The Special and the General Theory*

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

— Carl Sagan

Dedico esta tese à minha mãe, Clélia, e ao meu pai e "herói", Valter André Zanette, professor aposentado da UFRGS, por todo o incentivo e valores sólidos que me transmitiram.

*Ao Antônio, meu amor, por todo o suporte e companheirismo nas horas mais difíceis desta
jornada.*

*À Maria Antonia, minha filha e amor incondicional. Que todo o esforço dessa trajetória sirva
de exemplo positivo na tua formação.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wolnei Caumo, por seu estímulo e empenho em transmitir a seus alunos a curiosidade e a paixão pela ciência. São admiráveis seu raciocínio multifacetado e sua capacidade em integrar o conhecimento prévio e a criatividade no âmbito da pesquisa. A ele devo minha eterna gratidão, por acreditar na minha capacidade para desenvolver este projeto.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Dor e Neuromodulação do HCPA – UFRGS, por sua parceria, apoio e auxílio ao longo dessa trajetória.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Clínica, Andréa, Tânia, Suzete e Rodrigo, e ao Jeferson, funcionário do Centro de Pesquisa Experimental – UAMP, pela presteza e disponibilidade em ajudar.

Aos alunos bolsistas Rafael Kaiber, André Marques, Bruna Razzolini e Fernando Xavier pela ajuda e empenho nas diversas etapas deste estudo.

A todas as pacientes fibromiálgicas que participaram do estudo, pela colaboração e confiança que depositaram em mim e na proposta da pesquisa.

Aos professores Antonio Cardoso dos Santos e Alberto Rosa pelo incentivo e apoio logístico.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas, por oportunizar a mim e a todos os alunos novas perspectivas no mundo acadêmico e da pesquisa.

À Carmo, Fabiane, André, Juliana, Anne, Adriana, tia Oiara, tia Cenira, Clarice, Eugênia e demais familiares e amigos que me ajudaram a cuidar da Maria Antonia durante inúmeros fins-de-semana, possibilitando a finalização desta tese.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: córtex cingulado anterior

ACR: *American College of Rheumatology*

AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

AMPc: monofosfato cíclico de adenosina

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

BK: bradicinina

BMI: índice de massa corporal

B-PCS: escala de catastrofização da dor adaptada para população brasileira

CGRP: peptídeo gene relacionado à calcitonina

CLBP: dor lombar crônica

CNS: sistema nervoso central

COX-1: ciclo-oxigenase-1

CPM: modulação condicionada da dor

CPM-TASK: método de avaliação da CPM

CPT: limiar doloroso ao frio

CS: sensibilização central

CSF: líquido cefalorraquidiano

CT: limiar de percepção ao frio

DA: dopamina

DHSC: corno posterior da medula espinal

DNIC: controle inibitório nociceptivo difuso

EEG: eletroencefalograma

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*

FIQ: Questionário de Impacto da fibromialgia

FM: fibromialgia

fMRI: ressonância magnética funcional

GTP: trifosfato de guanosina

HC: indivíduos controles saudáveis

HDRS: escala de depressão de Hamilton

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético

HIV: vírus da imunodeficiência humana

H-MRS: *proton magnetic resonance spectroscopy*

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HPT: limiar de dor ao calor

HRQOL: qualidade de vida relacionada à saúde

5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

ICPM: modulação inibitória condicionada da dor

IL: interleucina

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

LTP: potenciação sináptica de longa duração

MDD: transtorno depressivo maior

MEG: magnetoencefalografia

mGluR: *metabotropic glutamate receptor*

MT1: receptor melatoninérgico tipo 1

MT2: receptor melatoninérgico tipo 2

NA: noradrenalina

NF- κ B: fator nuclear kappa B

NK1: neurocinina 1

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NPS₍₀₋₁₀₎: escala numérica de dor [mensuração de 0 (sem dor) a 10 (a pior dor possível)]

NS: neurônios nociceptores específicos

NSAID: anti-inflamatório não esteróide

NYP: neuropeptídeo Y

PAG: substância cinza periaquedutal

PG: prostaglandinas

PGE2: prostaglandina E2

PGI: prostaglandina I

PKC: proteínaquinase C

PMS: sistema modulatório da dor

PPT: limiar de dor à pressão

PSQI: índice Pittsburgh de qualidade de sono

RAGE: *receptor for advanced glycation end products*

RCT: ensaio clínico randomizado

REM: *rapid eye movement*

S100B: proteína S100beta

SCID II: *Structured Clinical Interview for the DSM-IV II*

SE: erro padrão

SI: córtex somatossensorial primário

SII: córtex somatossensorial secundário

SNP: sistema nervoso periférico

SP: substância P

SS: escala de severidade dos sintomas

STT: trato espinotalâmico

TCA: antidepressivo tricíclico

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

TrkB: receptor tropomiosina kinase B

TS: somação temporal

VAS: escala análogo visual

WDR: neurônios *Wide Dynamic Range*

WHOQOL: Questionário de qualidade de vida da *World Health Organization*

WPI: índice de dor difusa

WT: limiar de percepção do calor

WU: *wind up*

RESUMO

Introdução: A fibromialgia (FM) é uma síndrome de dor crônica musculoesquelética difusa, cuja etiologia não está totalmente conhecida. A síndrome cursa com dor, alterações do humor e sintomas de ruptura do ritmo circadiano. Sabe-se que seu processo fisiopatogênico envolve um desbalanço entre os sistemas de modulação excitatório e inibitório da dor. A capacidade do sistema modulatório inibitório está enfraquecida, com hiperativação de neurônios e da neuroglia, constituindo um quadro de sensibilização central. Portanto, estudos adicionais são necessários para compreender a relação entre possíveis marcadores séricos da hiperativação neuronal, tais como o *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) e a proteína S100 beta (S100B). Além disso, estudos que busquem opções terapêuticas com efeito em vias neurobiológicas alternativas, tais como a melatonina, uma indolamina com efeitos resincronizador, analgésico, anti-inflamatório e em sistemas moduladores da dor, como o gabaérgico, opioidérgico e glutamatérgico.

Objetivos:

- 1) Primário: Avaliar se os níveis séricos de BDNF e S100B teriam associação com a FM e se ambos os mediadores sorológicos poderiam ser associados com o limiar de dor à pressão.
- 2) Secundário: Testar o tratamento com melatonina isolada ou em combinação com amitriptilina é melhor que amitriptilina isolada para modificar o sistema modulatório da dor.

Assim, para provar tais hipóteses, neste estudo foram quantificados a modulação condicionada da dor e níveis de BDNF sérico em pacientes que receberam tratamento com melatonina isolada ou associada com amitriptilina. Foi também testado se melatonina melhoraria os sintomas clínicos como dor, limiar de dor à pressão e qualidade do sono relacionado à FM.

Métodos: Foram selecionadas pacientes com diagnóstico de FM de acordo com o *American*

College of Rheumatology (ACR) 2010. No primeiro estudo, de desenho transversal, foram incluídas 56 mulheres com FM, com idades entre 18 e 65 anos. Foram avaliados o limiar de dor à pressão e dosagem sérica de BDNF e S100B. No segundo estudo, foram incluídas 63 pacientes com os mesmos critérios de inclusão descritos no estudo transversal. As pacientes foram randomizadas e receberam, ao deitar, amitriptilina (25mg) (n=21), melatonina (10mg) (n=21) ou melatonina (10 mg) + amitriptilina (25mg) (n=21), durante seis semanas. O sistema modulatório descendente da dor foi acessado pela modulação condicionada da dor, através da mensuração da escala numérica de dor (NPS₍₀₋₁₀₎) durante aferição do limiar de dor ao calor.

Resultados: O resultado do estudo transversal mostrou que BDNF e S100B séricos foram correlacionados. BDNF e S100B foram inversamente correlacionados com limiar de dor à pressão. BDNF sérico foi associado com limiar de dor à pressão, idade e transtorno obsessivo compulsivo, enquanto que S100B sérica foi apenas associada com limiar de dor à pressão. O ensaio clínico randomizado demonstrou que a melatonina aumentou a potência do sistema modulatório da dor inibitório e que a modulação condicionada da dor foi negativamente correlacionada com BDNF sérico.

Conclusões: Os estudos desta tese demonstram que S100B e BDNF, ambos mediadores chave no processo de sensibilização central, foram inversamente correlacionados com o limiar de dor à pressão. BDNF sérico foi, ainda, inversamente correlacionado com a redução da dor. Portanto, a avaliação sérica de BDNF e S100B merece estudos adicionais para determinar seu potencial papel sinalizador no espectro da sensibilização central nessa doença.

Palavras-chave: fibromialgia, sensibilização central, sistema modulatório da dor, BDNF, S100B.

ABSTRACT

Introduction: Fibromyalgia (FM) is a syndrome of chronic diffuse musculoskeletal pain whose etiology is not fully known. This syndrome causes pain, mood swings and symptoms of rupture of the circadian rhythm. Its pathophysiological process involves an imbalance between excitatory and inhibitory pain modulatory systems. The ability of inhibitory systems is weakened, providing a framework of central sensitization, with dysfunction in the descending pain modulatory system, hyper-activation of neurons and neuroglia. Therefore, additional studies are needed to understand the possible relationship between serum markers of neuronal hyperactivity, such as Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and S100B. Particularly, studies seeking therapeutic options with effect in neurobiological alternative pathways such as melatonin, an indolamine with resynchronization, analgesic, and anti-inflammatory effects and actions on the modulatory pain systems such as GABAergic, opioidergic and glutamatergic.

Objectives:

- 1) **Primary:** Evaluate whether the serum levels of BDNF and S100B have association with FM and if both serological mediators could be associated with pressure pain threshold.
- 2) **Secondary:** To test the hypothesis that treatment with melatonin alone or in combination with amitriptyline is better than amitriptyline alone to modify the endogenous pain modulatory system.

Thus, to prove these hypothesis, it was quantified the conditioned pain modulation and serum BDNF levels in FM patients receiving treatment with melatonin alone or in combination with amitriptyline. Also, it was tested whether melatonin would improve clinical symptoms such as pain, pressure pain threshold and quality of sleep related to FM.

Methods: Patients with FM according to the American College of Rheumatology (ACR)

2010 were selected. In the first study, a cross-sectional design, 56 women aging 18-65 years old, with FM were included. It was evaluated the pressure pain threshold, and serum levels of BDNF and S100B. In the second study, 63 patients were included with the same inclusion criteria described in the cross-sectional study. Patients were randomized and received at bedtime amitriptyline (25 mg) (n = 21), melatonin (10 mg) (n = 21) or melatonin (10 mg) + amitriptyline (25 mg) (n = 21) for six weeks. The descending pain modulatory system was accessed by the conditioned pain modulation, measuring the numerical pain scale [NPS₍₀₋₁₀₎] during the heat pain threshold.

Results: On the cross-sectional study serum BDNF and S100B were correlated. Serum BDNF and S100B were correlated with the pressure pain threshold. Serum BDNF was associated with pressure pain threshold, age and obsessive compulsive disorder, while serum S100B was associated with pressure pain threshold, only. The randomized clinical trial showed that melatonin increased the efficacy of inhibitory pain modulatory system and the conditioned pain modulation was negatively correlated with serum BDNF.

Conclusions: The studies of this thesis show that both key mediators of the central sensitization process, BDNF and S100B, were inversely correlated with the pressure pain threshold. They also showed that melatonin increased the inhibitory pain modulatory system. Furthermore, it emphasizes that serum BDNF was inversely correlated with pain reduction. Therefore, assessment of serum BDNF and S100B deserve further studies to determine their potential as a proxy for the central sensitization spectrum in FM.

Keywords: fibromyalgia, central sensitization, pain modulatory system, BDNF, S100B.

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas.....	27
Tabela 2: <i>Controlled Pain Modulation</i> (CPM) e Fibromialgia (FM).....	46
Tabela 3: Efeito dos antidepressivos no bloqueio de receptores.....	56
Tabela 4: Efeitos colaterais.....	60
Tabela 5: Desvio da média-padrão e tamanho do efeito entre os antidepressivos.....	61
Tabela 6: Análise de RCTs placebo-controlados com o uso de PGB, MLN e DLX no tratamento da fibromialgia.....	64

TABELAS DO ARTIGO 1

Table 1. Characteristics of the sample (n=56).....	Erro! Indicador não definido.
Table 2. Serum concentration of BDNF and S100B (n=56)	Erro! Indicador não definido.
Table 3. Multivariate linear regression model of the association between serum BDNF, S100B and clinical parameters, including the pressure-pain threshold (n=56).....	Erro! Indicador não definido.

TABELAS DO ARTIGO 2

Table a 1. Epidemiological and clinical characteristics at baseline, according to the treatment

group. Values are given as the mean (SD) or frequency (n=62).	150
Table a 2. Multivariate linear regression of the interaction between the change on NPS ₍₀₋₁₀₎ during the CPM-TASK by the treatment group considering the BDNF and pain thresholds (n = 62).....	151
Table a 3. The mean delta score [standard deviation (SD)] (post-treatment values minus pre-treatment values) of pain measures (FIQ, PPT, analgesic consumption, tender points) and sleep quality (n = 62).....	152

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DA TESE

Figura 1: Epidemiologia da fibromialgia na população geral	29
Figura 2: <i>Tender Points</i>	31
Figura 3: Representação da pró-nocicepção e anti-nocicepção.....	35
Figura 4: Sensibilidade à dor na população geral.....	36
Figura 5: Axônios aferentes primários (a); velocidade de condução e potencial de ação (b)..	38
Figura 6: Disposição basal de contatos sinápticos no neurônio nociceptor do corno posterior da medula espinal (DHSC).....	41
Figura 7: Mapa Conceitual	69

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figure 1. Scatter plots of serum S100B and BDNF.	113
Figure 2. Scatter plot of the correlation between the pressure-pain threshold and serum BDNF (A) and serum S100B (B).....	114

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figure a 1	153
Figure a 2.....	154
Figure a 3.....	155
Figure a 4.....	156

TERMOS E DEFINIÇÕES

Abaixo estão descritos alguns termos frequentes no decorrer desta tese:

Alodinia: dor provocada por estímulo inócuo

Diffuse Noxious Inhibitory Controls (DNIC) ou *Conditioned Pain Modulation* (CPM): mecanismo que representa a modulação inibitória endógena da dor, é acessado através do paradigma “dor inibe dor”.

Hiperalgisia: aumento da percepção da dor provocada por estímulo doloroso

Hiperalgisia primária: hiperalgisia no local da lesão.

Hiperalgisia secundária: hiperalgisia na área adjacente ou remota do sítio da lesão

Limiar de dor: mínima energia necessária para desencadear a percepção da dor

Nociceptor: subpopulação de neurônios localizados na pele, músculos, vísceras, articulações e vasos, sensíveis a estímulos agressores químicos, mecânicos ou térmicos.

Potenciação sináptica de longa duração (LTP): aumento da eficácia sináptica que supera a duração do estímulo condicionado durante pelo menos 30 minutos (LTP precoce), algumas horas, dias ou meses (LTP tardia).

Somação temporal (TS) ou *Wind up* (WU): progressivo aumento na descarga do potencial de ação de um nociceptor no corno dorsal da medula espinhal, em resposta a estímulos repetidos de igual intensidade de nociceptores da periferia. A TS representa o processo de modulação excitatória, usualmente mensurada pela mudança da percepção da dor durante uma série de estímulos dolorosos similares.

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

percepção da dor.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISAO DA LITERATURA	26
2.1	ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	26
2.2	EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CONCEITUAIS.....	29
2.3	PROCESSAMENTO FISIOLÓGICO DA DOR: PRÓ-NOCICEPÇÃO E ANTINOCICEPÇÃO	35
2.3.1	PRÓ-NOCICEPÇÃO:	36
2.3.2	ANTINOCICEPÇÃO	41
2.4	PROCESSAMENTO FISIOPATOLÓGICO DA DOR NA FIBROMIALGIA	44
2.4.1	SISTEMA MODULATÓRIO DESCENDENTE NA FIBROMIALGIA.....	45
2.4.2	SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL NA FIBROMIALGIA	47
2.4.2.1	BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR	49
2.4.2.2	PROTEÍNA S100 BETA.....	52
2.5	TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA NA FIBROMIALGIA	54
2.5.1	ANTIDEPRESSIVOS	55
2.5.1.1	ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS.....	55
2.5.1.2	INIBIDORES SELETIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA	57
2.5.1.3	INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA E NORADRENALINA	58
2.5.2	ANTICONVULSIVANTES	62
2.5.2.1	GABAPENTINA	62

2.5.2.2 PREGABALINA.....	63
2.5.3 MELATONINA COMO AGENTE TERAPÊUTICO.....	64
3 MAPA CONCEITUAL.....	68
4 JUSTIFICATIVA.....	70
5 OBJETIVOS.....	72
5.1 OBJETIVO GERAL.....	72
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	72
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
7 ARTIGO 1 ORIGINAL EM INGLÊS.....	91
8 ARTIGO 2 ORIGINAL EM INGLÊS.....	116
9 CONCLUSÕES.....	158
10 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	159
11 ANEXOS.....	161

1 INTRODUÇÃO

A fibromialgia (FM) é uma condição clínica frequente na prática médica, caracterizada pela presença de dor musculoesquelética difusa (1). Distúrbios do sono, fadiga, depressão, alterações intestinais e cefaleia também são comumente associadas à ela (2). Sua prevalência na população em geral é estimada entre 1,6% (3) e 6,4% (4), sendo que as mulheres são mais atingidas, na proporção de até 10:1 em relação aos homens.

A dor é um fenômeno dinâmico resultante da atividade endógena dos sistemas excitatório e inibitório. Embora a etiologia da FM não esteja totalmente elucidada, entende-se que um dos principais mecanismos seja o desbalanço entre esses sistemas endógenos, com enfraquecimento do inibitório (5, 6) e/ou reforço do excitatório, o que leva a um quadro de sensibilização central (CS) (7-9), que envolve disfunção no sistema modulador descendente da dor e hiperativação de neurônios e da neuroglia.

Um desses sistemas endógenos é o mecanismo inibitório de modulação condicionada da dor (CPM) (10), onde um estímulo condicionante doloroso e heterotópico (contralateral) é aplicado para inibir a dor de um estímulo-teste. O mecanismo inibitório é mais eficaz quanto maior a inibição dessa dor pelo estímulo condicionante. A eficácia da CPM na FM tem sido relacionada com a qualidade do sono (11), relação que é suportada por bases neurobiológicas, pois os mesmos neurotransmissores estão envolvidos em ambos os processos, incluindo noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e dopamina (DA) (12-15). A CPM depende do recrutamento de opioides endógenos na substância periaquedutal (PAG), que ativam a liberação de 5-HT pelos neurônios do núcleo da rafe (medula oblonga), conseqüentemente atenuando

a aferência nociceptiva para o corno posterior da medula espinhal (DHSC) (16). Projeções noradrenérgicas do locus ceruleus produzem efeitos similares (16).

O *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) tem sido implicado como mediador da hiperalgesia crônica e da sensibilização central. O BDNF regula o crescimento e a sobrevivência neuronal, além de manter a conectividade sináptica no sistema nervoso adulto. Essa neurotrofina também altera o balanço excitatório/inibitório do sistema nervoso central (CNS) e favorece a amplificação da resposta à dor, mecanismos implicados na sensibilização central (17).

Outro mecanismo relacionado à produção da dor crônica e à sensibilização central é a liberação de substâncias pró-inflamatórias através da ativação das células da glia (18). Essas células, quando ativadas, regulam positivamente marcadores celulares específicos e liberam substâncias envolvidas na amplificação da dor (19). Uma dessas substâncias, a proteína S100 beta (S100B), desempenha papel no metabolismo energético, na regulação do ciclo e no crescimento, na diferenciação e na motilidade celulares (20). A S100B exerce efeitos tróficos ou tóxicos, dependendo da sua concentração. Em mínimas concentrações, ela estimula o crescimento neuronal, incrementa a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento e age como fator neurotrófico e como proteína de sobrevivência neuronal, em resposta à ativação glial secundária à lesão. Por outro lado, em altas concentrações, a S100B exacerba a neuroinflamação e a disfunção neuronal, estimulando as citocinas pró-inflamatórias e induzindo a apoptose (21). Em face dessas características, no entanto, a S100B até o presente momento não foi relacionada à FM.

A FM apresenta alterações do sono e ruptura do ritmo circadiano. A secreção de melatonina mostra-se diminuída nesses pacientes (22), o que explicaria a ausência de sono restaurador (22). A melatonina, uma indolamina com efeitos analgésicos (23-30),

anti-inflamatórios (25, 26, 31), antidepressivos (32) e em sistemas moduladores da dor, como o gabaérgico, opioidérgico (27, 33) e glutamatérgico. Ela ainda bloqueia o ciclo de sono não restaurador noturno, melhorando a qualidade do sono (28) e a fadiga diurna (34-36) e induzindo a sincronização do ritmo circadiano (31). Adicionalmente, há algumas evidências de que a melatonina tem efeito na FM (34, 36), porém, os resultados desses estudos não são consistentes, possivelmente porque a dose usada tenha sido insuficiente, entre 3 e 5mg. Relativamente às doses da melatonina na dor, recente ensaio clínico randomizado (RCT) mostrou que 10mg produziram um grande tamanho de efeito na dor pélvica crônica induzida por endometriose (29), reduzindo ainda o BDNF sérico destas pacientes.

Em um período prolongado de dor crônica, há uma perda do sistema inibitório, como demonstrado na FM pela diminuição do limiar térmico doloroso e a ineficácia da modulação condicionada da dor (37), além de excessiva facilitação (perda da inibição) (9), a qual é associada com baixo limiar e elevado pensamento catastrófico relacionados à dor (38). Tais evidências, associadas ao fato de que o processo fisiopatogênico da FM envolve um quadro de sensibilização central que cursa com dor, alterações do humor e sintomas de ruptura do ritmo circadiano apontam a necessidade de estudos adicionais para compreender a relação entre possíveis marcadores séricos da hiperativação neuronal, tais como BDNF e S100B. Além disso, é importante investigar o efeito terapêutico de fármacos como a melatonina, cujo caráter multifacetado pode interferir nos mecanismos periféricos e centrais da dor, com efeitos em vias neurobiológicas alternativas às opções clássicas de tratamento (por exemplo, antidepressivos, anticonvulsivantes).

Para responder a essas questões foram realizados dois estudos, que originaram os dois artigos que constituem esta tese:

1. *Higher serum S100B and BDNF levels are correlated with lower pressure-pain threshold in fibromyalgia – estudo transversal submetido para a Molecular Pain.*

2. *Melatonin analgesia is associated with improve of descendent endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: A phase II, randomized, double-dummy, controlled trial – RCT submetido ao BMC Pharmacology and Toxicology.*

A estrutura da apresentação da 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.

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

A revisão da literatura centrou-se nas seguintes palavras-chave: 1) *fibromyalgia*; 2) *melatonin*; 3) *antidepressant*; 4) *amitriptyline*; 5) *brain derived neurotrophic factor* (BDNF); 6) *S100B*; 7) *conditioned pain modulation* (CPM); 8) *diffuse noxious inhibitory control* (DNIC); 9) *central sensitization* (CS) e 9) *descending pain inhibitory system*. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (site PubMed), LILACS, SCIELO, e COCHRANE. Também foi consultado o banco de teses da CAPES, cujos termos foram traduzidos para o português: 1) fibromialgia; 2) melatonina; 3) antidepressivo; 4) amitriptilina; 5) fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); 6) S100 beta; 7) modulação da dor condicionada (CPM); 8) controle inibitório nocivo difuso (DNIC); 9) sensibilização central (CS) e 9) sistema inibitório descendente da dor.

Em relação ao termo *fibromyalgia* foram encontrados 7861 artigos no PUBMED, 365 no LILACS, 200 no SCIELO e 1 no banco de teses da CAPES. Usando o termo *melatonin* foram localizados 18898 artigos no PUBMED, 169 no LILACS, 100 no SCIELO e 33 no banco de teses da CAPES. Em relação ao *antidepressant* foram encontrados 30337 no PUBMED, 230 no LILACS e 243 no SCIELO e 0 na CAPES. Com as expressões *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *S100B* e *CPM* foram localizados, respectivamente, 10863, 1533 e 4429 artigos no PUBMED.

Cruzando as palavras-chave *fibromyalgia* e *melatonin*, foram vistos 26 artigos somente no PUBMED, sendo que apenas dois deles eram RCTs controlados. Ao se

cruzar *fibromyalgia*, *melatonin*, *antidepressant*, BDNF, S100B e CPM não foi visto nenhum artigo nos quatro bancos de dados citados.

A tabela 1 sumariza a estratégia de busca das referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos do estudo.

Tabela 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas.

Palavras-chave	PubMed	Cochrane	LILACS	SciELO	Capes
“fibromyalgia”	7861	1016	365	200	21
“melatonin”	18898	8363	169	100	33
“antidepressant”	30337	6714	230	243	42
“amitriptyline”	8053	2067	107	45	5
“BDNF”	10863	116	43	28	50
“S100B”	1533	62	10	1309	9
“CPM”	4429	250	93	85	0
“DNIC”	334	18	1	1	0
“central sensitization”	1572	202	48	31	40
“descending pain inhibitory system”	308	20	2	3	0
“fibromyalgia” and “melatonin”	26	2	0	0	33
“fibromyalgia” and “antidepressant”	127	47	0	0	42
“fibromyalgia” and “amitriptyline”	131	63	0	0	5
“fibromyalgia” and “BDNF”	8	0	0	0	50
“fibromyalgia” and “S100B”	0	0	0	0	9
“fibromyalgia” and “CPM”	5	1	0	0	0
“fibromyalgia” and “DNIC”	14	1	0	0	0
“fibromyalgia” and “central sensitization”	154	11	0	0	40
“fibromyalgia” and “descending pain inhibitory system”	2	0	0	0	0
“fibromyalgia” and “melatonin” and “antidepressant”	4	0	0	0	42
“fibromyalgia” and “amitriptyline” and “antidepressant”	13	8	0	0	33
“fibromyalgia” and “melatonin” and “amitriptyline”	0	0	0	0	5
“fibromyalgia” and “melatonin” and “central sensitization”	0	0	0	0	0
“fibromyalgia” and “melatonin” and “descending pain inhibitory system”	0	0	0	0	0

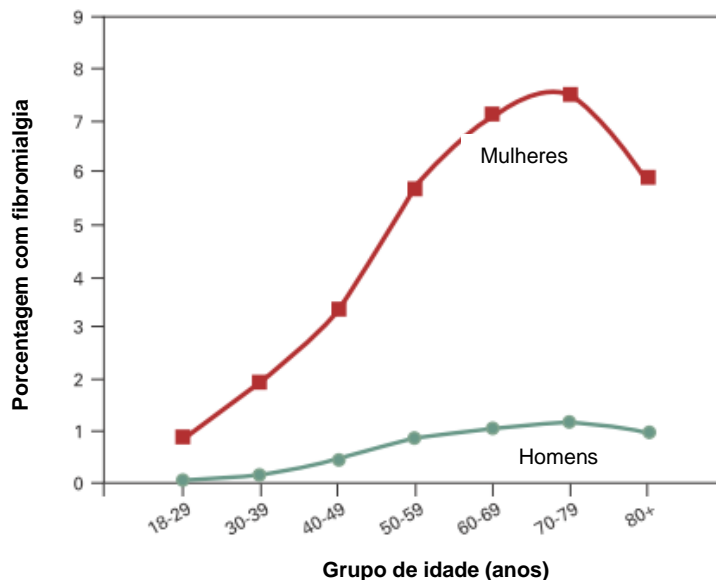
BDNF: *brain derived neurotrophic factor*; CPM: *conditioned pain modulation*; DNIC: *diffuse noxious inhibitory system*. As palavras-chave dessa tabela estão em inglês para fins práticos. Na pesquisa desses termos no site da CAPES, deve ser considerada a

tradução para o português descrita no texto.

2.2 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CONCEITUAIS

Como dito anteriormente, a FM é uma síndrome de dor difusa cuja etiologia ainda não está totalmente estabelecida (39, 40). Com prevalência que varia de 1,6% (3) a 6,4% (4), é mais frequente em mulheres, com uma relação homem/mulher de 1:10. O pico ocorre dos 30 aos 50 anos (41), aumentando progressivamente com a idade (42, 43). Baixo nível educacional, baixa renda familiar (44, 45) e obesidade (46, 47) são fatores associados (figura 1).

Figura 1: Epidemiologia da fibromialgia na população geral



Legenda: Adaptado de Wolfe F, *et al.* (40)

A FM é caracterizada por dolorimento musculoesquelético generalizado e crônico (duração superior a 3 meses), localizado nas partes superior e inferior do corpo (48). Outros sintomas clínicos concomitantes incluem sensação de rigidez matinal de longa duração, fadiga, fraqueza subjetiva, depressão, ansiedade, cefaleia, dificuldades com a memória e concentração, síndrome do cólon irritável e sono não reparador (2). As alterações de sono atingem uma prevalência de 70-90% em pacientes fibromiálgicos

(39, 40, 49), em comparação a 10-30% em indivíduos normais (50).

A FM cursa com dor crônica e incapacitante, por muitos séculos foi denominada simplesmente reumatismo ou reumatismo muscular. Outro termo usado para defini-la foi fibrosite, cunhado por Gowers em 1904. Em 1976, passou a ser denominada fibromialgia, após a descrição dos *tender points* e sua associação à dor difusa. Já na década de 80, surgiram os primeiros RCTs usando critérios diagnósticos mais bem definidos (51).

Na década subsequente, o *American College of Rheumatology* (ACR) publicou os critérios para classificação da síndrome fibromiálgica (48), com presença de dor difusa associada com dolorimento em 11 ou mais de 18 pontos sensíveis (*tender points*) específicos, cuja localização é descrita abaixo (figura 2):

1. Occipital bilateral: na inserção do músculo suboccipital
2. Região cervical baixa bilateral: no aspecto anterior dos espaços intertransversos, entre C5-7
3. Trapézio bilateral: ponto médio do bordo superior escapular
4. Supraespinhoso bilateral: origem desse músculo acima da crista espinal escapular, próxima ao seu bordo
5. Justalateral à junção costochondral ao nível da 2^a costela, bilateralmente
6. Epicôndilo lateral bilateral: a 2 cm distalmente dos epicôndilos
7. Glúteo bilateral: no quadrante externo-superior das nádegas
8. Trocânter maior bilateral: posterior ao trocânter
9. Joelho bilateral: gordura medial dos joelhos, proximal à linha média

Figura 2: *Tender Points*.



Legenda: A figura especifica os locais dos tender points a partir dos critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR). Adaptação do quadro “As Três Graças” do Barão Jean-Baptiste Regnault, 1793, Musée du Louvre, Paris (48)

Esses critérios apresentam sensibilidade de 88,4% e especificidade de 81,1% para distinção de outras condições dolorosas (48). Ainda mais recentemente, esses critérios foram revisitados por Wolfe *et al.* e desenvolvido um sistema para o diagnóstico da FM que não se baseia na palpação dos *tender points* (2). No entanto, a

gravidade dos sintomas passou a ter grande relevância, aspecto não considerado no *American College of Rheumatology* 1990. De acordo com os critérios revisados, a FM é diagnosticada se os pacientes apresentarem as três condições a seguir mencionadas:

1. Índice de dor difusa (WPI) igual ou superior a 7 e escore na escala de gravidade dos sintomas (SS) igual ou superior a 5 ou WPI 3-6 e escala SS igual ou superior a 9.
2. Os sintomas devem estar presentes há pelo menos 3 meses.
3. O paciente não pode apresentar outra patologia capaz de explicar o quadro doloroso.

Para determinar o índice de dor difusa, o paciente é questionado em quantas áreas teve dor na última semana, a saber: cintura escapular direita e esquerda, braço direito e esquerdo, antebraço direito e esquerdo, quadril (glúteos, trocânter) direito e esquerdo, coxa direita e esquerda, perna direita e esquerda, mandíbula direita e esquerda, tórax, abdômen, regiões dorsal, lombar e cervical. Cada região equivale a um ponto no escore. A soma total dos escores varia de 0 a 19.

A escala de gravidade dos sintomas é determinada pela soma da gravidade de três sintomas: fadiga, sintomas cognitivos e cansaço ao despertar. O paciente deve responder sobre o grau de gravidade destes sintomas na última semana: 0=sem problemas; 1= problemas leves; 2= problemas moderados, consideráveis; 3=problemas contínuos, generalizados (o escore varia de 0 a 9). A escala também leva em conta a presença de sintomas somáticos em geral, tais como dor muscular, síndrome do cólon irritável, fadiga/cansaço, ruminação, fraqueza muscular, cefaleia, dor ou cólicas abdominais, dormência/formigamento, tonturas, insônia, depressão, constipação, dor abdominal alta, náuseas, nervosismo, dor torácica, visão borrada, febre, boca seca, chiado, prurido, diarreia, chiado, fenômeno de Raynaud, urticária, vergões, zumbido,

vômitos, queimação cardíaca, úlceras orais, perda ou alteração do paladar, perda de apetite, convulsões, olho seco, dispneia, fotossensibilidade, *rash* cutâneo, dificuldades de audição, alopecia, micção dolorosa, espasmos na bexiga, facilidade para fazer equimoses. O médico avalia a presença desses sintomas por uma escala: 0= sem sintomas; 1= poucos sintomas; 2= moderado número de sintomas; 3= grande quantidade de sintomas. O escore da gravidade dos sintomas final (gravidade dos sintomas mais presença de sintomas somáticos) varia de 0 a 12.

Esses novos critérios não visam substituir os de 1990, mas representam um método diagnóstico alternativo.

A concomitância de alterações radiográficas, anormalidades laboratoriais (1), ou de uma segunda condição patológica não exclui o diagnóstico de FM (52, 53). Assim, os pacientes podem ser acometidos de FM e artrite reumatoide ou osteoartrose simultaneamente. O diagnóstico diferencial da FM inclui hipotireoidismo, artrite, polimialgia reumática, osteomalacia, miopatias inflamatórias e metabólicas, espondiloartropatias, radiculopatias e dor cardíaca ou pleurítica (54). Também se deve diferenciar a FM, invariavelmente disseminada, da síndrome dolorosa miofascial, na qual a dor fica confinada a uma região do corpo, exceto quando regiões estão afetadas ao mesmo tempo (55).

A presença do sono não reparador associada à FM também tem sido estudada. Há evidências de que o padrão de sono apresenta latência prolongada, baixa eficiência, aumentada quantidade de sono não REM (*Rapid Eye Movement*) e aumento da frequência de despertares noturnos (56). Disfunções na fisiologia do EEG (eletroencefalograma) do sono são frequentes em portadores de FM, como presença de ondas alfa (7,5 - 11Hz) durante o sono não REM, fenômeno denominado sono alfa-delta. Normalmente, a frequência alfa ocorre no EEG durante o estado de alerta. A onda

alfa desaparece quando o sono inicia, sendo então substituída por frequências baixas, delta, que caracterizam estágios específicos dos sonos REM e não REM. O ritmo alfa reaparece com o despertar do sono. A persistência de ondas alfa durante o sono não REM foi demonstrada em portadores de FM, durante os estágios 1, 2, 3 e/ou 4 dessa fase do sono. Tais achados fazem supor que as desordens desse sistema estão relacionadas ao sono não reparador, mialgia difusa, alterações do humor e presença de múltiplos pontos dolorosos distribuídos em áreas específicas (57, 58).

Muitos sintomas associados à FM, tais como dificuldade de dormir, fadiga, mialgias, queixas gastrointestinais e diminuída função cognitiva, são similares àqueles observados em indivíduos com dessincronização do marca-passo circadiano, nos que experimentam *jet-lag* e nos trabalhadores noturnos ou com rotação de turnos (59). Os sintomas mais frequentes da dessincronização são disforia, irritabilidade e alteração do apetite, do sono e da termorregulação. Em animais têm sido demonstrada associação entre a sincronização do sono e o limiar nociceptivo. Tanto os reflexos espinhais nociceptivos monossinápticos quanto os polissinápticos, quando comparados com o período acordado, são mais estáveis durante o sono sincronizado. No entanto, durante o sono dessincronizado, ambos os reflexos são mais instáveis e o limiar para evocar reflexos frente aos estímulos nociceptivos fica diminuído (60).

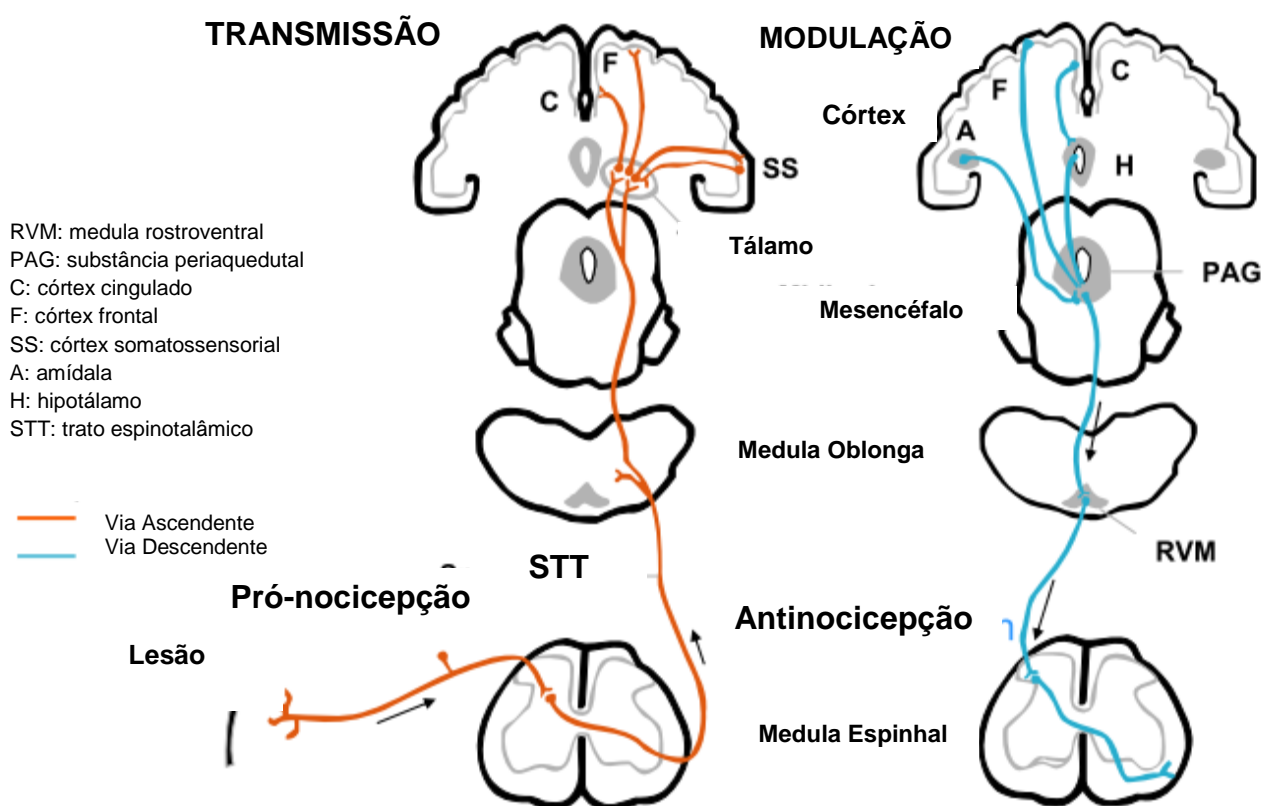
Na FM, o processo de produção da dor parece estar alterado em diversos níveis. Apesar de sua fisiopatologia não estar completamente elucidada, estudos sugerem que seu processo seja multifatorial, tais como predisposição genética (61-63), disfunção do sistema nervoso periférico (64) e alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e do sistema nervoso autônomo (65, 66). A sensibilização central (67) associada à perda da capacidade da via inibitória descendente da dor (10, 68) e concomitantes alterações de substâncias envolvidas nestes processos (29, 69-74) parecem ter um papel

fundamental no processo da doença.

2.3 PROCESSAMENTO FISIOLÓGICO DA DOR: PRÓ-NOCICEPÇÃO E ANTINOCICEPÇÃO

A nociceção é regulada através de um processo de facilitação (pró-nociceção) ou inibição (antinociceção) (9, 75, 76) (figura 3). Enquanto que o circuito inibitório nociceptivo contribui para a analgesia, a via facilitatória e sua ativação sustentada parece ser a base de certos estados de dor crônica (77-79).

Figura 3: Representação da pró-nociceção e anti-nociceção

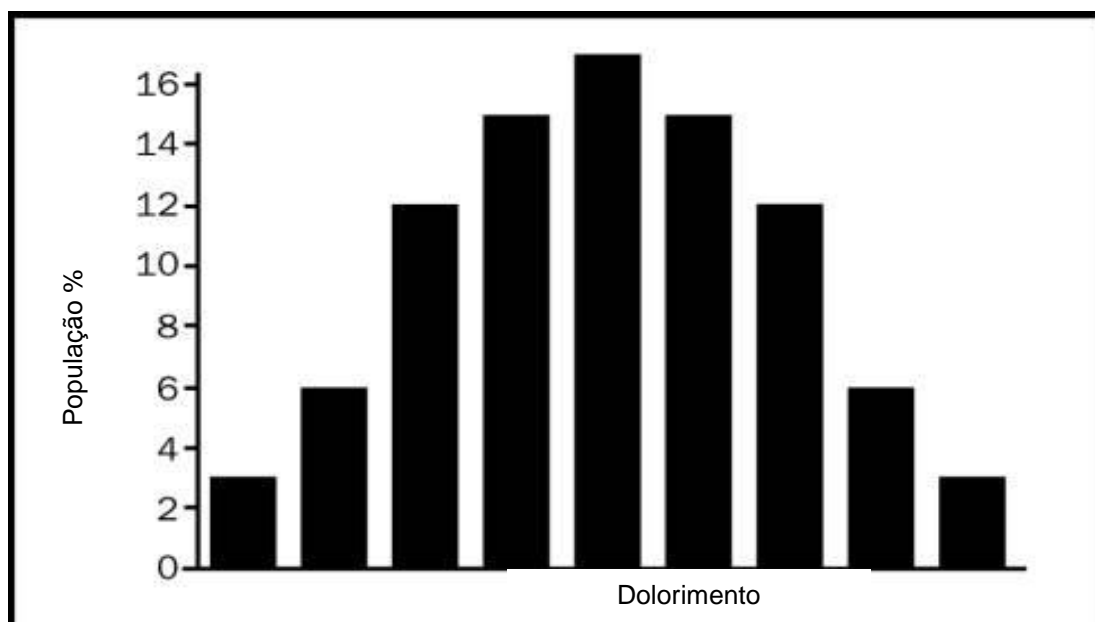


Fonte: Adaptado de Hoffman GA, Harrington A. e Fields HL (80).

2.3.1 PRÓ-NOCICEPÇÃO:

No seu processamento normal, a percepção da dor envolve dois principais grupos de vias neurais: ascendente e descendente. Nervos periféricos transmitem sinais sensoriais, incluindo sinais nociceptivos (indutores de dor) para a medula espinhal e, então, para o cérebro, onde são processados através da via nociceptiva ascendente. Sinais nociceptivos são emitidos quando receptores especializados dos nervos periféricos, os nociceptores, são ativados por estímulos como temperatura, pressão ou impacto (81). Esse mecanismo indutor facilitatório da dor também é chamado de pronocicepção (9). Na população geral, a percepção da dor apresenta uma distribuição normal (81) (figura 4).

Figura 4: Sensibilidade à dor na população geral



Fonte: Adaptada de Clauw *et al.* (81)

Nesse processo, uma lesão evidente desencadeia a cascata de eventos nas vias

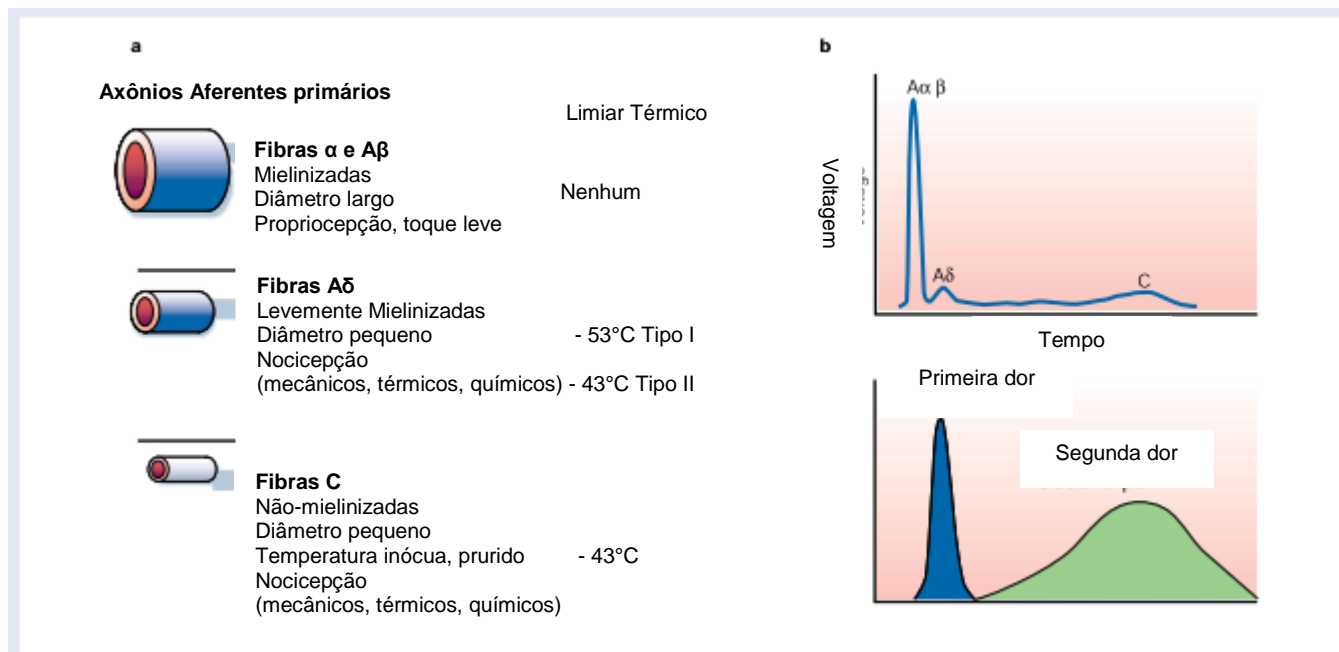
da dor, cujos estímulos são captados por nociceptores (mecano-termo-receptores e os receptores polimodais), e a informação, pelo processo de transdução, gera um potencial de ação de membrana conduzido aos neurônios de primeira ordem situados no gânglio da raiz dorsal (DRG), aos neurônios de segunda ordem localizados no corno dorsal da medula espinhal (DHSC), aos neurônios de terceira ordem localizados no tálamo (17) e aos de quarta ordem localizados no córtex.

Os nervos periféricos são constituídos de fibras aferentes mielinizadas grossas (α e $A\beta$), mielinizadas de pequeno calibre ($A\delta$) e amielínicas de pequeno calibre (C). A condução dos sinais nociceptivos é mediada pelos dois últimos tipos. A velocidade de condução dessas fibras está diretamente relacionada ao seu diâmetro:

1. Fibras $A\delta$: nociceptores termomecânicos de alto limiar, cujo potencial de ação é rapidamente conduzido, as fibras $A\delta$ medeiam a primeira dor, um evento protetivo que capacita o organismo a localizar a dor rápida e precisamente, ativando reflexos de retirada que visam evitar ou reduzir o dano tecidual adicional (82). O potencial de ação conduzido pelas fibras $A\delta$ adentra o corno dorsal da medula espinhal através das lâminas I, V e X (83).

2. Fibras C: estímulos neuroquímicos ativam nociceptores polimodais (que respondem a vários tipos de estímulos) presentes nos tecidos. O potencial de ação, então, é conduzido mais lentamente, através das fibras finas C até as lâminas II e III do corno dorsal da medula espinhal (83, 84). Esse fenômeno caracteriza a segunda dor, que ocorre posteriormente ao evento nocivo (cirurgia, trauma, inflamação) e visa ativar comportamentos de proteção da área lesada, auxiliando na resolução da lesão (82) (figura 5).

Figura 5: Axônios aferentes primários (a); velocidade de condução e potencial de ação (b).



Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum (84)

Estímulos supraliminares e potencialmente lesivos ativam esses nociceptores, com liberação de mediadores químicos pelos tecidos lesados, macrófagos, terminações nervosas e células endoteliais vasculares, tais como bradicinina (BK), acetilcolina, leucotrienos, prostaglandinas (PGI e PGE₂), peptídeo gene relacionado à calcitonina (CGRP), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), fator de ativação plaquetário, interleucinas (IL-1, IL-6), 5-hidroxitriptamina (5-HT), histamina, substância P (SP), radicais ácidos, íons potássio (K⁺), tromboxane, fator de crescimento nervoso (NGF) e monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (84, 85). Tais mediadores desencadeiam alterações vasculares (vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular) e inflamatórias (humoral e celular), sensibilizando os nociceptores ou reduzindo seu limiar de excitabilidade (84). Essa cascata de eventos periféricos, devido à sensibilização de terminações nervosas nociceptivas, é chamada de hiperalgesia primária e ocorre no sítio da lesão. A hiperalgesia secundária, por sua vez, ocorre em

áreas adjacentes ou remotas do local da lesão e depende de alterações no processamento da informação sensitiva no sistema nervoso central. Enquanto que sua indução requer atividade das fibras nociceptoras, sua manutenção é independente desse processo (86).

Uma vez adentrando o corno dorsal da medula espinhal, a informação nociceptiva proveniente das fibras A δ e C estimula neurônios de segunda ordem localizados nas lâminas I, II, V e VI. Dentre esses neurônios estão os *Wide Dynamic Range* (WDR), que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, e os neurônios nociceptores específicos (NS). Os WDR respondem a estímulos dolorosos (fibras A δ e C) e não-dolorosos (A β), exercendo um papel fundamental nos mecanismos inibitórios de supressão da dor (87). Ao contrário dos WDR, os neurônios NS são predominantemente ativados por estímulos dolorosos provenientes das fibras A δ e C (88). Esses neurônios do corno dorsal da medula espinhal, além de receberem estímulos excitatórios dos nociceptores, são influenciados por sinapses inibitórias e por células microgliais (89).

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

1. Quando uma descarga de curta duração ou baixa frequência chega ao terminal pré-sináptico, apenas o glutamato é liberado. Na ausência de SP, o glutamato abre os canais para AMPA (*α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) e cainato, resultando em uma despolarização de curta duração da membrana do neurônio pós-sináptico, devido ao influxo de íons sódio (Na⁺) para o interior da célula. Subsequentemente à cessação do estímulo, o neurônio volta a seu estado prévio de excitabilidade. Nesse processo de ativação normal, canais NMDA (N-metil-D-aspartato) permanecem fechados, bloqueados por íons magnésio (Mg²⁺) (90, 91). A maioria das sinapses AMPA com a superfície do neurônio central é inefetiva ou silente.

Um nervo pode ter muitas sinapses silentes com neurônios em segmentos adjacentes. Uma situação patológica pode tornar tais sinapses ativas, levando à formação de novas conexões do neurônio com a periferia, mecanismo que parece ser fundamental no processo de sensibilização central (92) e formação da dor difusa.

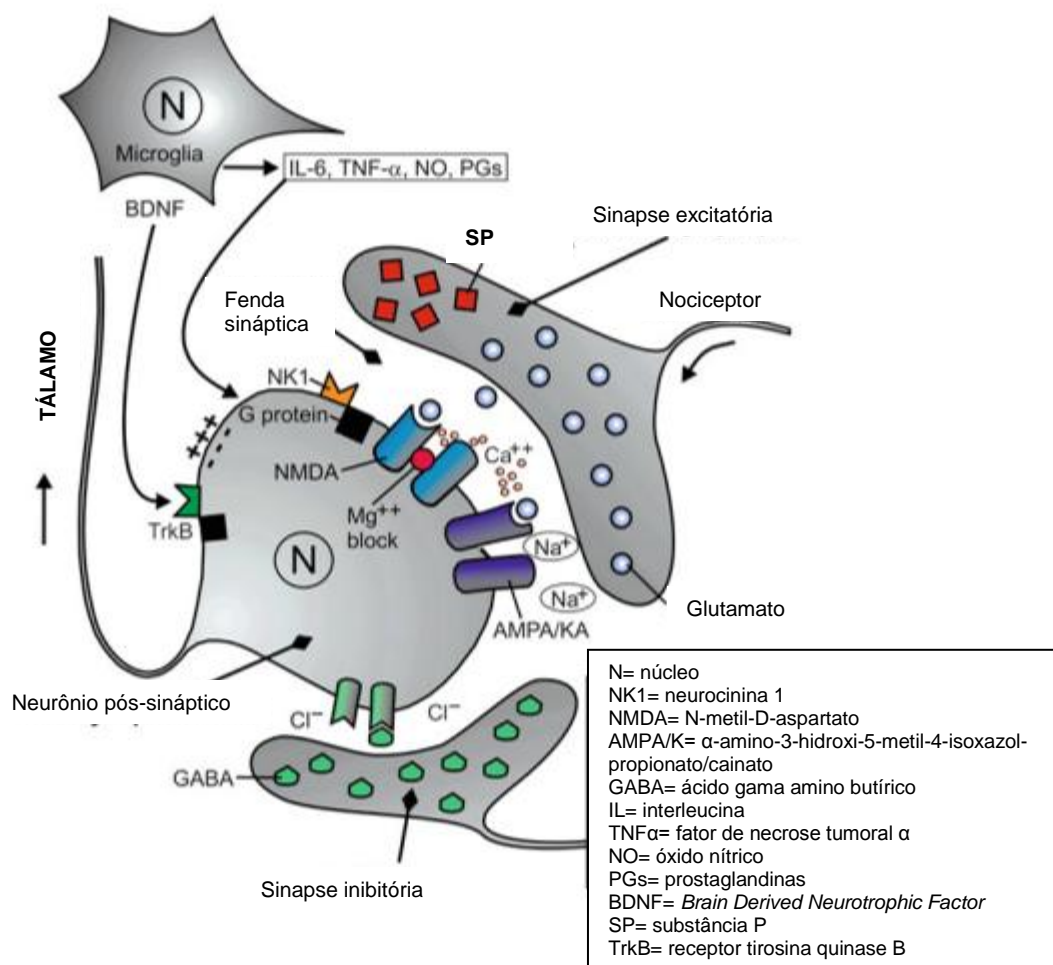
2. Quando um estímulo prolongado ou de alta frequência adentra a terminação pré-sináptica nociceptora, glutamato e SP são liberados juntos. Ao ligar-se ao receptor metabotrópico proteína-G (trifosfato de guanósina – GTP) acoplado, neurocinina 1 (NK1), a SP ativa uma cascata intracelular, levando à formação de quinases e despolarização de longa duração dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Simultaneamente, o acúmulo intracelular de Na^+ despolariza a membrana e há um influxo de cálcio (Ca^{2+}) para o interior da célula com deslocamento do Mg^{2+} e abertura do canal NMDA. Caso se prolonguem, os eventos levam à sensibilização dos neurônios pós-sinápticos (90, 91) (figura 6).

Ainda no corno dorsal da medula espinhal, os axônios desses neurônios decussam para o outro lado e transmitem o estímulo nociceptivo pelos tratos espinotalâmico (STT) e espinoreticular para o tronco cerebral e tálamo, e então para o córtex somatossensorial primário (SI) e secundário (SII), para a ínsula e para o córtex cingulado anterior (ACC) (9). Neurônios talâmicos distribuem a informação nociceptiva para o SI, onde o aspecto sensório-discriminativo da dor é processado; e o SII, que parece ter um importante papel no reconhecimento, aprendizado e memória de eventos dolorosos. A ínsula tem sido proposta por estar envolvida nas reações autonômicas ao estímulo doloroso e aspectos afetivos da memória e aprendizado relacionados à dor. O ACC está intimamente relacionado ao desprazer da dor e pode auxiliar na integração do afeto geral, cognição e seleção da resposta (93).

A primeira dor parece estar associada à ativação do córtex SI, enquanto a

segunda está intimamente relacionada à ativação do ACC. Tais achados provavelmente refletem as diferentes funções biológicas de cada tipo de dor, onde a primeira dor sinaliza o dano e provê precisa informação sensorial para uma imediata retirada, enquanto a segunda é mais duradoura e motiva respostas comportamentais para limitar ainda mais a lesão e otimizar a recuperação (82).

Figura 6: Disposição basal de contatos sinápticos no neurônio nociceptor do corno posterior da medula espinal (DHSC).



Legenda: A fibra aferente de um nociceptor (fibras A δ mielínicas e C amielínicas) forma um amplo terminal espinal (acima, à direita). Figura adaptada de Mense e Gerwin (89).

2.3.2 ANTINOCICEPÇÃO

Paralelamente ao processo de transmissão ascendente da dor, vias modulatórias descendentes enviam sinais facilitatórios e inibitórios a partir do cérebro para a medula espinhal e periferia, aumentando ou inibindo os sinais nociceptivos ascendentes. Sinais dessas vias são mediados e propagados por um número de neurotransmissores e neuroquímicos (por exemplo, NA e 5-HT) (9, 94).

As vias descendentes se originam de diferentes áreas cerebrais, incluindo a PAG (75), o núcleo magno da rafe, as estruturas adjacentes da medula rostral ventro-medial (RVM) (95, 96), o hipotálamo e as estruturas corticais. Elas modulam a entrada sensorial das fibras aferentes e dos neurônios de projeção do corno dorsal da medula espinhal (16), ativam comportamentos reflexos e protetivos subsequentes (97) e influenciam grandemente a percepção da dor.

Há centenas de anos sabe-se que dor inibe dor, um fenômeno conhecido como contrairritação (98). Mais recentemente, bases fisiológicas desse fenômeno foram identificadas: a aplicação de estímulos dolorosos ativa um sistema analgésico endógeno envolvendo o controle supraespinal descendente da atividade nociceptiva do corno dorsal da medula espinhal. Esse fenômeno foi chamado *diffuse noxious inhibitory control* ou DNIC e sua base fisiológica na medula espinhal tem sido extensivamente estudada em animais anestesiados (99, 100). Não obstante, quando estímulos dolorosos competindo são testados em humanos conscientes, outros sistemas de modulação da dor, como a distração, podem entrar em ação na modulação da dor, motivo pelo qual um grupo de pesquisadores sugeriu o termo *conditioned pain modulation* (CPM) a ser usado em estudos com humanos para evitar uma implicação mecanicista (10).

Na CPM ocorre uma poderosa e seletiva inibição difusa dos neurônios WDR no corno dorsal da medula espinhal através de estímulo heterotópico condicionante aplicado em áreas remotas do corpo, com ativação de fibras nociceptivas A δ e/ou C

(99-101). A CPM em humanos é tipicamente estudada pela mensuração da intensidade da dor percebida por um breve estímulo teste, antes, durante e, às vezes, após a aplicação de um estímulo condicionante em outra área do corpo. A CPM é observada quando há redução da intensidade da dor percebida no estímulo teste, quando na presença de um estímulo heterotópico (contralateral) doloroso condicionante. O fenômeno é mais eficiente quanto maior for a supressão da dor percebida no estímulo teste (102). Em pessoas hígdas, esse processo é ativado em resposta ao estímulo doloroso agudo, o que leva à diminuição difusa da sensibilidade dolorosa através do aumento do limiar nociceptivo (8). O fenômeno é preditivo de dor pós-operatória aguda e crônica, bem como tem sido associado com níveis de dor neuropática (10). A resposta da CPM em humanos é parcialmente mediada pelo sistema opioide descendente (103) e, em parte, pelas vias serotoninérgicas e noradrenérgicas (101, 104-106).

O sistema antinociceptivo descendente usa peptídios opioides endógenos e GABA (ácido gama amino-butírico) como neurotransmissores inibitórios. Um efeito antinociceptivo ocorre após administração intratecal na medula espinhal de antagonistas dos receptores do glutamato (AMPA/cainato e *metabotropic glutamate receptor type I*- mGluR1), fenômeno que é revertido pela administração de antagonistas seletivos opioides no núcleo acumbens (107). Também a administração de antagonistas dos receptores μ -opioides, K-opioides, GABA-A, GABA-B e glicina no núcleo acumbens de ratos significativamente diminuiu a analgesia induzida por estímulo doloroso heterotópico, o que sugere que o estímulo nociceptivo periférico faça liberar essas substâncias na medula espinhal, inibindo a atividade pró-nociceptiva e ativando a antinocicepção (103).

Quando a atividade do neurônio encefalinérgico é aumentada, há inibição da atividade neuronal gabaérgica e desinibição do neurônio que se projeta caudalmente

para a formação reticular lateral e o núcleo magno da rafe. A inibição dos neurônios espinotalâmicos na medula espinhal é feita principalmente pela 5-HT, que é liberada por fibras do núcleo magno da rafe. Há ainda conexões do locus ceruleus para o núcleo magno da rafe que utilizam NA como neurotransmissor inibitório (16).

O GABA, por sua vez, age através da abertura de canais de cloro (Cl^-) na membrana neuronal, o que leva a um influxo de cargas elétricas negativas nos neurônios do trato espinotalâmico e, conseqüentemente, a uma hiperpolarização, a qual diminui a excitabilidade do neurônio pós-sináptico, inibindo a transmissão da dor. Os íons Cl^- são removidos da célula por um transportador K^+/Cl^- que troca K^+ pelo Cl^- . Em condições patológicas, o transportador pode não funcionar corretamente e íons Cl^- acumulam-se nos neurônios do trato espinotalâmico. Quando o canal de Cl^- é aberto novamente pelo GABA, os íons Cl^- deixam a célula e causam despolarização, em vez de hiperpolarização. Assim, o neurônio pós-sináptico pode ser excitado por GABA, isto é, o clássico neurotransmissor inibitório GABA passa a atuar como excitatório (89).

2.4 PROCESSAMENTO FISIOPATOLÓGICO DA DOR NA FIBROMIALGIA

A FM compartilha muitos sintomas com a dor neuropática crônica, tais como alodinia (dor provocada por estímulos inócuos) e hiperalgesia (aumento da intensidade e duração da dor evocada por estímulos normalmente dolorosos) da pele e músculos (108), devido ao fato de que as duas principais vias de processamento da dor operam anormalmente, resultando na amplificação da sinalização dolorosa.

O modelo fisiopatológico mais aceito na fisiopatogenia da FM é a existência de um desequilíbrio entre os mecanismos de pró-nociceção e antinociceção (109).

Segundo esse modelo, há uma diminuição global das vias inibitórias relacionadas à dor (68, 110) e/ou hiperalgesia secundária, a qual depende de mecanismos de sensibilização central (67, 111). Adicionalmente, níveis anormais de neurotransmissores e neuromoduladores (ou seus metabólitos) são encontrados no líquido cefalorraquidiano de fibromiálgicos. As concentrações de SP estão significativamente aumentadas no líquido cefalorraquidiano desses pacientes, quando comparados a controles saudáveis (69-71, 112-114). Também baixos níveis de metabólitos de aminas biogênicas (noradrenalina, serotonina, dopamina) (14, 115, 116) e altos níveis de fator neurotrófico de crescimento (NGF) (72), um facilitador da produção de SP, são encontrados na FM. Juntas, essas alterações permitem que estímulos de baixa intensidade ou não nociceptivos sejam processados em estruturas pré-corticais e corticais envolvidas no processo afetivo e cognitivo da dor (117), resultando em aumento na percepção dolorosa.

2.4.1 SISTEMA MODULATÓRIO DESCENDENTE NA FIBROMIALGIA

Nas síndromes de dor crônica, dentre as quais a FM, a atividade do sistema analgésico descendente é frequentemente prejudicada ou ausente (118), o que é refletida pela reduzida eficiência da CPM. A expressão perda da analgesia descendente sintetiza esse processo e é sinônimo de perda da CPM (10, 119).

A CPM apresenta baixa eficiência em pacientes fibromiálgicos, ou seja, o limiar doloroso encontra-se diminuído e não há supressão do estímulo teste pelo estímulo heterotópico condicionante, quando comparados aos controles saudáveis. Esses achados representam uma falha no mecanismo de analgesia produzido pelo estímulo doloroso condicionante (6, 68, 110, 120, 121). O estudo de Julien *et al.*, controlado para os

efeitos da distração e habituação, demonstrou limitada CPM na FM (6), sugerindo que este fenômeno está danificado nesses pacientes (tabela 2). Contrariamente a essa hipótese, a CPM e outros sistemas inibitórios da dor podem estar ativados na FM e a falência em demonstrar os seus efeitos pode representar um efeito teto, no qual esses sistemas ativados não podem ser sobrecarregados por manipulações experimentais (8). Adicionalmente, a distração pode também ter um efeito inibitório nociceptivo em humanos, e alguns pesquisadores sugerem que na FM há uma alteração no foco de atenção, com aumento da vigilância para estímulos desprazerosos (122, 123).

Tabela 2: *Controlled Pain Modulation* (CPM) e Fibromialgia (FM)

Referência	Ano do Estudo	Número de Pacientes	Número de Controles	Estímulo Teste (doloroso)	Estímulo Heterotópico Doloroso Condicionante	Achados
Normand <i>et al.</i> (121)	2011	29	26 MDD 40 HC	Calor aplicado por termodo	Frio (doloroso)	CPM diminuída em FM; semelhante entre HC e MDD
Julien <i>et al.</i> (6)	2005	30	30 NC 30 CLBP	Água gelada	Água gelada (doloroso)	CPM diminuída em FM; não em CLBP
Staud <i>et al.</i> (124)	2003	11	22 mulheres 11 homens	<i>Wind Up</i>	Água quente (doloroso)	CPM diminuída em mulheres (HC e FM)
Kosek e Hansson (68)	1997	10	10	CT, WT, HPT, CPT	Torniquete	CPM diminuída em FM
Lautenbacher e Rollman (110)	1997	25	26	Limiar elétrico doloroso Limiar elétrico não doloroso	Calor tônico doloroso ou inócuo, aplicado por termodo	CPM diminuída em FM Nenhuma diferença

CLBP: dor lombar crônica; CT: limiar de percepção ao frio; CPT: limiar doloroso ao frio; HC: indivíduos controles saudáveis; HPT: limiar de dor ao calor; MDD: transtorno depressivo maior; WT: limiar de percepção do calor. Observação: nos artigos originais, o termo DNIC (*diffuse noxious inhibitory control*) foi usado, porém, nesta tese optou-se pela terminologia atualizada de CPM (10)

Na FM a atividade opioidérgica parece estar normal ou mesmo aumentada, uma vez que a concentração de encefalinas no líquido cefalorraquidiano é três vezes maior nesses pacientes quando comparados a controles saudáveis (125). Um estudo com imagens corrobora esses achados, mostrando diminuída disponibilidade dos receptores μ -opioides em múltiplas áreas de processamento da dor em pacientes com FM, o que sugere haver aumento da liberação de ligantes endógenos μ -opioides levando a uma maciça ocupação basal desses receptores (126), uma tentativa de reduzir a dor após prolongada estimulação. A atividade aumentada ou intacta do sistema opioidérgico na FM é consistente com a experiência clínica limitada do uso de opioides nesses pacientes (127-129).

Por outro lado, há uma diminuição das atividades serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica na FM. Metabólitos da noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) (13) e dopamina (DA) (115, 116, 130) estão baixos no líquido cefalorraquidiano, ao passo que a 5-HT, seu precursor, o L-triptofano, e o metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) apresentam níveis séricos também reduzidos nesses pacientes (131). A deficiência desses mecanismos é suportada pela eficácia do uso de medicamentos que simultaneamente aumentam a NA e a 5-HT (tricíclicos, duloxetina, milnacipram, tramadol) na FM. Esses achados sugerem que indivíduos fibromiálgicos com limitada CPM apresentam, principalmente, déficit na atividade serotoninérgica e noradrenérgica ao invés de atividade opioidérgica diminuída.

2.4.2 SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL NA FIBROMIALGIA

A sensibilização central (CS) apresenta basicamente três tipos de alterações: 1) alterações funcionais, que se expressam pela alta responsividade dos neurônios centrais

aos estímulos dolorosos; 2) alterações metabólicas, que ocorrem não apenas nos neurônios, mas também nas células gliais; 3) alterações estruturais, que perpetuam o estado de hiperexcitabilidade. Os três estados acontecem quase simultaneamente (89).

Na sensibilização central há incremento da função neuronal e dos circuitos das vias nociceptivas, causado por aumento na excitabilidade das membranas e eficácia sináptica, com difusão da hiperalgesia secundária em vários segmentos da medula espinal (118), bem como reduzida inibição. Ela está associada com o aumento da atividade espontânea dos neurônios do corno dorsal da medula espinal, incremento da resposta aos estímulos nociceptivos e não nociceptivos e alargamento do campo receptivo (132): um estado de facilitação, potencialização ou amplificação. Tais alterações são manifestações de marcável plasticidade do sistema nervoso somatossensorial em resposta à atividade, inflamação e lesão neurais (7).

A sensibilização central parece ser consequência da lenta somação temporal da segunda dor nos neurônios do corno dorsal da medula espinal. Somação temporal (TS) refere-se ao progressivo aumento na descarga do potencial de ação de um nociceptor no corno dorsal da medula espinal, em resposta a estímulos repetidos de igual intensidade de nociceptores da periferia (108), fenômeno também conhecido como *wind up* (amplificação do estímulo) (97).

O *wind up* é dependente dos estímulos das fibras C e ocorre somente se a frequência dos estímulos for igual ou superior que 0,33Hz. Os neurotransmissores envolvidos no *wind up* incluem neurotrofinas (p. ex., BDNF), aminoácidos excitatórios, taquicininas, SP, e neurocinina A, os quais levam a uma progressiva remoção do bloqueio do Mg²⁺ e ativação dos receptores NMDA nos neurônios do corno dorsal da medula espinal (133). Em situações que produzem forte e ou persistente estimulação nociceptiva, suficientes quantidades de SP e glutamato são liberadas para sustentada

despolarização dos neurônios espinhais. Na sequência deste evento, o Mg^{2+} normalmente presente no canal NMDA é removido permitindo que o Ca^{2+} adentre a célula, facilitando a transmissão do sinal doloroso. Este influxo de Ca^{2+} ativa a produção e liberação da proteinoquinase C (PKC), do óxido nítrico (NO), através da NO sintase (NOS) ativada, e de PGs, pela enzima cicloxigenase (118), resultando em aumento significativo das taxas de disparo nos terminais pré-sinápticos dos nociceptores do corno dorsal da medula espinhal, o que amplifica a entrada periférica (134, 135). Conseqüentemente há um efeito em cascata com ativação dos receptores NMDA resultando na amplificação da mensagem dolorosa que é transmitida para os centros cerebrais superiores.

Um estudo investigando o *wind up* (136) demonstrou que esse fenômeno, após uma série de estímulos repetidos de calor, foi evocado em controles saudáveis e em pacientes fibromiálgicos, porém nestes últimos, foram maiores a magnitude da resposta sensorial percebida no primeiro estímulo e o grau de somação temporal dentro da série de estímulos. As sensações tardias, detectadas 15 e 30 segundos após o término do teste, também foram maiores nesses pacientes, tanto em magnitude quanto na permanência das sensações dolorosas, o que sugere um aumento inicial e lento decréscimo posterior da entrada nociceptiva nos portadores de FM, secundário à sensibilização central. Entretanto, apesar dessa resposta anormal do *wind up* na FM, os efeitos de um antagonista dos receptores NMDA foram similares em pacientes e em controles saudáveis (133), sugerindo que outros mecanismos possam estar implicados na produção de sintomas dessa síndrome.

2.4.2.1 BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR

O BDNF é uma neurotrofina expressa nos neurônios nociceptores e é transportado anterogradamente no corno dorsal da medula espinhal para os terminais espinais dos neurônios nociceptivos (fibras C), onde permanece em densas vesículas (137). O BDNF também é liberado pela micróglia, célula envolvida no incremento da dor em estados de dor crônica (19).

Marcadores mostram que o BDNF é encontrado principalmente nos terminais nervosos das lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal, onde é armazenado junto com neuropeptídeos como SP e CGRP (17). Ele também é encontrado nos centros integrativos superiores, em várias camadas do córtex somatossensorial e nas vias descendentes relacionadas à modulação supraespinhal da dor (138, 139).

Seu papel na modulação dolorosa é suportado pela sua liberação basal medular (140) e através de estímulos elétricos em fibras C, com a participação dos receptores NMDA (141). Periféricamente, o BDNF age sensibilizando neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal por facilitar a ativação dos receptores NMDA (142).

O BDNF promove um *sprouting* dos neurônios serotoninérgicos maduros, aumentando a atividade serotoninérgica central e modulando a ativação dos neurônios do núcleo dorsal da rafe e a função transportadora serotoninérgica (143). A inflamação periférica e a atividade elétrica das fibras C estimulam sua produção no gânglio da raiz dorsal (DRG). Ambos os fenômenos aumentam os níveis de seu receptor TrkB (tirosina quinase B) nesse local. O BDNF regula a diferenciação, a sobrevivência neuronal e é um potente modulador sináptico do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico (SNP).

Nos processos da sensibilização central, a micróglia estimulada pelo ATP (trifosfato de adenosina) causa um desvio da polarização no potencial ânion reverso (E_{ânion}) em neurônios da lâmina I da medula espinhal, o qual inverte a polaridade da

corrente ativada pelo GABA, levando o neurônio à despolarização ao invés de hiperpolarização, conseqüentemente, tornando-o um neurotransmissor excitatório (pró-nociceptivo). A administração do BDNF mimetiza essa ação, enfraquecendo o sistema modulatório descendente da dor ligado ao GABA. O bloqueio da sinalização entre o BDNF e seu receptor TrkB reverte a alodinia e o desvio do E ânion secundários à lesão nervosa e ativação da micróglia pelo ATP (144).

Ele regula a integridade e diferenciação dos neurônios durante seu desenvolvimento e também está envolvido em várias funções na vida adulta, funcionando como um mecanismo adaptativo essencial no processo de potenciação sináptica de longa duração (LTP) (145) e no mecanismo de neuroplasticidade neuronal desencadeador e sustentador do processo de memória de dor. A ligação do BDNF com receptores Trk-B é essencial para a indução da potenciação sináptica de longa duração nas sinapses da primeira dor entre os nociceptores primários e os do corno dorsal da raiz espinhal (73). O aumento de BDNF incrementa a potenciação sináptica de longa duração enquanto a redução de seus níveis a atenua (146-148). A potenciação sináptica de longa duração evocada nas fibras C pode ser produzida por eletroestimulação (149) ou por estímulos dolorosos naturais sobre essas fibras (150) no dorsal da raiz espinhal. O BDNF aplicado na medula espinhal produz uma potenciação sináptica de longa duração duradoura nas fibras C, cuja fase tardia é inibida pela administração prévia de um antagonista (K252a) de seu receptor TrkB ou um eliminador do BDNF (TrkB-Fc)(149). Ao influenciar a atividade sináptica a curto e longo prazos, o BDNF regula a atividade neural e a plasticidade relacionada ao receptor NMDA em vias nociceptivas ascendentes e descendentes (151). Assim, essa neurotrofina pode regular a plasticidade sináptica e o processo de sensibilização central.

O BDNF plasmático foi encontrado significativamente aumentado em pacientes

fibromiálgicos, quando comparados a controles saudáveis pareados por idade e sexo. O aumento, porém, não foi correlacionado com tempo da doença, idade, nível de dor e escore na escala de avaliação de Hamilton para depressão ou número de *tender points* (152). Níveis séricos do BDNF também foram aumentados independentemente do sexo, da presença de depressão ou do uso de antidepressivos em baixas doses (74). No líquido cefalorraquidiano, o BDNF, o fator neurotrófico de crescimento e o glutamato mostraram-se aumentados e positivamente correlacionados na FM (73). Os resultados sugerem que o BDNF esteja envolvido no processo fisiopatológico de sensibilização central da doença.

Fica evidente que o estabelecimento da dor crônica cursa com sensibilização central, envolvendo uma série de adaptações de médio e longo prazos que levam à alteração do processo nociceptivo. Processos dolorosos crônicos, como na FM, dependem de eventos em cadeia de longo prazo, então, o BDNF poderia ser um marcador desse processo.

2.4.2.2 PROTEÍNA S100 BETA

Outro mecanismo relacionado à produção da dor crônica e à sensibilização central é a liberação de substâncias pró-inflamatórias através da ativação das células da glia (microglia e astrócitos) (18), as quais, quando ativadas, liberam substâncias pró-inflamatórias envolvidas na amplificação da dor (19), tais como citocinas (TNF alfa e IL1 β) e neurotrofinas (BDNF) (144).

A íntima relação astrócito-neurônio permite a ativação da célula glial, uma vez que ela expressa vários receptores para neurotransmissores. Entre os receptores estão os NMDAs, os não NMDAs (AMPA), bem como os receptores para o glutamato (mGluR3

e mGluR5) e a SP. Sob ativação dos astrócitos, quinases [*extracellular signal-regulated kinase* (ERK); *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)] são ativadas, o que leva a um aumento na síntese de fatores inflamatórios [interleucina1 β (IL-1 β), IL-6, TNF α , PGE2 e óxido nítrico], os quais alteram a função transportadora do glutamato e facilitam a ativação astrócito-astrócito, através da cascata de Ca²⁺ (153).

A S100B é uma proteína Ca²⁺-ligante, também produzida pelas células gliais ativadas, que age através do seu *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) e desempenha papel no metabolismo energético, na regulação do ciclo, no crescimento, na diferenciação e na motilidade celulares do sistema nervoso central (20, 154). Ela exerce efeitos tróficos ou tóxicos, dependendo da sua concentração. Em mínimas concentrações, estimula o crescimento neuronal, incrementa a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento e age como fator neurotrófico e proteína de sobrevivência neuronal, em resposta à ativação glial secundária à lesão. Por outro lado, em altas concentrações, a S100B exacerba a neuroinflamação e disfunção neuronal, com estímulo de citocinas pró-inflamatórias e indução da apoptose (21, 155). Nessas condições, a S100B aumenta a expressão da IL-1 β e do TNF alfa e ativa NF- κ B (fator nuclear de transcrição presente em neurônios glutamatérgicos e células da glia), todos envolvidos na progressão e manutenção da sensibilização central (156, 157). Altos níveis séricos de S100B também têm sido correlacionados com alterações de humor (158) e parecem ser preditores de lesão traumática cerebral (159, 160).

A expressão aumentada da S100B no cérebro tem um efeito positivo na proliferação neural e dos astrócitos (161). Em modelo de dor neuropática, a S100B mostrou-se aumentada na medula espinhal e reduziu o limiar tátil, com consequente incremento da resposta aos estímulos inócuos (21). Além disso, alterações comportamentais, tais como aumento da atividade exploratória, diminuição da

ansiedade, memória e aprendizado prejudicados, associadas às mudanças na plasticidade sináptica do hipocampo foram encontradas em camundongos S100B transgênicos (162-165). Em humanos com dor crônica infectados pelo HIV (166), a autópsia revelou aumento da expressão da S100B no corno dorsal da medula espinhal, quando comparados aos controles (infectados pelo HIV, mas sem dor crônica). Também em estudos clínicos, a S100B mostrou-se aumentada no período ictal da enxaqueca (167, 168).

Apesar de os astrócitos e a micróglia terem reconhecido papel na sensibilização central (169), mecanismo implicado na dor crônica, outros indicadores dessa atividade, além do BDNF, até o presente momento têm sido escassamente explorados na associação com FM.

2.5 TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA NA FIBROMIALGIA

A FM cursa com dor crônica difusa, que frequentemente é associada com distúrbios do sono, disfunção cognitiva e fadiga. Os pacientes comumente queixam-se de altos níveis de incapacidade e pobre qualidade de vida. A terapêutica medicamentosa deve, então, centrar-se nos sintomas e na melhora da qualidade de vida (170).

Dados o parcial entendimento da fisiopatologia e a constelação de sintomas associados com a síndrome, a escolha de um tratamento efetivo para a FM tem sido um desafio. Recentes evidências implicam o sistema nervoso central como sistema-chave na produção da dor e outros sintomas. O tratamento atual para a FM deve, então, tentar influenciar esses mecanismos centrais (171). Uma abordagem multimodal tem sido recomendada, incluindo terapias farmacológicas e não farmacológicas (172); no entanto, a presente tese atém-se aos aspectos farmacológicos para fundamentar a

escolha da melatonina nesse cenário. O tratamento farmacológico da FM inclui: antidepressivos, anticonvulsivantes, opioides, anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), relaxantes musculares e sedativos, porém o maior nível de evidência existente e recomendado é o uso de antidepressivos (173) e de anticonvulsivantes (174). Portanto, a revisão a seguir será focada nessas duas classes de medicamentos e na melatonina, o fármaco alvo de interesse desta tese.

2.5.1 ANTIDEPRESSIVOS

Os antidepressivos são frequentemente utilizados para tratar, além da depressão, outras doenças que tenham como base fisiopatológica alterações do sistema nervoso central, tais como dor neuropática (neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética) e FM. O uso dessa classe de fármacos na FM objetiva melhorar o humor, regular disfunções do sono e diminuir os níveis de dor. Revisões sistemáticas e diretrizes baseados em evidências fornecem uma grande variedade de opções de tratamentos farmacológicos e não farmacológicos para a FM (46). A *American Pain Society* (52) recomenda fortemente uma intervenção farmacológica (amitriptilina) e vários tratamentos não farmacológicos (exercícios aeróbicos, terapia comportamental cognitiva, terapia multicomponentes), enquanto que a *European League Against Rheumatism* (EULAR) (175) tem recomendado enfaticamente uma variedade de terapias farmacológicas, tais como antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptação da serotonina-noradrenalina e análogos do GABA, como a pregabalina. Há ainda evidências no tratamento da FM com o uso dos inibidores da recaptação da serotonina e noradrenalina.

2.5.1.1 ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS

Os antidepressivos tricíclicos (TCAs) foram os primeiros fármacos extensivamente estudados no tratamento da FM. O mecanismo de ação comum a eles é o bloqueio pré-sináptico da recaptação de monoaminas, principalmente noradrenalina e serotonina, em menor proporção dopamina (176), envolvidas no sistema inibitório descendente da dor, o que produz aumento da concentração dessas substâncias na fenda sináptica, com conseqüente incremento da eficiência da transmissão monoaminérgica (e possivelmente gabaérgica) e diminuição da sinalização da dor (176, 177). Os TCAs bloqueiam receptores muscarínicos (colinérgicos), histaminérgicos, adrenérgicos, serotoninérgicos diversos e, mais raramente, dopaminérgicos (tabela 3).

Tabela 3: Efeito dos antidepressivos no bloqueio de receptores

Fármacos	Ach	Alfa-1	H1	5-HT1	5-HT2
Amitriptilina	+++	+++	+	+/-	+
Nortriptilina	+	+	+	+/-	+
Fluoxetina	0	0	0	0	+/-

Receptores: Ach = colinérgicos; alfa 1 = alfa adrenérgicos; H1 = histamínicos tipo 1; 5-HT1 = serotoninérgicos tipo 1; 5-HT2 = serotoninérgicos tipo 2; 0 = sem efeito; +++ = efeito acentuado

O efeito analgésico dos antidepressivos difere da dose antidepressiva. Amitriptilina (AMT) demonstrou eficácia analgésica, em relação ao placebo, com doses que variam de 10-150 mg/dia, inferiores às tradicionais utilizadas para depressão (150-300 mg). Revisões sistemáticas e metanálises indicam que a AMT, na dose entre 25-50mg/dia, reduz a dor e a fadiga, melhora os sintomas depressivos e a qualidade de vida e do sono em pacientes com FM, o que foi considerado um efeito de moderada magnitude (173). Os benefícios iniciam nas duas primeiras semanas de tratamento

(177), persistem até a 8ª semana e declinam após 12 semanas, com perda da significância (171).

Em uma metanálise comparando AMT, duloxetina (DLX) e milnacipram (MLN), os dois últimos inibidores da recaptação da noradrenalina e serotonina, a AMT mostrou-se superior na redução da dor e melhora da qualidade do sono e fadiga. O NNT (número necessário para tratar) para uma redução da dor de 30% para AMT foi de 3,54 (intervalo de confiança (CI) 95% 2,74-5,01), para DLX foi de 8,21 (CI 95% 5,91-13,26) e para MLN de 10,96 (CI 95% 8,27-16,26) (170). Os três fármacos mostraram-se superiores ao placebo, exceto na fadiga para DLX, alterações do sono para MLN e qualidade de vida relacionada à saúde (HRQOL) para AMT. A aceitabilidade das medicações foi semelhante entre os pacientes.

Ciclobenzaprina, usualmente marcada como um relaxante muscular, estruturalmente apresenta um componente tricíclico e é efetiva no tratamento da FM, de 6 a 12 semanas, com doses que variam de 10-40mg/dia (178-180).

Os TCAs apresentam efeitos colaterais, tais como xerostomia, visão borrada, aumento da pressão intraocular e de peso, tonturas, taquicardia, constipação, disfunções sexuais, retenção urinária, sedação, fadiga, sonolência, vertigens, náuseas, geralmente relacionados ao efeito anticolinérgico. Enquanto a sonolência é um efeito adverso esperado no tratamento da FM, os demais efeitos colaterais tendem a limitar o aumento da dose e o uso prolongado dos fármacos (tabela 4). A AMT apresenta mais poucos efeitos, enquanto que a nortriptilina tem um melhor perfil de efeitos adversos, porém requer doses terapêuticas mais altas (177).

2.5.1.1 INIBIDORES SELETIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA

Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (SSRIs) inibem de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, resultando em potencialização da neurotransmissão serotoninérgica. Os SSRIs são mais bem tolerados e apresentam menos efeitos colaterais que os TCAs (176).

Os SSRIs apresentaram efeitos positivos no tratamento da FM, exceto o citalopram que não se mostrou superior ao placebo. Fluoxetina (20-40mg/dia), sertralina (50mg/dia) e paroxetina (20mg/dia) reduzem a dor e sintomas depressivos, melhoram o sono e a qualidade de vida (173), mas citalopram não foi superior ao placebo na melhora desses sintomas, o que pode dever-se ao fato de ele ser mais seletivo na recaptação da serotonina que os outros SSRIs, os quais apresentam alguma atividade na recaptação da noradrenalina quando em altas doses (94).

Os SSRIs, de modo geral, são menos eficazes que os TCAs, porém, devido à menor incidência de efeitos adversos, eles são opção em pacientes com intolerância aos tricíclicos. É importante enfatizar que as evidências de eficácia disponíveis são provenientes, na maioria das vezes, de ensaios com curto tempo de seguimento, variando de semanas a meses. Em um estudo com duração de 6 semanas, paroxetina (20 mg/dia) foi superior a AMT (100 mg/dia) na redução da dor e tolerabilidade (181). No entanto, durante dois meses de tratamento, quando comparada a paroxetina (40mg/dia), AMT (20mg/dia) foi mais efetiva na redução da dor, da rigidez e dos distúrbios do sono (182). Em outro estudo que avaliou a associação entre fármacos e monoterapia, AMT (25mg/dia) apresentou efeito positivo similar ao de fluoxetina (20mg/dia) em relação ao placebo. Quando associados, esses fármacos tiveram efeitos significativamente superiores aos da monoterapia (183).

2.5.1.2 INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA E

NORADRENALINA

Os inibidores da recaptção da serotonina e noradrenalina (SNRIs), DLX e MLN, apresentam efeitos positivos semelhantes aos outros antidepressivos. Apesar de o exato mecanismo de ação dos SNRIs na FM não estar totalmente elucidado, o aumento da neurotransmissão mediada por noradrenalina e serotonina pode corrigir o déficit funcional desses neurotransmissores e reduzir a dor e outros sintomas associados (184).

DLX (60-120 mg) demonstrou efeitos significativos na redução da dor e da depressão e melhora da qualidade de vida e do sono (185, 186), sem modificações no grau de fadiga. Em uma análise agrupada de quatro estudos, Arnold *et al.* relataram uma diferença significativa entre DLX e placebo, com 38,4% dos pacientes tratados com duloxetina reportando pelo menos “muita melhora” da dor, em comparação com 21,7% dos que receberam placebo ($P < 0,001$) (187).

Em dois estudos conduzidos na América do Norte (184) e na Europa (188), o MLN (100 e 200 mg/dia, respectivamente) também demonstrou diferença significativa em relação ao placebo na redução da dor (30% ou mais de melhora VAS), melhora na impressão global do paciente, na fadiga e na qualidade de vida e do sono.

Os efeitos mais comuns dessa classe de medicamentos incluem náuseas (184, 188), que ocorrem principalmente nas primeiras semanas de aumento da dose do fármaco (188). Também palpitações (94), boca seca, constipação, cefaleia, sonolência/tonturas ou insônia são frequentes. Raras complicações de ambos os fármacos incluem aumento da suicidabilidade, lesão hepática, sangramento anormal, aumento da pressão arterial e hesitação urinária (tabela 4) (170).

Tabela 4: Efeitos colaterais

Antidepressivos Tricíclicos (ADTs)	Xerostomia, visão borrada, aumento da pressão intra-ocular, aumento de peso, tonturas, taquicardia, constipação, disfunções sexuais, retenção urinária, sedação, fadiga, sonolência, vertigens, náuseas.
Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (SSRI)	Náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, agitação, ansiedade, insônia, mania, nervosismo, alterações do sono, fadiga, tremores, efeitos extrapiramidais, perda ou ganho de peso, disfunções sexuais, reações dermatológicas.
Inibidores da Recaptação da Serotonina e Noradrenalina (SNRI)	Tonturas, cefaleia, náuseas, sonhos anormais, mialgias, diarreia, depressão, ansiedade, insônia, xerostomia, constipação, sonolência. Complicações raras: suicidalidade, lesão hepática, sangramento anormal, aumento da pressão arterial e hesitação urinária.

Em metanálise com 18 RCTs controlados com placebo, envolvendo 1427 pacientes e o uso de antidepressivos no tratamento da FM durante uma mediana de 8

semanas (variação de 4 a 28 semanas), Häuser *et al.* (189) observaram que, globalmente, há forte evidência na associação de antidepressivos com a redução da dor, da fadiga, do humor depressivo, dos distúrbios do sono e melhora da qualidade de vida relacionada à saúde. O tamanho do efeito para a redução da dor foi grande para os TCAs [desvio da média-padrão (SMD) $-1,64$; CI 95% $-2,57$ a $-0,71$], e pequeno para os SSRIs [SMD $-0,39$; CI 95% $-0,77$ a $-0,01$] e SNRIs [SMD $-0,36$; CI 95% $-0,46$ a $-0,25$]. Em metanálise mais atualizada (190), o mesmo grupo avaliou o efeito dos antidepressivos na FM com 35 RCTs comparando diversas classes de antidepressivos entre si ou com placebo. Apesar de o SMD ser significativo no tratamento da dor, do sono, da fadiga, da depressão e qualidade de vida relacionada à saúde com o uso de TCAs, SSRIs e SNRIs, o tamanho do efeito (benefício adicional de um fármaco em relação ao placebo) desses tratamentos variou de moderado a não substancial (tabela 5).

Tabela 5: Desvio da média-padrão e tamanho do efeito entre os antidepressivos

Antidepressivo	SMD significativo	Tamanho do efeito (ES) (categorias de Cohen)
Inibidores da Recaptação da Serotonina e Noradrenalina (SNRI)	Dor, sono, fadiga, depressão, HRQOL	Pequeno = Dor Não substancial = Sono, fadiga, depressão, HRQOL
Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (SSRI)	Dor, sono, depressão, HRQOL	Pequeno = Dor, depressão, HRQOL Não substancial = Sono
Antidepressivos Tricíclicos (ADT)	Dor, sono, fadiga, HRQOL	Moderado = Dor, sono Pequeno = Fadiga, HRQOL

HRQOL = qualidade de vida relacionada à saúde; SMD = desvio da média-padrão; categorias de Cohen: avaliam a magnitude do tamanho do efeito: $g = 0,0 - 0,2$ = tamanho do efeito (ES) não substancial, $g > 0,2 - 0,5$ = pequeno ES, $g > 0,5 - 0,8$ = moderado ES e $g > 0,8$ = grande ES.

2.5.2 ANTICONVULSIVANTES

Os anticonvulsivantes exercem seu efeito farmacológico por bloqueio de canais iônicos. Somente gabapentina e pregabalina apresentam evidências no tratamento da FM. No entanto, até o presente momento, não há estudos avaliando a eficácia de outros fármacos antiepiléticos, tais como lamotrigina, carbamazepina, oxycarbamazepina, fenitoína, valproato de sódio e topiramato (191) no tratamento da doença.

2.5.2.1 GABAPENTINA

A gabapentina (GBP) é um aminoácido análogo estrutural ao GABA, mas atua por ação gabaérgica direta. Tem a propriedade de aumentar os níveis de GABA e serotonina no sistema nervoso central e de diminuir o glutamato. Seus efeitos devem-se ao bloqueio dos canais de Ca^{2+} voltagem dependente do tipo L, ligando-se à subunidade $\alpha_2\delta$, e à redução discreta da síntese de glutamato. O fármaco não possui metabólitos ativos, sua ligação às proteínas plasmáticas é insignificante e apresenta baixo potencial de interação com outros fármacos. Estudos com ratos têm sugerido que a GBP diminui a alodínia e a hiperalgesia (192). Apenas um RCT foi encontrado no tratamento com GBP na FM, que mostrou eficácia na redução da dor (melhora igual ou superior que 50%), na melhora da qualidade do sono, do escore do Questionário de Impacto da Fibromialgia (FIQ), da vitalidade, da impressão clínica global da severidade e impressão da melhora global pelo paciente, porém não modificou o limiar de dor dos *tender points* nem agiu no humor deprimido (193). Nesse estudo, os efeitos adversos do uso da GBP (tonturas, vertigens, ganho de peso e sedação) não foram significativos em

relação ao placebo (16% no grupo intervenção e 9% no grupo placebo, $p = 0,34$). Apesar dos achados positivos e da segurança no seu uso, estudos adicionais são necessários para se chegar a conclusões definitivas sobre seu uso na FM.

2.5.2.2 PREGABALINA

A pregabalina (PGB), um anticonvulsivante análogo do GABA, foi aprovada pelo FDA (*Food and Drugs Administration*, órgão regulatório do uso de medicações nos Estados Unidos) para o tratamento da FM.

A PGB exerce seu efeito ao se ligar à subunidade $\alpha 2\delta$ de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, reduzindo o influxo de cálcio nos terminais nervosos e, portanto a liberação de neurotransmissores como glutamato, noradrenalina e SP (194). A PGB apresenta eficácia para o tratamento da neuropatia diabética e da dor fibromiálgica, com benefício de efeito menos acentuado nesta última (191). Seus efeitos adversos mais freqüentes são sonolência, edema periférico e xerostomia.

Em uma metanálise, quando comparada ao placebo, a PGB demonstrou mais frequentes relatos de melhora de 50% ou mais na redução da dor que o placebo [risco relativo (RR) 1,59, CI 95% 1,33 a 1,90; NNT 12, CI 95% de 9 a 21]. O número de pessoas que relataram “muita” ou “muitíssima” melhora foi maior no grupo PGB do que no placebo [RR 1,38; CI 95% 1,23 a 1,55; NNT 9, CI 95% 7 a 15]. Seu efeito, no que concerne a redução da fadiga, não foi significativo (170). Nesses estudos, o grupo intervenção apresentou maior taxa de *dropouts* por efeitos adversos que do o grupo placebo [RR 1,68, CI 95% 1,36 a 2,07; NNT para um efeito deletério adicional de 13, CI 95% 9 a 23], porém, não houve diferença significativa da ocorrência de graves eventos adversos entre o uso da PGB ou placebo.

Comparando-se amitriptilina, PGB, DLX e MLN, todos os medicamentos foram superiores ao placebo na melhora de 50% ou mais da dor e no escore de melhora ou mudança na impressão global do paciente. PGB, DLX e MLN, quando comparados entre si, não apresentaram diferença significativa dos efeitos nesses desfechos (172).

Häuser *et al.* compararam os efeitos de DLX, MLN e PGB nos distúrbios do sono, humor depressivo e qualidade de vida relacionada à saúde. DLX mostrou-se superior ao MLN em todos os desfechos, porém quando comparada à PGB, foi superior apenas na melhora do humor depressivo. PGB foi superior a esses antidepressivos quanto aos distúrbios do sono e qualidade de vida relacionada à saúde (tabela 6) (195).

Tabela 6: Análise de RCTs placebo-controlados com o uso de PGB, MLN e DLX no tratamento da fibromialgia

	DLX vs. MLN	DLX vs. PGB	MLN vs. PGB
Distúrbios do sono SMD (CI 95%)	6,20 (6,05 a 6,35)	0,14 (-0,01 a 0,29)	0,84 (0,69 a 0,99)
Humor depressivo SMD (CI 95%)	2,45 (2,32 a 2,58)	27,0 (26,83 a 27,17)	11,0 (1,89 a 11,11)
HRQOL SMD (CI 95%)	1,47 (1,29 a ,.65)	0 (-0,25 a 0,25)	0,44 (0,28 a 0,60)

Abreviações: DLX: duloxetina; MLN: milnacipram; PGB: pregabalina; HRQOL: qualidade de vida relacionada à saúde; SMD: diferença entre médias-padrão

Com base nesses resultados no tratamento da FM e considerando-se os efeitos na regulação de múltiplas funções, muitas delas não relacionadas a vias nociceptivas classicamente descritas (196), a melatonina poderia ser uma droga alternativa no tratamento da doença.

2.5.3 MELATONINA COMO AGENTE TERAPÊUTICO

A melatonina (N-acetil-5-methoxytryptamina), uma indolamina secretada

primariamente pela glândula pineal, apresenta um ritmo circadiano endógeno e regula diversos processos fisiológicos, tais como ciclo sono-vigília (197) e funções cardiovasculares (198, 199), reprodutivas (200), neuroendócrinas e imunes (201, 202). Com sua atividade regulada pelo estímulo simpático e receptores amplamente distribuídos na medula espinhal e no cérebro, a melatonina coordena ritmos biológicos em múltiplos níveis e tem sua atividade ligada a diversas vias, como a opioide, gabaérgica e serotoninérgica (201).

A noradrenalina, atuando nos receptores pós-sinápticos tipo $\alpha 1$ e $\beta 1$ -adrenérgicos dos pinealócitos, com aumento secundário do AMPcíclico, transforma o triptofano em 5-hidroxitriptofano, serotonina, N-acetilserotonina e, finalmente em melatonina. Participam dessa sequência de eventos as enzimas serotonina-N-acetiltransferase (NAT) e hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) (203, 204). A melatonina, então, difunde-se através de todas as membranas biológicas, inclusive pela barreira hemato-encefálica, e atua praticamente em todas as células do organismo (205). Suas ações são mediadas por receptores melatoninérgicos de membrana tipo 1 e 2 (MT1 e MT2)(206) ou receptores hormonais nucleares associados à diferenciação celular e regulação da resposta imune (207).

Inúmeros sítios extrapineais produzem melatonina, inclusive a medula espinhal. Além disso, seus receptores são amplamente distribuídos no sistema nervoso central e em estruturas envolvidas na transmissão nociceptiva, tais como as lâminas I-V e X da medula espinhal (208). Portanto, é provável que a melatonina tenha efeito modulatório na produção da dor através de mecanismos periféricos e centrais, os quais podem ser mediados por receptores do GABA (209) e/ou dos opioides (210, 211). Tanto os receptores para o GABA B, os opioides e a melatonina são do tipo G-proteína acoplada e, quando ativados, reduzem a concentração do AMPcíclico (212-214), implicado na

cascata de alterações dos mecanismos da sensibilização central. Então, a melatonina modula a ação desses receptores por agir sobre esse segundo mensageiro comum (215). Foi demonstrado que a melatonina ativa, ainda, canais de K⁺ acoplados à proteína G e inibe o potencial de ação neuronal (216, 217) e os canais de cálcio voltagem-dependentes (218), os quais são relacionados à dor neuropática e à sensibilização central.

Outros possíveis mecanismos pelos quais a melatonina pode interferir no processo inflamatório e algogênico são a inibição da produção de óxido nítrico e a redução da expressão da enzima óxido nítrico-sintetase. O óxido nítrico (NO) tem papel crucial na neuromodulação, neurotransmissão e plasticidade cerebral, além de estar envolvido nos processos patológicos de neurodegeneração e neuroinflamação (219). A melatonina diminui a produção do nitrito/nitrato, produtos da quebra do óxido nítrico, por reduzir a expressão da iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) através da inibição da ativação do NF- κ B pelo estresse oxidativo (220). Também reduz os níveis de PGs e da expressão da COX-2, evitando a ativação desta última e da iNOS nas células gliais sem inibir simultaneamente a enzima COX-1, o que indica uma ação anti-inflamatória (221). Sua relação com os níveis séricos do S100B, proteína implicada no mecanismo de ativação das células gliais e amplificação da dor, porém, ainda não foi estudada.

A melatonina regula a produção de citocinas pelas células imunocompetentes (222). Estudos experimentais e clínicos mostram que a melatonina reduz as moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral (TNF α) (223, 224).

Schwertner *et al.* demonstram que a melatonina diminui os níveis séricos do BDNF, implicado nos mecanismos de sensibilização central e dor crônica, quando tratadas pacientes com dor inflamatória secundária à endometriose (29).

A melatonina é uma opção terapêutica atrativa em patologias que cursam com ruptura do sistema sincronizador endógeno, associada com dor, inflamação e alterações do ritmo sono-vigília. Isto se explica por apresentar ação pleotrófica que inclui ações cronobióticas, analgésicas e anti-inflamatórias. Tais efeitos foram demonstrados em dor aguda em humanos e modelos de dor experimental com animais (24, 225). Suas doses como coanalgésico nos estudos em humanos variaram de 3 –10 mg/dia (226).

Em pacientes fibromiálgicos, na dose de 3mg/dia, por 30 dias, melhorou a dor, a fadiga, a qualidade de sono (34) e o escore *Fibromyalgia Impact Questionnaire* (FIQ). Também na FM, a melatonina mostrou redução dos escores da doença com doses de 3 e 5mg, combinadas ou não com a fluoxetina, durante 8 semanas (36). Na endometriose, a melatonina diminuiu a dor diária e a dismenorréia e melhorou a qualidade do sono (29). Em estudo com animais, a melatonina produziu efeito antidepressivo equivalente ao da nortriptilina (32). A combinação com antidepressivo tricíclico no tratamento da FM ainda não foi examinada.

Considerando, então, suas propriedades analgésicas e o efeito antidepressivo, associado aos resultados dos RCTs publicados pelo Laboratório de Dor e Neuromodulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - UFRGS (23, 24, 28, 29) e de ensaios clínicos com pacientes fibromiálgicos (34, 36), pode-se hipotetizar que a melatonina apresenta bom potencial para ser utilizada como agente isolado ou combinado em patologias como a FM. Essa premissa é sustentada por mecanismos farmacodinâmicos e por ser a melatonina um agente com propriedades farmacológicas multifacetadas.

3 MAPA CONCEITUAL

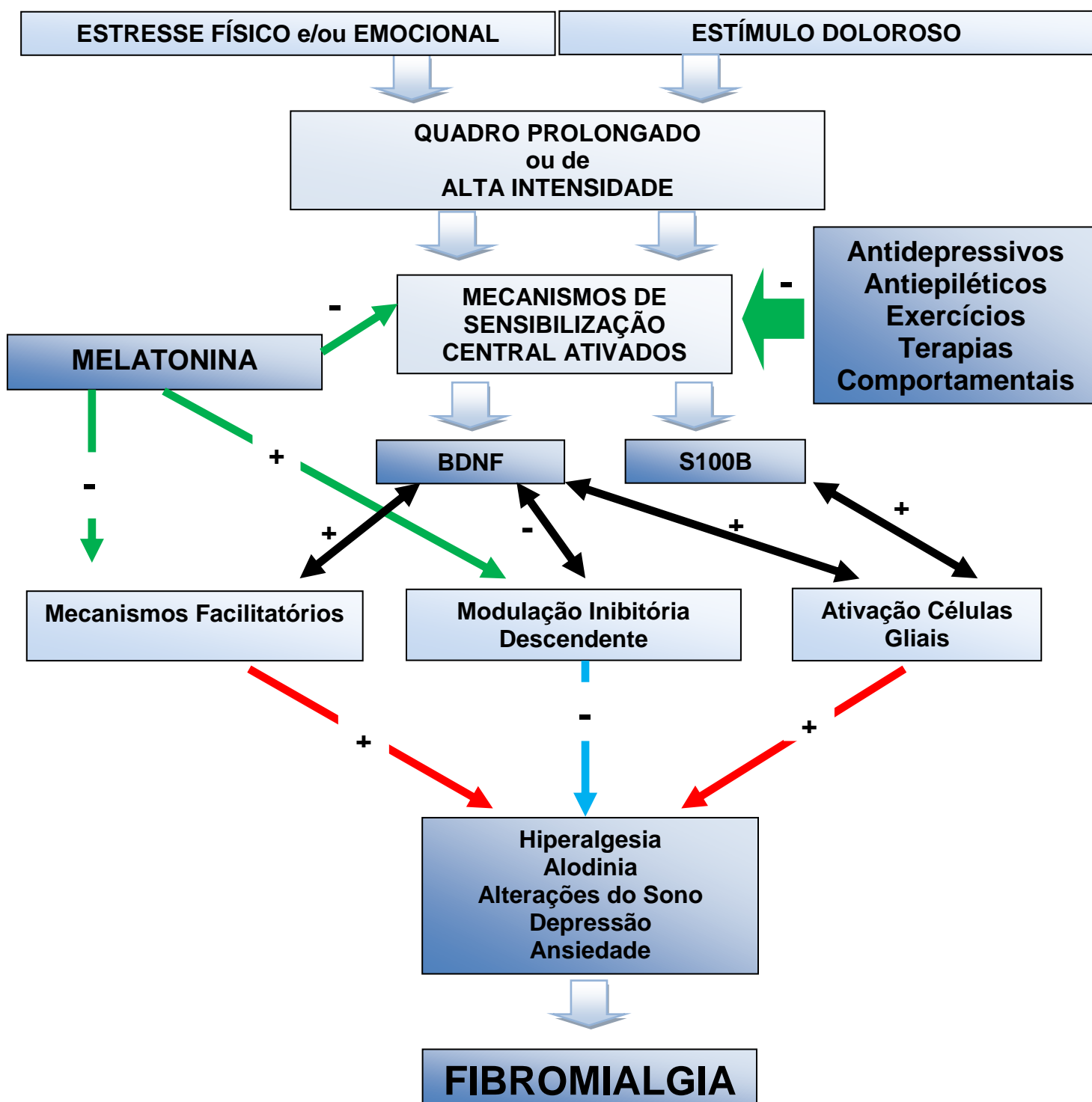
A sensibilização central, caracterizada pela facilitação das vias nociceptivas e/ou diminuição da função inibitória modulatória e ativação das células da glia, desempenha papel primordial no mecanismo da dor crônica da FM. O BDNF participa desse processo ao incrementar sinapses excitatórias e enfraquecer as inibitórias. Tanto a proteína S100B quanto o BDNF estão envolvidos na ativação das células da glia, mas não estão definitivamente relacionados à FM. Trata-se, portanto, de um processo que depende de eventos em cadeia de longo prazo e cuja terapêutica deve tentar englobar esses múltiplos mecanismos. Assim sendo, a melatonina, por sua característica multifacetada, poderia ser uma alternativa no tratamento da FM.

Nesta tese, como apresentado no texto e sumarizado no marco conceitual, contemplamos três questões tratadas nos dois estudos que a compõe:

1. Explorar a associação do BDNF e do S100B com o limiar de dor à pressão em mulheres com FM.
2. Avaliar se o tratamento com melatonina isolada ou em combinação com amitriptilina é melhor do que o com amitriptilina isolada na modificação do sistema modulatório endógeno, quantificado através da modulação condicionada da dor, e se este achado poderia estar relacionado ao BDNF sérico.
3. Avaliar o efeito do tratamento com melatonina nos demais sintomas associados à FM.

A figura 7 sumariza esse processo.

Figura 7: Mapa Conceitual



4 JUSTIFICATIVA

O fato de o processo fisiopatogênico da FM envolver um quadro de sensibilização central, que cursa com dor, alterações do humor e sintomas de ruptura do ritmo circadiano; levam à necessidade de estudos adicionais para compreender a relação entre possíveis marcadores séricos da hiperativação neuronal, tais como o BDNF e a S100B. Além disso, é importante investigar o efeito terapêutico de drogas como a melatonina, cujo caráter multifacetado pode interferir nos mecanismos periféricos e centrais da dor, com efeitos em vias neurobiológicas alternativas às opções clássicas de tratamento (p. ex. antidepressivos, anticonvulsivantes).

A hipótese deste trabalho é que a melatonina possa ser um agente terapêutico com potencial analgésico no tratamento de condições dolorosas crônicas, que apresentam em seu curso cronopatológico sinais e sintomas de disfunção do eixo imune-pineal, como ocorre na FM.

O interesse nesta questão se deve ao fato de a FM ser responsável por grande parcela dos pacientes com dor crônica não oncológica e com limitadas possibilidades terapêuticas. Portanto, novos estudos são necessários para explorar com maior profundidade o impacto de novas intervenções com o intuito de suplantar a limitada eficácia dos tratamentos disponíveis.

Na busca de respostas, foram realizados dois estudos, que originaram os dois artigos que constituem esta tese:

1. *Higher serum S100B and BDNF levels are correlated with lower pressure-pain threshold in fibromyalgia – estudo transversal submetido para a Molecular Pain.*

2. *Melatonin analgesia is associated with improve of descendent endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: A phase II, randomized, double-dummy, controlled trial – RCT submetido ao BMC Pharmacology and Toxicology.*

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre os marcadores biogênicos (BDNF e S100B) do insulto neural, secundário à sensibilização central, com o processo fisiopatogênico da FM, assim como avaliar o possível benefício da melatonina no tratamento de pacientes fibromiálgicas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar o uso da melatonina com a modificação dos níveis séricos do BDNF.
- Relacionar BDNF, S100B e o limiar de dor à pressão de pacientes com FM.
- Explorar a ação da melatonina isolada ou associada ao uso da amitriptilina na melhora do sistema modulatório endógeno da dor, avaliada através da modulação condicionada da dor, e dos níveis séricos do BDNF.
- Avaliar o efeito da melatonina isolada ou associada com amitriptilina na melhora dos sintomas clínicos como dor, limiar de dor e qualidade do sono relacionados à FM.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wolfe F. Fibromyalgia. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 1990;16(3):681-98.
2. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis care & research*. 2010;62(5):600-10.
3. Perrot S, Vicaut E, Servant D, Ravaud P. Prevalence of fibromyalgia in France: a multi-step study research combining national screening and clinical confirmation: The DEFI study (Determination of Epidemiology of Fibromyalgia). *BMC musculoskeletal disorders*. 2011;12:224.
4. Vincent A, Lahr BD, Wolfe F, Clauw DJ, Whipple MO, Oh TH, et al. Prevalence of fibromyalgia: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, utilizing the Rochester Epidemiology Project. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(5):786-92.
5. Jensen KB, Kosek E, Petzke F, Carville S, Fransson P, Marcus H, et al. Evidence of dysfunctional pain inhibition in Fibromyalgia reflected in rACC during provoked pain. *Pain*. 2009;144(1-2):95-100.
6. Julien N, Goffaux P, Arsenault P, Marchand S. Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*. 2005;114(1-2):295-302.
7. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009;10(9):895-926.
8. 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 research & therapy*. 2011;13(2):211.
9. Russell IJ, Larson AA. Neurophysiopathogenesis of fibromyalgia syndrome: a unified hypothesis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2009;35(2):421-35.
10. Yarnitsky D. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Current opinion in anaesthesiology*. 2010;23(5):611-5.
11. Paul-Savoie E, Marchand S, Morin M, Bourgault P, Brissette N, Rattanavong V, et al. Is the deficit in pain inhibition in fibromyalgia influenced by sleep impairments? *The open rheumatology journal*. 2012;6:296-302.
12. Houvenagel E, Forzy G, Leloire O, Gallois P, Hary S, Hautecoeur P, et al. [Cerebrospinal fluid monoamines in primary fibromyalgia]. *Revue du rhumatisme et*

des maladies osteo-articulaires. 1990;57(1):21-3.

13. Legangneux E, Mora JJ, Spreux-Varoquaux O, Thorin I, Herrou M, Alvado G, et al. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites, plasma-rich platelet serotonin and [3H]imipramine reuptake in the primary fibromyalgia syndrome. *Rheumatology*. 2001;40(3):290-6.

14. Russell IJ, Michalek JE, Vipraio GA, Fletcher EM, Javors MA, Bowden CA. Platelet 3H-imipramine uptake receptor density and serum serotonin levels in patients with fibromyalgia/fibrositis syndrome. *The Journal of rheumatology*. 1992;19(1):104-9.

15. Wood PB, Holman AJ. An elephant among us: the role of dopamine in the pathophysiology of fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2009;36(2):221-4.

16. Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in neurobiology*. 2002;66(6):355-474.

17. Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, et al. BDNF as a pain modulator. *Progress in neurobiology*. 2008;85(3):297-317.

18. 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 delta-opioid receptor dysfunction. *Journal of neurochemistry*. 2006;97(5):1369-78.

19. Watkins LR, Hutchinson MR, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain, behavior, and immunity*. 2007;21(2):131-46.

20. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;322(4):1111-22.

21. Tanga FY, Raghavendra V, Nutile-McMenemy N, Marks A, Deleo JA. Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. *Neuroscience*. 2006;140(3):1003-10.

22. Wikner J, Hirsch U, Wetterberg L, Rojdmarm S. Fibromyalgia--a syndrome associated with decreased nocturnal melatonin secretion. *Clinical endocrinology*. 1998;49(2):179-83.

23. Caumo W, Levandovski R, Hidalgo MP. Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009;10(1):100-8.

24. Caumo W, Torres F, Moreira NL, Jr., Auzani JA, Monteiro CA, Londero G, et al. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients

undergoing abdominal hysterectomy. *Anesthesia and analgesia*. 2007;105(5):1263-71, table of contents.

25. Laste G, de Macedo IC, Ripoll Rozisky J, Ribeiro da Silva F, Caumo W, Torres IL. Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats. *Journal of pain research*. 2012;5:359-62.

26. Esposito E, Paterniti I, Mazzon E, Bramanti P, Cuzzocrea S. Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. *Journal of pineal research*. 2010;49(4):321-31.

27. Ambriz-Tututi M, Granados-Soto V. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. *Pain*. 2007;132(3):273-80.

28. Vidor LP, Torres IL, Custodio de Souza IC, Fregni F, Caumo W. Analgesic and sedative effects of melatonin in temporomandibular disorders: a double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled study. *Journal of pain and symptom management*. 2013;46(3):422-32.

29. Schwertner A, Conceicao Dos Santos CC, Costa GD, Deitos A, de Souza A, de Souza IC, et al. Efficacy of melatonin in the treatment of endometriosis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain*. 2013;154(6):874-81.

30. Stefani LC, Muller S, Torres ILS, Razzolini B, Rozisky JR, Fregni F, et al. A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Dose-Response Trial of the Melatonin Effect on the Pain Threshold of Healthy Subjects. *PloS one*. 2013;8(10):e74107.

31. Laste G, Vidor L, de Macedo IC, Rozisky JR, Medeiros L, de Souza A, et al. Melatonin treatment entrains the rest-activity circadian rhythm in rats with chronic inflammation. *Chronobiology international*. 2013;30(9):1077-88.

32. Detanico BC, Piatto AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, et al. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *European journal of pharmacology*. 2009;607(1-3):121-5.

33. Zurowski D, Nowak L, Machowska A, Wordliczek J, Thor PJ. Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. The role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2012;63(6):641-7.

34. Citera G, Arias MA, Maldonado-Cocco JA, Lazaro MA, Roseff MG, Brusco LI, et al. The effect of melatonin in patients with fibromyalgia: a pilot study. *Clinical rheumatology*. 2000;19(1):9-13.

35. 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.

36. Hussain SA, Al K, II, Jasim NA, Gorial FI. Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia. *Journal of pineal research*. 2011;50(3):267-71.
37. Potvin S, Larouche A, Normand E, de Souza JB, Gaumond I, Grignon S, et al. DRD3 Ser9Gly polymorphism is related to thermal pain perception and modulation in chronic widespread pain patients and healthy controls. *J Pain*. 2009;10(9):969-75.
38. Volz MS, Medeiros LF, Tarragô MaG, Vidor LP, Dall'Agnol L, Deitos A, et al. The relationship between cortical excitability and pain catastrophizing in myofascial pain. *J Pain*. 2013;14(10):1140-7.
39. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ. Aspects of fibromyalgia in the general population: sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms. *The Journal of rheumatology*. 1995;22(1):151-6.
40. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ, Hebert L. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. *Arthritis and rheumatism*. 1995;38(1):19-28.
41. Queiroz LP. Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Current pain and headache reports*. 2013;17(8):356.
42. Branco JC, Bannwarth B, Failde I, Abello Carbonell J, Blotman F, Spaeth M, et al. Prevalence of fibromyalgia: a survey in five European countries. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(6):448-53.
43. Wolfe F, Brahler E, Hinz A, Hauser W. Fibromyalgia prevalence, somatic symptom reporting, and the dimensionality of polysymptomatic distress: results from a survey of the general population. *Arthritis care & research*. 2013;65(5):777-85.
44. White KP, Speechley M, Harth M, Ostbye T. The London Fibromyalgia Epidemiology Study: the prevalence of fibromyalgia syndrome in London, Ontario. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(7):1570-6.
45. Mas AJ, Carmona L, Valverde M, Ribas B, Group ES. Prevalence and impact of fibromyalgia on function and quality of life in individuals from the general population: results from a nationwide study in Spain. *Clinical and experimental rheumatology*. 2008;26(4):519-26.
46. Bennett RM, Jones J, Turk DC, Russell IJ, Matallana L. An internet survey of 2,596 people with fibromyalgia. *BMC musculoskeletal disorders*. 2007;8:27.
47. Neumann L, Lerner E, Glazer Y, Bolotin A, Shefer A, Buskila D. A cross-sectional study of the relationship between body mass index and clinical characteristics, tenderness measures, quality of life, and physical functioning in fibromyalgia patients. *Clinical rheumatology*. 2008;27(12):1543-7.
48. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis and rheumatism*.

1990;33(2):160-72.

49. Moldofsky H. Management of sleep disorders in fibromyalgia. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2002;28(2):353-65.

50. Lugaresi E, Cirignotta F, Zucconi M, Mondini S, Lenzi P, Coccagna G. Good and poor sleepers: an epidemiological survey of the San Marino population. In: Guilleminault C, Lugaresi E, editors. *Sleep/wake disorders: natural history*. New York: Raven Press; 1981. p. 1-12.

51. Inanici F, Yunus MB. History of fibromyalgia: past to present. *Current pain and headache reports*. 2004;8(5):369-78.

52. Goldenberg DL, Burckhardt C, Crofford L. Management of fibromyalgia syndrome. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;292(19):2388-95.

53. Simms RW. Fibromyalgia syndrome: current concepts in pathophysiology, clinical features, and management. *Arthritis care and research : the official journal of the Arthritis Health Professions Association*. 1996;9(4):315-28.

54. Yunus MB, Inanici F. Clinical characteristics and biopathophysiological mechanisms of fibromyalgia syndrome. In: Baldry PE, editor. *Myofascial and fibromyalgia syndromes*. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone; 2001. p. 351-77.

55. Mense S. [Differences between myofascial trigger points and tender points]. *Schmerz*. 2011;25(1):93-103; quiz 4.

56. Foo H, Mason P. Brainstem modulation of pain during sleep and waking. *Sleep medicine reviews*. 2003;7(2):145-54.

57. Moldofsky H, Scarisbrick P, England R, Smythe H. Musculoskeletal symptoms and non-REM sleep disturbance in patients with "fibrositis syndrome" and healthy subjects. *Psychosomatic medicine*. 1975;37(4):341-51.

58. Roizenblatt S, Moldofsky H, Benedito-Silva AA, Tufik S. Alpha sleep characteristics in fibromyalgia. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(1):222-30.

59. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological reviews*. 2003;55(2):325-95.

60. Baldissera F, Broggi G, Mancina M. Monosynaptic and polysynaptic spinal reflexes during physiological sleep and wakefulness. *Archives italiennes de biologie*. 1966;104(1):112-33.

61. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003;301(5631):386-9.

62. Cohen H, Buskila D, Neumann L, Ebstein RP. Confirmation of an association between fibromyalgia and serotonin transporter promoter region (5-HTTLPR) polymorphism, and relationship to anxiety-related personality traits. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(3):845-7.
63. Offenbaecher M, Bondy B, de Jonge S, Glatzeder K, Kruger M, Schoeps P, et al. Possible association of fibromyalgia with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(11):2482-8.
64. Uceyler N, Zeller D, Kahn AK, Kewenig S, Kittel-Schneider S, Schmid A, et al. Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 6):1857-67.
65. Abeles AM, Pillinger MH, Solitar BM, Abeles M. Narrative review: the pathophysiology of fibromyalgia. *Annals of internal medicine*. 2007;146(10):726-34.
66. Martinez-Lavin M, Hermosillo AG, Rosas M, Soto ME. Circadian studies of autonomic nervous balance in patients with fibromyalgia: a heart rate variability analysis. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(11):1966-71.
67. Price DD, Staud R, Robinson ME, Mauderli AP, Cannon R, Vierck CJ. Enhanced temporal summation of second pain and its central modulation in fibromyalgia patients. *Pain*. 2002;99(1-2):49-59.
68. Kosek E, Hansson P. Modulatory influence on somatosensory perception from vibration and heterotopic noxious conditioning stimulation (HNCS) in fibromyalgia patients and healthy subjects. *Pain*. 1997;70(1):41-51.
69. Vaeroy H, Helle R, Forre O, Kass E, Terenius L. Elevated CSF levels of substance P and high incidence of Raynaud phenomenon in patients with fibromyalgia: new features for diagnosis. *Pain*. 1988;32(1):21-6.
70. Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis and rheumatism*. 1994;37(11):1593-601.
71. Welin M, Bragee B, Nyberg F. Elevated substance P levels are contrasted by a decrease in met-enkephalin-arg-phe levels in CSF from fibromyalgia patients. *J Musculoskeletal Pain*. 1995;3([Suppl 1]):4.
72. Giovengo SL, Russell IJ, Larson AA. Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 1999;26(7):1564-9.
73. Sarchielli P, Mancini ML, Floridi A, Coppola F, Rossi C, Nardi K, et al. Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(9):737-45.

74. Laske C, Stransky E, Eschweiler GW, Klein R, Wittorf A, Leyhe T, et al. Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants. *Journal of psychiatric research*. 2007;41(7):600-5.
75. Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nature reviews Neuroscience*. 2004;5(7):565-75.
76. Hagbarth KE, Kerr DI. Central influences on spinal afferent conduction. *Journal of neurophysiology*. 1954;17(3):295-307.
77. Gebhart GF. Descending modulation of pain. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2004;27(8):729-37.
78. Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends in neurosciences*. 2002;25(6):319-25.
79. Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends in pharmacological sciences*. 2004;25(12):613-7.
80. Hoffman GA, Harrington A, Fields HL. Pain and the placebo: what we have learned. *Perspectives in biology and medicine*. 2005;48(2):248-65.
81. Clauw DJ, Arnold LM, McCarberg BH, FibroCollaborative. The science of fibromyalgia. *Mayo Clinic proceedings*. 2011;86(9):907-11.
82. Ploner M, Gross J, Timmermann L, Schnitzler A. Cortical representation of first and second pain sensation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(19):12444-8.
83. Serpell M. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Surgery (Medicine Publishing)*. 2006;24(10):350-3.
84. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.
85. Rocha AP, Kraychete DC, Lemonica L, de Carvalho LR, de Barros GA, Garcia JB, et al. Pain: current aspects on peripheral and central sensitization. *Revista brasileira de anestesiologia*. 2007;57(1):94-105.
86. Sandkuhler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological reviews*. 2009;89(2):707-58.
87. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain research*. 2004;1000(1-2):40-56.
88. Price DD, Greenspan JD, Dubner R. Neurons involved in the exteroceptive function of pain. *Pain*. 2003;106(3):215-9.
89. Mense S, Gerwin R. Central Nervous Mechanisms of Muscle Pain. *Muscle*

Pain: Understanding the Mechanisms: Springer-Verlag 2010. p. 105-75.

90. Baranauskas G, Nistri A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Progress in neurobiology*. 1998;54(3):349-65.
91. Sandkuhler J. Learning and memory in pain pathways. *Pain*. 2000;88(2):113-8.
92. Li P, Zhuo M. Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. *Nature*. 1998;393(6686):695-8.
93. Schnitzler A, Ploner M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society*. 2000;17(6):592-603.
94. Williams DA, Clauw DJ. Understanding fibromyalgia: lessons from the broader pain research community. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009;10(8):777-91.
95. Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain research Brain research reviews*. 2004;46(3):295-309.
96. Vanegas H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. *Neuroscience letters*. 2004;361(1-3):225-8.
97. Price DD, Staud R. Neurobiology of fibromyalgia syndrome. *The Journal of rheumatology Supplement*. 2005;75:22-8.
98. Schweinhardt P. The many faces of counter-irritation. *Pain*. 2011;152(7):1445-6.
99. Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain*. 1979;6(3):283-304.
100. Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain*. 1979;6(3):305-27.
101. Le Bars D, Villanueva L, Bouhassira D, Willer JC. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija*. 1992(4):55-65.
102. Popescu A, LeResche L, Truelove EL, Drangsholt MT. Gender differences in pain modulation by diffuse noxious inhibitory controls: a systematic review. *Pain*. 2010;150(2):309-18.
103. Tambeli CH, Young A, Levine JD, Gear RW. Contribution of spinal glutamatergic mechanisms in heterosegmental antinociception induced by noxious stimulation. *Pain*. 2003;106(1-2):173-9.

104. Jones AK, Qi LY, Fujirawa T, Luthra SK, Ashburner J, Bloomfield P, et al. In vivo distribution of opioid receptors in man in relation to the cortical projections of the medial and lateral pain systems measured with positron emission tomography. *Neuroscience letters*. 1991;126(1):25-8.
105. Jones AK, Brown WD, Friston KJ, Qi LY, Frackowiak RS. Cortical and subcortical localization of response to pain in man using positron emission tomography. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 1991;244(1309):39-44.
106. Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algisogenic agents in mice. *European journal of pharmacology*. 1995;275(3):229-33.
107. Tambeli CH, Parada CA, Levine JD, Gear RW. Inhibition of tonic spinal glutamatergic activity induces antinociception in the rat. *The European journal of neuroscience*. 2002;16(8):1547-53.
108. Henriksson KG, Sorensen J. The promise of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in fibromyalgia. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2002;28(2):343-51.
109. Yunus MB. Fibromyalgia and overlapping disorders: the unifying concept of central sensitivity syndromes. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2007;36(6):339-56.
110. Lautenbacher S, Rollman GB. Possible deficiencies of pain modulation in fibromyalgia. *The Clinical journal of pain*. 1997;13(3):189-96.
111. Staud R, Rodriguez ME. Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2006;2(2):90-8.
112. Mountz JM, Bradley LA, Modell JG, Alexander RW, Triana-Alexander M, Aaron LA, et al. Fibromyalgia in women. Abnormalities of regional cerebral blood flow in the thalamus and the caudate nucleus are associated with low pain threshold levels. *Arthritis and rheumatism*. 1995;38(7):926-38.
113. Russell IJ. Advances in fibromyalgia: possible role for central neurochemicals. *The American journal of the medical sciences*. 1998;315(6):377-84.
114. Bradley LA, Alarcon GS. Is Chiari malformation associated with increased levels of substance P and clinical symptoms in persons with fibromyalgia? *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(12):2731-2.
115. Wood PB. Role of central dopamine in pain and analgesia. Expert review of neurotherapeutics. 2008;8(5):781-97.
116. Wood PB, Schweinhardt P, Jaeger E, Dagher A, Hakyemez H, Rabiner EA, et al. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. *The European journal of neuroscience*. 2007;25(12):3576-82.

117. Burgmer M, Pogatzki-Zahn E, Gaubitz M, Wessoleck E, Heuft G, Pfliegerer B. Altered brain activity during pain processing in fibromyalgia. *NeuroImage*. 2009;44(2):502-8.
118. Staud R. Evidence of involvement of central neural mechanisms in generating fibromyalgia pain. *Current rheumatology reports*. 2002;4(4):299-305.
119. van Wijk G, Veldhuijzen DS. Perspective on diffuse noxious inhibitory controls as a model of endogenous pain modulation in clinical pain syndromes. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2010;11(5):408-19.
120. Leffler AS, Hansson P, Kosek E. Somatosensory perception in a remote pain-free area and function of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in patients suffering from long-term trapezius myalgia. *European journal of pain*. 2002;6(2):149-59.
121. 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. *The Journal of clinical psychiatry*. 2011;72(2):219-24.
122. Grisart J, Van der Linden M, Masquelier E. Controlled processes and automaticity in memory functioning in fibromyalgia patients: relation with emotional distress and hypervigilance. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*. 2002;24(8):994-1009.
123. McDermid AJ, Rollman GB, McCain GA. Generalized hypervigilance in fibromyalgia: evidence of perceptual amplification. *Pain*. 1996;66(2-3):133-44.
124. Staud R, Robinson ME, Vierck CJ, Jr., Price DD. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) attenuate temporal summation of second pain in normal males but not in normal females or fibromyalgia patients. *Pain*. 2003;101(1-2):167-74.
125. Baraniuk JN, Whalen G, Cunningham J, Clauw DJ. Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. *BMC musculoskeletal disorders*. 2004;5:48.
126. Harris RE, Clauw DJ, Scott DJ, McLean SA, Gracely RH, Zubieta JK. Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(37):10000-6.
127. Sorensen J, Bengtsson A, Backman E, Henriksson KG, Bengtsson M. Pain analysis in patients with fibromyalgia. Effects of intravenous morphine, lidocaine, and ketamine. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1995;24(6):360-5.
128. Rao SG. Current progress in the pharmacological therapy of fibromyalgia. *Expert opinion on investigational drugs*. 2009;18(10):1479-93.
129. Younger JW, Zautra AJ, Cummins ET. Effects of Naltrexone on Pain Sensitivity and Mood in Fibromyalgia: No Evidence for Endogenous Opioid

Pathophysiology. PloS one. 2009;4(4):e5180.

130. Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1992;35(5):550-6.

131. Schwarz MJ, Offenbaecher M, Neumeister A, Ewert T, Willeit M, Praschak-Rieder N, et al. Evidence for an altered tryptophan metabolism in fibromyalgia. *Neurobiology of disease*. 2002;11(3):434-42.

132. Staud R, Robinson ME, Price DD. Temporal summation of second pain and its maintenance are useful for characterizing widespread central sensitization of fibromyalgia patients. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2007;8(11):893-901.

133. Staud R, Vierck CJ, Robinson ME, Price DD. Effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dextromethorphan on temporal summation of pain are similar in fibromyalgia patients and normal control subjects. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2005;6(5):323-32.

134. Price DD. Characteristics of second pain and flexion reflexes indicative of prolonged central summation. *Experimental neurology*. 1972;37(2):371-87.

135. Price DD, Hu JW, Dubner R, Gracely RH. Peripheral suppression of first pain and central summation of second pain evoked by noxious heat pulses. *Pain*. 1977;3(1):57-68.

136. Staud R, Vierck CJ, Cannon RL, Mauderli AP, Price DD. Abnormal sensitization and temporal summation of second pain (wind-up) in patients with fibromyalgia syndrome. *Pain*. 2001;91(1-2):165-75.

137. Michael GJ, Averill S, Nitkunan A, Rattray M, Bennett DL, Yan Q, et al. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(21):8476-90.

138. Akbarian S, Rios M, Liu RJ, Gold SJ, Fong HF, Zeiler S, et al. Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(10):4153-62.

139. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(7):2295-313.

140. Walker SM, Downes CP, Leslie NR. TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase. *The Biochemical journal*. 2001;360(Pt 2):277-83.

141. Lever IJ, Bradbury EJ, Cunningham JR, Adelson DW, Jones MG, McMahon SB, et al. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(12):4469-77.
142. Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neuroscience letters*. 2004;361(1-3):184-7.
143. Mamounas LA, Blue ME, Siuciak JA, Altar CA. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(12):7929-39.
144. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005;438(7070):1017-21.
145. Kossel AH, Cambridge SB, Wagner U, Bonhoeffer T. A caged Ab reveals an immediate/instructive effect of BDNF during hippocampal synaptic potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(25):14702-7.
146. Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 1996;381(6584):706-9.
147. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(19):8856-60.
148. Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*. 1996;16(6):1137-45.
149. Zhou L-J, Zhong Y, Ren W-J, Li Y-Y, Zhang T, Liu X-G. BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *Experimental neurology*. 2008;212(2):507-14.
150. Sandkuhler J, Liu X. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *The European journal of neuroscience*. 1998;10(7):2476-80.
151. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 2004;44(1):5-21.
152. Haas L, Portela LV, Bohmer AE, Oses JP, Lara DR. Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in patients with fibromyalgia. *Neurochemical research*. 2010;35(5):830-4.

153. Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(1):23-36.
154. Marenholz I, Heizmann CW. S100A16, a ubiquitously expressed EF-hand protein which is up-regulated in tumors. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;313(2):237-44.
155. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(51):40096-105.
156. Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiology of aging*. 2010;31(4):665-77.
157. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Current molecular medicine*. 2013;13(1):24-57.
158. Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Sacher J, Steiner J, Blasig IE, Mueller K. Mood disorders are glial disorders: evidence from in vivo studies. *Cardiovascular psychiatry and neurology*. 2010;2010:780645.
159. Kleindienst A, Schmidt C, Parsch H, Emtmann I, Xu Y, Buchfelder M. The Passage of S100B from Brain to Blood Is Not Specifically Related to the Blood-Brain Barrier Integrity. *Cardiovascular psychiatry and neurology*. 2010;2010:801295.
160. Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, et al. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology*. 2010;75(20):1786-93.
161. Reeves RH, Yao J, Crowley MR, Buck S, Zhang X, Yarowsky P, et al. Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(12):5359-63.
162. Gerlai R, Roder J. Abnormal exploratory behavior in transgenic mice carrying multiple copies of the human gene for S100 beta. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*. 1995;20(2):105-12.
163. Gerlai R, Wojtowicz JM, Marks A, Roder J. Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learning & memory*. 1995;2(1):26-39.
164. Winocur G, Roder J, Lobaugh N. Learning and memory in S100-beta transgenic mice: an analysis of impaired and preserved function. *Neurobiology of learning and memory*. 2001;75(2):230-43.
165. Bell K, Shokrian D, Potenzieri C, Whitaker-Azmitia PM. Harm avoidance,

- anxiety, and response to novelty in the adolescent S-100beta transgenic mouse: role of serotonin and relevance to Down syndrome. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2003;28(10):1810-6.
166. Shi Y, Gelman BB, Lisinicchia JG, Tang S-J. Chronic-Pain-Associated Astrocytic Reaction in the Spinal Cord Dorsal Horn of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(32):10833-40.
167. Teepker M, Munk K, Mylius V, Haag A, Moller JC, Oertel WH, et al. Serum concentrations of s100b and NSE in migraine. *Headache*. 2009;49(2):245-52.
168. Yilmaz N, Karaali K, Ozdem S, Turkay M, Unal A, Dora B. Elevated S100B and neuron specific enolase levels in patients with migraine-without aura: evidence for neurodegeneration? *Cellular and molecular neurobiology*. 2011;31(4):579-85.
169. Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K. Contribution of microglia and astrocytes to the central sensitization, inflammatory and neuropathic pain in the juvenile rat. *Molecular pain*. 2012;8:43.
170. Hauser W, Urrutia G, Tort S, Uceyler N, Walitt B. Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) for fibromyalgia syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;1:CD010292.
171. Nishishinya B, Urrutia G, Walitt B, Rodriguez A, Bonfill X, Alegre C, et al. Amitriptyline in the treatment of fibromyalgia: a systematic review of its efficacy. *Rheumatology*. 2008;47(12):1741-6.
172. Smith B, Peterson K, Fu R, McDonagh M, Thakurta S. Drug Class Review: Drugs for Fibromyalgia: Final Original Report [Internet]. Drug Class Reviews. Portland (OR): Oregon Health & Science University;; 2011 Apr.
173. Üceyler N, Häuser W, Sommer C. A systematic review on the effectiveness of treatment with antidepressants in fibromyalgia syndrome. *Arthritis care & research*. 2008;59(9):1279-98.
174. Staud R. Pharmacological treatment of fibromyalgia syndrome: new developments. *Drugs*. 2010;70(1):1-14.
175. Carville SF, Arendt-Nielsen S, Bliddal H, Blotman F, Branco JC, Buskila D, et al. EULAR evidence-based recommendations for the management of fibromyalgia syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(4):536-41.
176. Moreno RA, Moreno DH, Soares MBdM. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 1999;21:24-40.
177. Abeles M, Solitar BM, Pillinger MH, Abeles AM. Update on fibromyalgia therapy. *The American journal of medicine*. 2008;121(7):555-61.
178. Bennett RM, Gatter RA, Campbell SM, Andrews RP, Clark SR, Scarola JA. A

comparison of cyclobenzaprine and placebo in the management of fibrositis. A double-blind controlled study. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(12):1535-42.

179. Carette S, Bell MJ, Reynolds WJ, Haraoui B, McCain GA, Bykerk VP, et al. Comparison of amitriptyline, cyclobenzaprine, and placebo in the treatment of fibromyalgia. A randomized, double-blind clinical trial. *Arthritis and rheumatism*. 1994;37(1):32-40.

180. Tofferi JK, Jackson JL, O'Malley PG. Treatment of fibromyalgia with cyclobenzaprine: A meta-analysis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;51(1):9-13.

181. Ataoglu S, Ataoglu A, Erdogan F, Sarac J. Comparison of paroxetine, amitriptyline in the treatment of fibromyalgia. *Turk J Med Sci*. 1997;27:535-9.

182. Çapaci K, Hepgüler S. Comparison of the effects of amitriptyline and paroxetine in the treatment of fibromyalgia syndrome. *The Pain Clinic*. 2002;14(3):223-8.

183. Goldenberg D, Mayskiy M, Mossey C, Ruthazer R, Schmid C. A randomized, double-blind crossover trial of fluoxetine and amitriptyline in the treatment of fibromyalgia. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(11):1852-9.

184. Arnold LM, Gendreau RM, Palmer RH, Gendreau JF, Wang Y. Efficacy and safety of milnacipran 100 mg/day in patients with fibromyalgia: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(9):2745-56.

185. Arnold LM, Lu Y, Crofford LJ, Wohlreich M, Detke MJ, Iyengar S, et al. A double-blind, multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients with or without major depressive disorder. *Arthritis & Rheumatism*. 2004;50(9):2974-84.

186. Arnold LM, Rosen A, Pritchett YL, D'Souza DN, Goldstein DJ, Iyengar S, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of duloxetine in the treatment of women with fibromyalgia with or without major depressive disorder. *Pain*. 2005;119(1-3):5-15.

187. Arnold LM, Clauw DJ, Wohlreich MM, Wang F, Ahl J, Gaynor PJ, et al. Efficacy of duloxetine in patients with fibromyalgia: pooled analysis of 4 placebo-controlled clinical trials. *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry*. 2009;11(5):237-44.

188. Branco JC, Zachrisson O, Perrot S, Mainguy Y, Multinational Coordinator Study G. A European multicenter randomized double-blind placebo-controlled monotherapy clinical trial of milnacipran in treatment of fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2010;37(4):851-9.

189. Hauser W, Bernardy K, Uceyler N, Sommer C. Treatment of fibromyalgia syndrome with antidepressants: a meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009;301(2):198-209.

190. Häuser W, Wolfe F, Tölle T, Üçeyler N, Sommer C. The Role of Antidepressants in the Management of Fibromyalgia Syndrome. *CNS Drugs*. 2012;26(4):297-307.
191. Wiffen PJ, Derry S, Moore RA, Aldington D, Cole P, Rice AS, et al. Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia - an overview of Cochrane reviews. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013;11:CD010567.
192. Tzellos TG, Toulis KA, Goulis DG, Papazisis G, Zampeli VA, Vakfari A, et al. Gabapentin and pregabalin in the treatment of fibromyalgia: a systematic review and a meta-analysis. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2010;35(6):639-56.
193. Arnold LM, Goldenberg DL, Stanford SB, Lalonde JK, Sandhu HS, Keck PE, Jr., et al. Gabapentin in the treatment of fibromyalgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(4):1336-44.
194. Spaeth M. Is pregabalin a safe and effective treatment for patients with fibromyalgia? *Nature clinical practice Rheumatology*. 2008;4(10):514-5.
195. Hauser W, Petzke F, Sommer C. Comparative efficacy and harms of duloxetine, milnacipran, and pregabalin in fibromyalgia syndrome. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2010;11(6):505-21.
196. Stefani LC, Torres IL, de Souza IC, Rozisky JR, Fregni F, Caumo W. BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects. *Neuroscience letters*. 2012;514(1):62-6.
197. Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, Norrie G, Zhdanova I, Ben-Shushan A, et al. Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep medicine reviews*. 2005;9(1):41-50.
198. Dominguez Rodriguez A, Abreu Gonzalez P. Ischemia-reperfusion injury and melatonin. *Revista espanola de cardiologia*. 2009;62(8):952-3; author reply 3-4.
199. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Clinical aspects of melatonin in the acute coronary syndrome. *Current vascular pharmacology*. 2009;7(3):367-73.
200. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biology of reproduction*. 2009;81(3):445-56.
201. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews*. 2005;9(1):11-24.
202. Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert opinion on investigational drugs*. 2001;10(3):467-76.
203. Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*. 1960;131(3409):1312.

204. Brzezinski A. Melatonin in humans. *The New England journal of medicine*. 1997;336(3):186-95.
205. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Moscovitch A, Trakht I, Brown GM, et al. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: Mechanisms of action. *Brain research bulletin*. 2010;81(4-5):362-71.
206. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005;27(2):101-10.
207. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(46):28531-4.
208. Ambriz-Tututi M, Rocha-Gonzalez HI, Cruz SL, Granados-Soto V. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life sciences*. 2009;84(15-16):489-98.
209. Golombek DA, Pevet P, Cardinali DP. Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 1996;20(3):403-12.
210. Wang T, Li SR, Dai X, Peng YL, Chen Q, Wang R. Effects of melatonin on orphanin FQ/nociceptin-induced hyperalgesia in mice. *Brain research*. 2006;1085(1):43-8.
211. Li SR, Wang T, Wang R, Dai X, Chen Q, Li RD. Melatonin enhances antinociceptive effects of delta-, but not mu-opioid agonist in mice. *Brain research*. 2005;1043(1-2):132-8.
212. Chneiweiss H, Glowinski J, Premont J. Mu and delta opiate receptors coupled negatively to adenylate cyclase on embryonic neurons from the mouse striatum in primary cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1988;8(9):3376-82.
213. Odagaki Y, Nishi N, Koyama T. Functional coupling of GABA(B) receptors with G proteins that are sensitive to N-ethylmaleimide treatment, suramin, and benzalkonium chloride in rat cerebral cortical membranes. *Journal of neural transmission*. 2000;107(10):1101-16.
214. Nash MS, Osborne NN. Agonist-induced effects on cyclic AMP metabolism are affected in pigment epithelial cells of the Royal College of Surgeons rat. *Neurochemistry international*. 1995;27(3):253-62.
215. Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter RJ, Rosenberg J, Gogenur I. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies. *Journal of pineal research*. 2011;51(3):270-7.
216. van den Top M, Buijs RM, Ruijter JM, Delagrange P, Spanswick D, Hermes

ML. Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic nucleus neurones in vitro independent of their circadian rhythm. *Neuroscience*. 2001;107(1):99-108.

217. Nelson CS, Ikeda M, Gompf HS, Robinson ML, Fuchs NK, Yoshioka T, et al. Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagine-124. *Molecular endocrinology*. 2001;15(8):1306-17.

218. Ayar A, Martin DJ, Ozcan M, Kelestimur H. Melatonin inhibits high voltage activated calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neuroscience letters*. 2001;313(1-2):73-7.

219. Damasceno F, Skinner GO, Araujo PC, Ferraz MM, Tenorio F, de Almeida OM. Nitric oxide modulates the hyperalgesic response to mechanical noxious stimuli in sleep-deprived rats. *BMC neuroscience*. 2013;14:92.

220. Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Age-related alterations in Ca²⁺ signals and mitochondrial membrane potential in exocrine cells are prevented by melatonin. *Journal of pineal research*. 2008;45(2):191-8.

221. Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998;12(9):685-93.

222. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200.

223. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell biochemistry and biophysics*. 2001;34(2):237-56.

224. Raghavendra V, Agrewala JN, Kulkarni SK. Melatonin reversal of lipopolysaccharides-induced thermal and behavioral hyperalgesia in mice. *European journal of pharmacology*. 2000;395(1):15-21.

225. El-Shenawy SM, Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Batran S, Arbid MS. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2002;46(3):235-43.

226. Zhdanova IV, Wurtman RJ, Regan MM, Taylor JA, Shi JP, Leclair OU. Melatonin treatment for age-related insomnia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(10):4727-30.

7 ARTIGO 1 ORIGINAL EM INGLÊS

Higher serum S100B and BDNF levels are correlated with a lower pressure-pain threshold in fibromyalgia

Simone de Azevedo Zanette^{1,2,3,4, §}, Jairo Alberto Dussan-Sarria^{2,3,4, §}, Andressa de Souza^{2,3,4}, Alicia Deitos^{2,3,4}, Iraci da Silva Lucena Torres^{2,3,6}, Wolnei Caumo^{2,3,4,6, †}

¹ Physical Medicine and Rehabilitation Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. ² Post Graduate Program in Medical Sciences, UFRGS, Brazil. ³ Laboratory of Pain & Neuromodulation, HCPA/UFRGS, Brazil. ⁴ Pain and Palliative Care Service at HCPA/UFRGS, Brazil. ⁵ University Center Unilasalle, Brazil. ⁶ Associate Professor, Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brazil. [§]

Both authors contributed equally and should be considered as first authors.

[†]Corresponding author.

E-mail addresses:

Simone de Azevedo Zanette <simonezanette@yahoo.com>

Jairo Alberto Dussan-Sarria <jadussans@gmail.com>

Andressa de Souza <andressasz@gmail.com>

Alicia Deitos <aliciadeitos@gmail.com>

Iraci da Silva Lucena Torres <iracitorres@gmail.com>

Wolnei Caumo <caumo@cpovo.net>

ABSTRACT

Background

Fibromyalgia (FM) is conceptualized as a central sensitization (CS) condition, that presents high serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neuroglia activation. Although the S100B protein regulates neuroglia functions, it has been traditionally used as a proxy of central nervous system damage. However, neither BDNF nor S100B association with the clinical picture of FM has been elucidated. To explore their association with the pressure-pain threshold (PPT) in FM, we performed a cross-sectional study, including 56 females with confirmed FM aged 18-65 years. Linear regression models were used to adjust for potential confounding factors between serum BDNF, S100B and PPT.

Results

Serum BDNF and S100B were correlated (Spearman's $Rho=0.29$). Serum BDNF (*log*) and S100B (*log*) were correlated with the PPT (*log*) (Partial $\eta^2=0.129$, $P=0.012$ for the BDNF (*log*), and Partial $\eta^2=0.105$, $P=0.025$ for the S100B (*log*)). Serum BDNF (*log*) was inversely associated with PPT (*log*) ($\beta=-1.01$, $SE=0.41$), age ($\beta=-0.02$, $SE=0.15$) and obsessive compulsive disorder ($\beta=-0.36$, $SE=0.15$), while serum S100B (*log*) was inversely associated with PPT (*log*) ($\beta=-1.38$, $SE=0.50$), only.

Conclusions

Both neuroglia key mediators in the CS process were inversely correlated with the PPT. Serum assessment of BDNF and S100B deserve further study to determine its potential as a proxy for the CS spectrum in FM.

Key words

Fibromyalgia, S100B, BDNF, pain-pressure threshold, central sensitization.

Background

Fibromyalgia (FM) is estimated to affect between 1.6% [1] and 6.4% [2] of the population, and is characterized by widespread chronic pain accompanied by fatigue, non-satisfying sleep and cognitive symptoms [3]. Although its pathophysiology is not fully understood, abnormalities in pain processing [4] related to central sensitization (CS) and a reduced descending pain modulation with sensory amplification [5, 6] have been recognized as components of FM. In the CS model, pain hypersensitivity and enhanced receptive field characteristics of the disease [7] may be explained as a consequence of increased neuronal membrane excitability, synaptic facilitation and nociceptive pathway disinhibition mediated at the molecular level by the modification of receptor kinetics (*e.g.*, N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)) [8] and at the cellular level by the interaction of both neurons and microglia interchanging neurotransmitters and inflammatory cytokines (*e.g.*, substance P, tumor necrosis factor alpha, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF)), which results in enhanced neuronal and nociceptive pathway functions [8-10].

BDNF is a neurotrophic factor that is widely distributed in the central nervous system (CNS) and is capable of strengthening excitatory (glutamatergic) synapses as well as weakening inhibitory (GABAergic) synapses [11]. In the context of CS, microglial cells activated by astrocytes can also release BDNF, which reduces the expression of the Cl^- -cotransporter K^+ - Cl^- exporter (KCC2) in the dorsal horn. This results in the accumulation of intracellular Cl^- , which further limits the GABAergic inhibitory effect on these nociceptors, thereby promoting disinhibition [8]. BDNF produced in the CNS is transported through the blood-brain barrier via saturable systems [12-14], and contributes to 70-80% of circulating BDNF [15]. Although circulating levels of BDNF

have been found to be elevated in FM compared with controls, its association with the patients' clinical complaints remains elusive.

Despite known role of astrocytes and microglia in the CS [16], surrogates of their activity other than BDNF have been scarcely explored in FM patients. S100B is a Ca^{2+} -binding protein that, at higher concentrations, upregulates Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor α expression and activates the Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) via the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in microglia and astrocytes [17, 18], all of which are involved in CS progression and maintenance [8]. Elevated S100B serum levels have been correlated with mood disorders [19] and have been studied as an outcome predictor in severe traumatic brain injury [20, 21] but have not been previously explored in a chronic pain syndrome.

Thus, considering that both BDNF and S100B play relevant roles in CS and that both factors can be assessed in serum, we hypothesized that 1) serum levels of both BDNF and S100B may be associated with FM, and 2) both serum mediators could have an association with the pressure-pain threshold (PPT). To test our hypotheses, we performed a cross-sectional study of FM patients, examined their serum BDNF and S100B levels, and evaluated their clinical and algometrical characteristics.

Results

Two hundred and seventy-one patients were screened, and 215 patients were excluded (205 patients did not meet the inclusion criteria, and 10 of the patients did not consent to participate). Fifty-six subjects were included in the final analysis. The demographic and clinical characteristics of the sample are described in **Table 1**. The assessed levels of serum BDNF and S100B are described in **Table 2**. Both serum BDNF and S100B

showed a significant non-parametric correlation (Spearman's $Rho=0.289$, $P=0.031$), which means that the patients with higher BDNF presented higher S100B (**Figure 1**).

To study the potential effect of confounders, multiple linear regressions were performed independently using the logarithmic transformation of both BDNF and S100B as dependent variables and the clinical characteristics with the potential confounding effect as covariates, including age, body mass index (BMI), years of education, employment status, smoking status, use of alcohol (yes/no), diagnosis of arterial hypertension, psychiatric diagnoses according to the MINI, frequency of use of over-the-counter analgesics, mean pain on the visual analog scale on the 0-100 mm scale (VAS₀₋₁₀₀), score on the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), score on the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS), Pain Catastrophizing Scale score adapted for the Brazilian population (B-PCS) and its dominions, the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), the PPT (*log*), the Widespread Pain Index (WPI) and the Symptom Severity (SS) scale score.

Variables that were independently correlated with BDNF (*log*) and S100B (*log*) significant in the multiple linear regression models included age, log PPT and obsessive compulsive disorder according to the MINI. These variables were subsequently entered as independent variables in the multivariate linear regression model, where both BDNF and S100B logarithmic transformations were entered as dependent variables. The analysis showed a significant correlation between the PPT (*log*) (Wilks' $\lambda=0.809$, $F=5.306$ $P=0.009$, Partial $\eta^2=0.191$) and obsessive compulsive disorder (Wilks' $\lambda=0.864$, $F=3.553$ $P=0.037$, Partial $\eta^2=0.136$) (**Table 3**).

Estimators of the association in the multivariate model are presented in **Table 3**. Both serum mediators were inversely correlated with PPT (*log*). Scatter plots of the raw PPT, BDNF and S100B are presented for illustrative purposes in **Figure 2**, showing

that an inverse non-parametric correlation between them and the PPT was also presented. Such non-parametric correlation means that patients with greater PPT had lower serum mediators. The PPT (*log*) (Cohen's $f^2=0.23$) had medium effect size for the BDNF (*log*), and a small effect size for the S100B (*log*) (Cohen's $f^2=0.16$). Although the WPI presented a non-parametric correlation with the PPT (*log*) (Spearman's $Rho=-0.506$, $P<0.001$) it was not correlated with BDNF (Spearman's $Rho=0.105$, $P=0.465$) nor S100B (Spearman's $Rho=0.260$, $P=0.065$).

Discussion

Our results support the hypothesis of a correlation between serum BDNF and S100B in FM patients and their association with PPT. This is the first report of serum S100B levels in a human FM sample and its association with another mediator of CS, serum BDNF. Furthermore, we observed that both serum BDNF and S100B were higher in FM patients with lower PPT.

To the best of our knowledge, this is the first study to assess serum S100B in a human sample with FM. In animal models of hyperalgesia induced by chronic restraint and with unpredictable stress, serum S100B was found to be consistently elevated, although its concentration was not related to brain tissue levels [22, 23]. Nevertheless, in healthy female humans, serum S100B has been correlated with its concentration in oligodendrocytes, particularly in the frontal, parietal, corpus callosum, dorsolateral prefrontal, and temporal white matter [24, 25], and, to a lesser degree, in the dorsolateral prefrontal and temporal cortices [25]. Thus, the serum levels of S100B may represent white matter structural changes, which, at the cellular level, indicate that this serum mediator might be a proxy of neuroglia changes. Thus, the indirect assessment of CS is valuable because it would demonstrate the role of neuroglia in this pathological phenomenon [16]. Although astrocytic S100B has been correlated with

serotonergic drug activity [19, 26], our study did not assess neither adjust for serotonergic parameters or psychotropic drugs to address this possible correlation in the present sample.

BDNF had previously been studied in FM, and although its serum [27, 28], plasma [29] and cerebrospinal fluid [30] levels have been consistently found to be elevated compared with controls, its association with PPT has not been previously reported in FM. A relationship between BDNF and the PPT has been previously described in healthy volunteers, and its direction is dependent on gender, where females exhibit proportional PPT and BDNF, while males demonstrate an inverse relationship [31]. Although our female FM sample had a response that contrasted to that found in healthy females and was similar to the samples of healthy males, we cannot exclude the possibility that menopause could be involved in the observed effect, due to the mean age of our sample and the lack of control for hormonal levels in our study [31]. The serum BDNF relationship with PPT may be tracked at different levels, because BDNF is widely distributed in the CNS and its binding to its high-affinity trkB receptor enhances C fiber-evoked responses, thereby activating signaling pathways in the spinothalamic track and subsequently strengthening excitatory synapses while promoting disinhibition of descending pathways [8].

Using different neuroimaging approaches (*i.e.*, magnetoencephalography (MEG) [32], functional magnetic resonance imaging (fMRI) [33], proton magnetic resonance spectroscopy (H-MRS) [34]), it has been shown that lower PPT is correlated with higher brain activation in FM compared to controls. Lower PPT has also been associated with higher concentrations of glutamate within the posterior insula, which supports the finding of enhanced excitatory neurotransmission in FM [34]. Furthermore, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene encoding the

catechol-O-methyltransferase (COMT) (*i.e.*, *met/met* genotype *Val158Met* SNP), which has also been postulated to contribute to the pathogenesis of FM, have been correlated with lower PPT [35]. Taken together, these findings support the validity of using PPT in FM as a proxy for these hypothesized pathophysiological mechanisms. Our results further suggest that the PPT might also represent the CS mechanisms involved in FM, because lower PPT is correlated with higher BDNF and S100B, which are mediators involved in CS. Also, the WPI was inversely correlated with the PPT, indicating that those with lower threshold tend to present greater number of painful areas.

Other clinical characteristics were also correlated with serum BDNF and S100B. The inverse correlation of age with BDNF has been previously described in healthy subjects [28] but not in FM patients. As a component of the regression modeling, the effect of other confounders on the association between PPT and serum mediators was adjusted. In more than half of our sample, a major depression disorder in the MINI was identified, thereby representing a higher prevalence than previously reported in a Canadian representative survey [36]. Nevertheless, these differences may be attributed to different diagnostic and sampling methods employed by the study. Importantly, chronic pain is strongly associated with depressive symptoms [37, 38], which limits the extent to which this potential confounding factor may be controlled, because it is a component of chronic pain syndromes. Psychiatric disorders are expected to affect the association of the PPT and serum mediators studied; however, only the obsessive compulsive disorder, which is a component of the spectrum of anxiety disorders, showed an effect on serum BDNF. Although other studies have failed to demonstrate that serum BDNF levels differ between FM and controls with comparable anxiety levels [28], we cannot conclude that anxiety itself [39] or the associated antidepressant drugs [27] used had an effect on both BDNF and S100B levels. Because we only

recruited females in our sample, care should be taken when extrapolating for the male population because the association of BDNF with PPT is correlated with gender in healthy subjects [31] and male FM patients present lower PPT compared to females [40].

Because CS is conceptualized as a continuum phenomenon in which FM lies at one of its extremes[41] and PPT is proportionally associated with alterations in genetic and cortical activation in the FM, our findings suggest that the serum assessment of BDNF and S100B may also be considered as a proxy of the CS spectrum in FM. A serum test related to CS and available for clinicians would provide patients and caregivers with an additional tool to improve their understanding of FM, and would help to alleviate the burden of suffering or accompanying a condition that is unfortunately socially perceived as occurring “all in the head” of patients. The cross-sectional nature of our study design does not allow for the inference of causality, and thus, future studies are required to determine how these mediators may be responsible of the reduction in PPT in FM patients, and if they may represent biomarkers for this condition. Besides that, because our study did not include healthy controls, care must be taken regarding generalization out of the FM population. Also, it is worth noting that as expected for the characteristics of the disease, plenty of patients in our sample used psychotropic drugs including antidepressants, which have been associated with modulation of the BDNF [27]. Taken together, these findings may be applicable for clinical use to define therapeutic approaches, particularly considering that PPT is a quantitative clinical tool to assess tenderness and sensitization in FM with good reproducibility and discrimination ability [22-24]. Because genetic [25] and neuroimaging studies [26-28] have consistently shown its association with changes attributed to the CS, PPT may also be considered as a powerful tool for translational purposes in FM research.

Conclusions

This study provides additional evidence supporting the existence of a relationship between serum S100B and BDNF in FM and brings attention towards their value as clinical tools to assess CS. Taken together, these results suggest that similar to the BDNF, S100B serum levels may also be studied as a proxy of CS mechanisms in FM, raising the possibility of further exploration of its potential use as a biomarker in CS syndromes.

Methods

The methods and results sections are reported according to STROBE guidelines [42]. All patients provided written informed consent prior to their participation in this study, and the protocol was approved by the Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Institutional Review Board IRB 0000921), according to the Declaration of Helsinki (Resolution 196/96 of National Health Council).

Study Design, Settings and Participants

A cross-sectional study was performed at HCPA, Brazil, between March 2011 and December 2013. Subjects were invited from the outpatient clinics of Physical Medicine & Rehabilitation at HCPA, and by newspaper advertisement. Adult female patients with a diagnosis of FM were invited to participate. We included patients with FM diagnosis confirmed by an experienced physiatrist (SAZ) according to the criteria of the American College of Rheumatology [3] and who had pain on the visual analog scale (VAS_{0-100 mm}) equal to or higher than 50 mm during one week preceding the assessment. To assess pain on the VAS_{0-100mm}, patients were presented a continuous 100mm line and were asked to mark the point that best represented their mean pain during most of the time of the past week, where 0 mm represented no pain at all and

100 mm represented the worst pain ever. A psychiatric interview was also performed on patients to screen for potential disorders; however, patients were not excluded based on these diagnoses. Exclusion criteria were evidence of inflammatory rheumatic disease, autoimmune disorder, and history of substance abuse, neurological or oncologic disease, ischemic heart disease, kidney or hepatic insufficiency.

Dependent variables

The dependent variables of interest were serum BDNF and serum S100B. Biological samples were collected early in the morning. All the materials were obtained in plastic tubes and centrifuged for 10 minutes at 4500 rpm at 4°C. Serum was frozen at -80°C until further analyses. Serum mediator concentrations were determined using BDNF (Chemicon/Millipore, catalog no. CYT306, lower detection limit of the kit = 7.8 pg/mL) and S100B (Millipore, Missouri, USA, catalog no. EZHS100B-33K, lower detection limit of the kit = 2.7 pg/mL) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, according to the manufacturers' instructions.

Independent variables

After gathering biological samples an interview to address all the questionnaires was performed. Diagnoses of psychiatric disorders were performed according to the criteria of the psychiatrist interviewer using the MINI screening questionnaire. All of the psychological tests used in this study had been validated for the Brazilian population and were applied by a psychiatrist experienced in the administration of these tests. The patients' baseline depressive symptoms were assessed using the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS). The pain catastrophizing scale validated for the Brazilian population (B-PCS) was a self-administered questionnaire that consisted of 13 items to assess the extent of the patients' catastrophizing thoughts and behaviors, with a score ranging from 0 to 52 [43]. Sleep quality was assessed using the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) [44]. Demographic data and medical comorbidities were assessed

using a standardized questionnaire from our laboratory. Analgesic use was assessed by the number of doses used weekly within the last 3 months. The Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) was applied because it is a disease-specific questionnaire that has been validated for use in the Brazilian population [45]. It consists of 10 domains, and the maximum possible score is 100.

To assess the pressure-pain threshold (PPT), patients were asked to differentiate the perception of pressure versus the perception of “onset of pain”. The patients were instructed to verbally report as soon as the perception of pain began. The investigator (SAZ) assessing the PPT was trained and unable to view the display of pressure intensities. An electronic algometer (J Tech Medical Industries, USA) was used. The device consisted of a 1-cm² hard-rubber probe, which was applied over all of the tender points. The average values of the PPT in kgf/cm² (lb/cm²) for three successive readings were obtained at intervals of 3-5 min and used as outcomes. The number of tender points was determined using the PPT in the classical areas previously described by the American College of Rheumatology for FM criteria [46].

Efforts to address potential sources of bias

To reduce assessment bias, only one researcher (SAZ) was involved in all of the assessments with the exception of the MINI, which in turn was applied by one psychiatrist. The evaluator (SAZ) is a practicing physiatrist of the outpatient clinic at HCPA with vast clinical expertise, who is well trained in the application of clinical scales and PPT assessment, as well as in the care of chronic pain patients. The algometer used (J Tech Medical Industries, USA) was calibrated and was acquired from a recognized provider in Brazil.

Sample size

Considering type I and II errors of 0.05 and 0.20, respectively, and anticipating an

effect size (f^2) of 0.25 for multiple regression analysis, which allows for four predictors [47], a sample size of 53 patients was estimated. A sample of 56 patients was determined to account for unexpected factors, which would decrease the study power and increase the increased variability of our sample or missing data.

Statistical Methods

Conventional central tendency statistics were used to summarize and present the main features of the sample. Distribution of the variables was tested using the Shapiro-Wilk test. Non-normally distributed variables were subjected to logarithmic transformation. After confirming the corresponding assumptions, linear regression analysis with forward selection controlling for co-linearity [48] and autocorrelation (Durbin-Watson test) was performed to identify potential confounders in the association between the main independent variables of interest (i.e., clinical scales and PPT) and serum markers (i.e., BDNF and S100B). The covariates included in the model were those that presented a correlation coefficient equal to or higher than 0.3 with a P-value <0.15, including age, body mass index, years of education, employment status, smoking status, alcohol use, diagnosis of arterial hypertension, presence of psychiatric diagnosis according to the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI), the Widespread Pain Index (WPI), the Symptom Severity (SS) scale score according to the ACR 2010 FM diagnostic criteria, and the number of analgesic doses used per week. Each MINI potential diagnosis was entered in the model as a dichotomous variable, where having a diagnosis (i.e., major depression, major depression with dysthymia, dysthymia, suicidal risk, hypo-maniac episode, panic disorder, agoraphobia, social phobia, obsessive compulsive disorder, post-traumatic stress disorder, alcohol dependence or abuse, non-alcoholic substance abuse, psychotic syndrome, nervous anorexia, nervous bulimia, anti-social personality disorder, or maniac-depressive disorder) was coded as 1 or 0

otherwise. Only covariates (PPT, age, and obsessive compulsive disorder) that were retained in each model were included in the final multivariate linear regression model with both serum markers as dependent variables (*i.e.* BDNF and S100B). Cohen's f^2 effect size was calculated using an effect size calculator for multiple regressions given the values of R^2 [47]. The alpha level was set at 0.05. The data were analyzed using SPSS version 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

List of abbreviations

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; FM: Fibromyalgia; CS: Central Sensitization; BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor; PPT: Pressure-Pain Threshold; NMDA: N-Methyl-D-Aspartate; AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; CNS: Central Nervous System; KCC2: Chloride-cotransporter Potassium and Chloride exporter; GABA: Gamma-Aminobutyric Acid; RAGE: Receptor for Advanced Glycation End Products; BMI: Body Mass Index; MINI: Mini International Neuropsychiatric Interview; PSQI: Pittsburgh Sleep Quality Index; HDRS: Hamilton Depression Rating Scale; B-PCS: Pain Catastrophizing Scale validated for the Brazilian population; FIQ: Fibromyalgia Impact Questionnaire; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

Acknowledgements

This study was supported by grants and material support obtained from the following Brazilian agencies: Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES - PNPd/CAPES (grants to de Souza A, Deitos A) and material support; National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (grants to Dussan-Sarria JA, Torres ILS, Caumo W); Postgraduate Program in Medical Sciences at the School of Medicine of the Federal University of Rio Grande do Sul (material support); Postgraduate Research Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre

(material support); and the Foundation for Support of Research at Rio Grande do Sul (FAPERGS) (grant to Caumo W).

Competing interests

The authors declare that there are no financial or other relationships that might lead to conflicts of interest for any of the following arrangements: financial relationship to the work; employees of a company; consultants for a company; stockholders of the company; members of a speaker's bureau or any other financial form.

Authors' contributions

Caumo W, Torres ISL and Zanette SA conceived and designed the study. Zanette SA, de Souza A and Deitos A acquired data. Dussan-Sarria JA, Torres ISL and Caumo W analyzed and interpreted the data. Caumo W, Zanette SA and Dussan-Sarria JA drafted the manuscript. All of authors have read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Perrot S, Vicaut E, Servant D, Ravaud P: **Prevalence of fibromyalgia in France: a multi-step study research combining national screening and clinical confirmation: The DEFI study (Determination of Epidemiology of F**I**bromyalgia).** *BMC Musculoskelet Disord* 2011, **12**:224.
2. Vincent A, Lahr BD, Wolfe F, Clauw DJ, Whipple MO, Oh TH, Barton DL, St Sauver J: **Prevalence of fibromyalgia: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, utilizing the Rochester Epidemiology Project.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013, **65**:786-792.
3. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB, Yunus MB: **The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010, **62**:600-610.
4. Bennett R: **Fibromyalgia: present to future.** *Curr Rheumatol Rep* 2005, **7**:371-376.
5. Staud R, Rodriguez ME: **Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006, **2**:90-98.
6. Staud R, Vierck CJ, Cannon RL, Mauderli AP, Price DD: **Abnormal sensitization and temporal summation of second pain (wind-up) in patients with fibromyalgia syndrome.** *Pain* 2001, **91**:165-175.
7. Woolf CJ: **Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain.** *Pain* 2011, **152**:S2-15.
8. Latremoliere A, Woolf CJ: **Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity.** *J Pain* 2009, **10**:895-926.

9. Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR: **Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord.** *J Neurosci* 2008, **28**:5189-5194.
10. Taves S, Berta T, Chen G, Ji RR: **Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain.** *Neural Plast* 2013, **2013**:753656.
11. Binder DK, Scharfman HE: **Brain-derived neurotrophic factor.** *Growth Factors* 2004, **22**:123-131.
12. Asmundson GJ, Norton PJ, Norton GR: **Beyond pain: the role of fear and avoidance in chronicity.** *Clin Psychol Rev* 1999, **19**:97-119.
13. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ: **Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier.** *Neuropharmacology* 1998, **37**:1553-1561.
14. Poduslo JF, Curran GL: **Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF.** *Brain Res Mol Brain Res* 1996, **36**:280-286.
15. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H: **Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise.** *Exp Physiol* 2009, **94**:1062-1069.
16. 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**:43.
17. Bianchi R, Giambanco I, Donato R: **S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha.** *Neurobiol Aging* 2010, **31**:665-677.
18. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL: **Functions of S100 proteins.** *Curr Mol Med* 2013, **13**:24-57.
19. Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Sacher J, Steiner J, Blasig IE, Mueller K: **Mood disorders are glial disorders: evidence from in vivo studies.** *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2010, **2010**:780645.
20. Kleindienst A, Schmidt C, Parsch H, Emtmann I, Xu Y, Buchfelder M: **The Passage of S100B from Brain to Blood Is Not Specifically Related to the Blood-Brain Barrier Integrity.** *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2010, **2010**:801295.
21. Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, Edwards M, Rosmalen CF, Vissers JL: **GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study.** *Neurology* 2010, **75**:1786-1793.
22. Imbe H, Kimura A, Donishi T, Kaneoke Y: **Effects of restraint stress on glial activity in the rostral ventromedial medulla.** *Neuroscience* 2013, **241**:10-21.
23. Luo KR, Hong CJ, Liou YJ, Hou SJ, Huang YH, Tsai SJ: **Differential regulation of neurotrophin S100B and BDNF in two rat models of depression.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010, **34**:1433-1439.
24. Streitburger DP, Arelin K, Kratzsch J, Thiery J, Steiner J, Villringer A, Mueller K, Schroeter ML: **Validating serum S100B and neuron-specific enolase as biomarkers for the human brain - a combined serum, gene expression and MRI study.** *PLoS One* 2012, **7**:e43284.
25. Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B: **Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in**

- human brain. *BMC Neurosci* 2007, **8**:2.**
26. Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Krebs M, Diefenbacher A, Blasig IE: **Serum markers support disease-specific glial pathology in major depression.** *J Affect Disord* 2008, **111**:271-280.
 27. Laske C, Stransky E, Eschweiler GW, Klein R, Wittorf A, Leyhe T, Richartz E, Kohler N, Bartels M, Buchkremer G, Schott K: **Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants.** *J Psychiatr Res* 2007, **41**:600-605.
 28. Nugraha B, Korallus C, Gutenbrunner C: **Serum level of brain-derived neurotrophic factor in fibromyalgia syndrome correlates with depression but not anxiety.** *Neurochem Int* 2013, **62**:281-286.
 29. Haas L, Portela LV, Bohmer AE, Oses JP, Lara DR: **Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in patients with fibromyalgia.** *Neurochem Res* 2010, **35**:830-834.
 30. Sarchielli P, Mancini ML, Floridi A, Coppola F, Rossi C, Nardi K, Acciarresi M, Pini LA, Calabresi P: **Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome.** *J Pain* 2007, **8**:737-745.
 32. Maestu C, Cortes A, Vazquez JM, del Rio D, Gomez-Arguelles JM, del Pozo F, Nevado A: **Increased brain responses during subjectively-matched mechanical pain stimulation in fibromyalgia patients as evidenced by MEG.** *Clin Neurophysiol* 2013, **124**:752-760.
 33. Diers M, Yilmaz P, Rance M, Thieme K, Gracely RH, Rolko C, Schley MT, Kiessling U, Wang H, Flor H: **Treatment-related changes in brain activation in patients with fibromyalgia syndrome.** *Exp Brain Res* 2012, **218**:619-628.
 34. Harris RE, Sundgren PC, Craig AD, Kirshenbaum E, Sen A, Napadow V, Clauw DJ: **Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**:3146-3152.
 35. Martinez-Jauand M, Sitges C, Rodriguez V, Picornell A, Ramon M, Buskila D, Montoya P: **Pain sensitivity in fibromyalgia is associated with catechol-O-methyltransferase (COMT) gene.** *Eur J Pain* 2013, **17**:16-27.
 36. Fuller-Thomson E, Nimigon-Young J, Brennenstuhl S: **Individuals with fibromyalgia and depression: findings from a nationally representative Canadian survey.** *Rheumatol Int* 2012, **32**:853-862.
 37. Giesecke T, Gracely RH, Williams DA, Geisser ME, Petzke FW, Clauw DJ: **The relationship between depression, clinical pain, and experimental pain in a chronic pain cohort.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:1577-1584.
 38. Schatzberg AF: **The relationship of chronic pain and depression.** *J Clin Psychiatry* 2004, **65 Suppl 12**:3-4.
 39. Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castren M, Castren E: **Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus.** *J Neurosci* 2005, **25**:1089-1094.
 40. Castro-Sánchez AM, Matarán-Peñarrocha GA, López-Rodríguez MM, Lara-Palomo IC, Arendt-Nielsen L, Fernández-de-las-Peñas C: **Gender differences in pain severity, disability, depression, and widespread pressure pain sensitivity in patients with fibromyalgia syndrome without comorbid conditions.** *Pain Med* 2012, **13**:1639-1647.
 41. Wolfe F, Walitt B: **Culture, science and the changing nature of fibromyalgia.** *Nat Rev Rheumatol* 2013, **9**:751-755.

42. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, Initiative S: **The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies.** *J Clin Epidemiol* 2008, **61**:344-349.
43. Sehn F, Chachamovich E, Vidor LP, Dall-Agnol L, de Souza IC, Torres IL, Fregni F, Caumo W: **Cross-cultural adaptation and validation of the Brazilian Portuguese version of the pain catastrophizing scale.** *Pain Med* 2012, **13**:1425-1435.
44. Bertolazi AN, Fagundes SC, Hoff LS, Dartora EG, Miozzo IC, de Barba ME, Barreto SS: **Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index.** *Sleep Med* 2011, **12**:70-75.
45. Marques AP, Santos AMB, Assumpção A, Matsutani LA, Lage LV, Pereira CAB: **Validação da versão brasileira do Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ).** *Revista Brasileira de Reumatologia* 2006, **46**:24-31.
46. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, Tugwell P, Campbell SM, Abeles M, Clark P, et al.: **The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee.** *Arthritis Rheum* 1990, **33**:160-172.
47. **A-priori Sample Size Calculator for Hierarchical Multiple Regression** [<http://www.danielsoper.com/statcalc>]
48. Katz MH: *Multivariable Analysis: a practical guide for clinicians.* Cambridge University Press; 1999.

Table 1. Characteristics of the sample (n=56)

Characteristic	Mean \pm SD
Age (years)	48.78 \pm 7.91
Body Mass Index (kg/m ²)	27.38 \pm 3.89
Years of education (median (Q ₂₅₋₇₅))	11 (6 - 14)
Number of trigger points (median (Q ₂₅₋₇₅))	14 (13 - 16)
Employed (yes/no)	41/15
Smoking (yes/no)	4/52
Alcohol use (yes/no)	7/49
Psychiatric Disorder according to the MINI (yes/no)*	
Major Depressive Episode	32/23
Major Depressive Episode with dysthymia	18/37
Dysthymia	10/45
Suicidal Risk	11/44
Hypo-maniac Episode	13/42
Panic Disorder	12/43
Agoraphobia	22/33
Social Phobia	11/44
Obsessive Compulsive Disorder	12/43
Post-Traumatic Stress Disorder	3/52
Psychotic Syndrome	1/54
Generalized Anxiety Disorder	28/27
Maniac-Depressive Disorder	2/53
Psychotropic drugs (yes/no)**	
Tricyclic antidepressant (yes/no)	24/15
Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (yes/no)	10/28
Benzodiazepine	4/35

Other chronic disease (yes/no)	28/28
Hypertension (yes/no)	14/42
Type 2 Diabetes Mellitus (yes/no)	1/55
Asthma (yes/no)	14/42
Number of analgesic doses used per week (median (Q ₂₅₋₇₅))	14 (7 - 21)
Widespread Pain Index (WPI)	15.11 ± 2.04
Symptom Severity (SS) Scale Score	7.43 ± 1.51
Pain on the VAS	70.21 ± 14.54
Pittsburgh Sleep Quality Index	22.09 ± 7.35
Hamilton Depression Rating Scale	19.93 ± 5.81
Pain Catastrophizing Scale (B-PCS) score	30.73 ± 11.65
Hopelessness	11.38 ± 4.91
Magnification	12 (7 - 15)
Rumination	8.14 ± 2.42
Pressure Pain Threshold (kg/cm ²)	2.09 ± 0.23
Fibromyalgia Impact Questionnaire	61.20 ± 12.82

* Patients could have none or more than one psychiatric disorder. One patient missed the interview for the MINI application.

** Some patients were using more than one type of drug

Table 2. Serum concentration of BDNF and S100B (n=56)

Serum Marker	Median (Q₂₅₋₇₅)	Mean ± SD
S100B (pg/mL)	14.42 (8.78 - 19.77)	16.15 ± 9.57
BDNF (ng/mL)	43.37 (30.03 - 69.99)	49.72 ± 24.84

Table 3. Multivariate linear regression model of the association between serum BDNF, S100B and clinical parameters, including the pressure-pain threshold (n=56)

Dependent variable	Type III Sum of squares	df	Mean square	F	P	Partial Eta Squared
BDNF (<i>log</i>)	4.369	3	1.456	7.855	0.001	0.339
S100B (<i>log</i>)	3.098	3	1.033	3.583	0.021	0.189

Dependent variable	β	SEM	t	P	Partial Eta Squared	
BDNF (<i>log</i>)						
Intercept	5.54	0.43	12.77	<0.001	0.760	
PPT (<i>log</i>)	-1.01	0.41	-2.62	0.012	0.129	
Age	-0.02	0.15	-2.31	0.025	0.104	
Obsessive Compulsive Disorder	-0.36	0.15	-2.42	0.019	0.113	
S100B (<i>log</i>)						
Intercept	3.66	0.37	9.89	<0.001	0.189	
PPT (<i>log</i>)	-1.38	0.50	-2.78	0.008	0.105	

Figure 1. Scatter plots of serum S100B and BDNF.

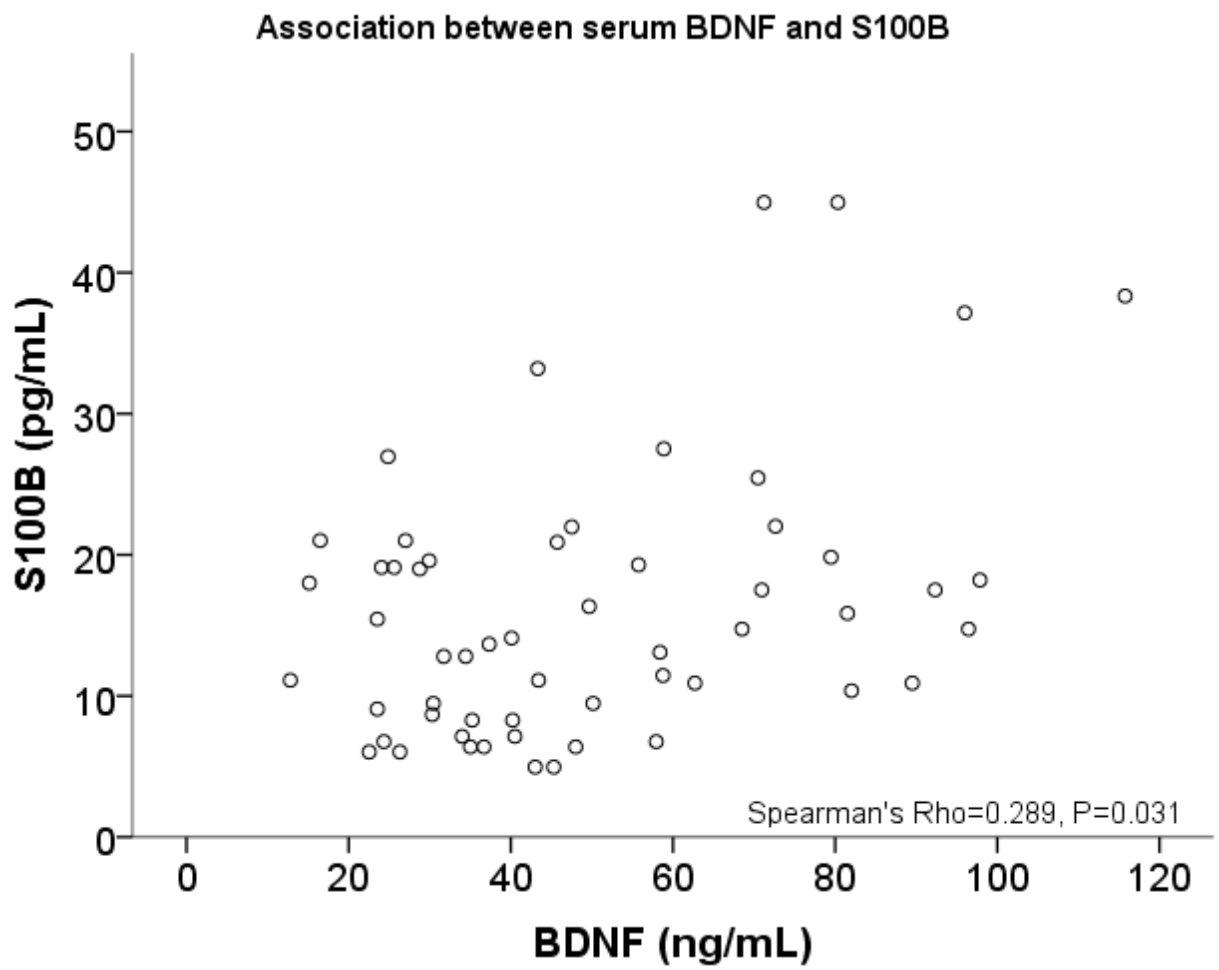
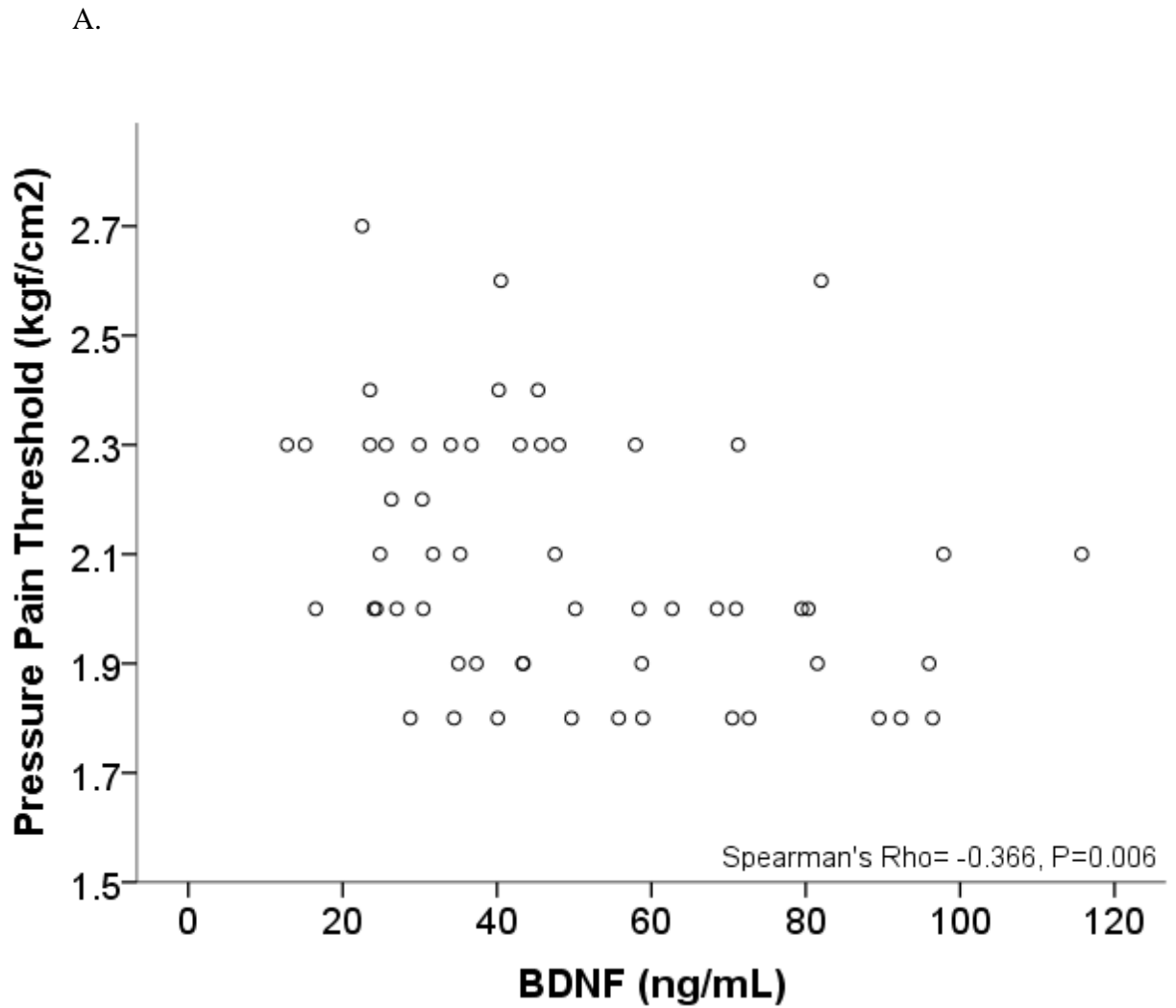
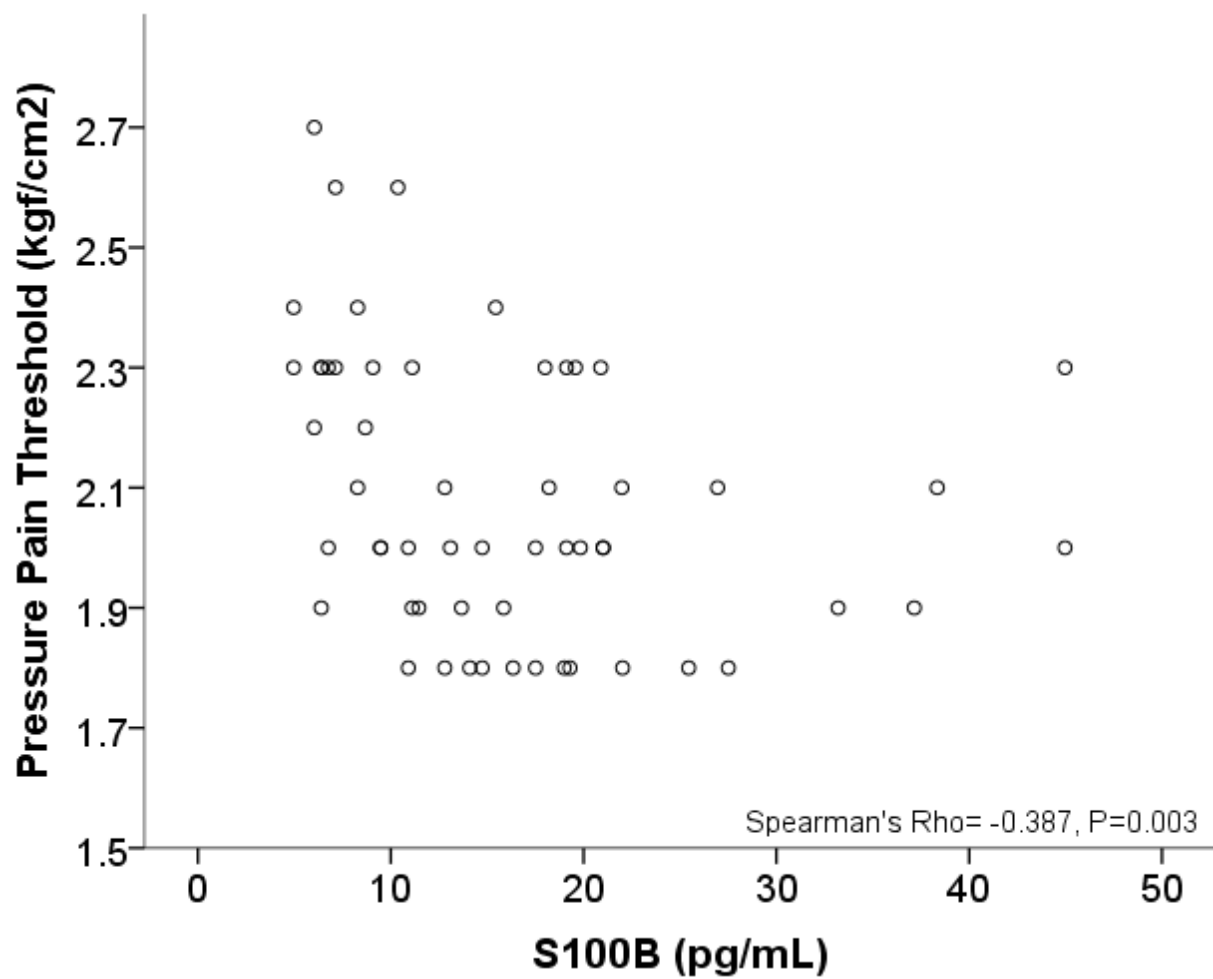


Figure 2. Scatter plot of the correlation between the pressure-pain threshold and serum BDNF (A) and serum S100B (B).



B.



8 ARTIGO 2 ORIGINAL EM INGLÊS

Melatonin analgesia is associated with improve of descendent endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: A phase II, randomized, double-dummy, controlled trial

Simone de Azevedo Zanette, Rafael Vercelino, Gabriela Laste, Joanna Ripoll Rozisky, André Schwertner, Caroline Buzzatti Machado, Fernando Xavier, Iraci Lucena da Silva Torres, Wolnei Caumo

Short tile: Melatonin analgesia is associated with improves of descendent endogenous pain-modulating

Authors and Affiliations

¹*Pain and Palliative Care Service at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and ²Associate Professor, Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brazil;*
³*Post Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ⁴Laboratory of Pain & Neuromodulation at HCPA/UFRGS;*

E-mail address of each author; institution at the time the work; his/her role in the manuscript

SAZ, GL, JRR, RV participated in the sequence alignment and drafted the manuscript.

SAZ participated in the sequence alignment.

SAZ, ILST, WC participated in the design of the study and performed the statistical

analysis.

WC conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript.

All authors approved the final manuscript.

Corresponding Author:

Name: Wolnei Caumo MD, PhD

Department: Laboratory of Pain & Neuromodulation

Institution: Hospital de Clínicas de Porto Alegre at UFRGS

Mailing address: Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003 Bairro Rio Branco -
Porto Alegre – RS. Phone: (55) 51- 3359.8083; Fax: (55) 51- 3359.8083

Email: caumo@cpovo.net

ABSTRACT (250 WORDS)

A mechanism involved in the pathophysiology of fibromyalgia is the central disinhibiting. Melatonin might improve sleep quality, the pain and the pain threshold. We hypothesized that the treatment with melatonin alone or in combination with amitriptyline would be better than at amitriptyline to modify the endogenous pain-modulating system (PMS) quantified by conditioned pain modulation (CPM), and that this change in CPM could be associated with the serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF). We also tested whether melatonin would improve the clinical symptoms as pain, pain threshold and sleep quality. Sixty two females, aged 18 to 65, were randomized to receive in bedtime amitriptyline (25mg) (n=21), melatonin (10mg) (n=21) or melatonin (10 mg)+amitriptyline (25mg) (n=20) for a period of six weeks. The descending PMS was assessed by the CPM-TASK. Melatonin increased the inhibitory PMS according assessed by the reduction on Numerical Pain Scale $NPS_{(0-10)}$ during CPM-TASK.: melatonin+amitriptyline [heat pain threshold (HPT0) 6.89 (1.92) vs. 4.49 (2.17) HPT1]; melatonin [HPT0 7.52 (1.39) vs. 4.87 (1.97) HPT1] and amitriptyline [HPT0 6.07 (1.95) vs. 5.03 (2.17) HPT1 ($P<0.05$)]. The CPM was negatively correlated with serum BDNF, also the groups melatonin treated was better than amitriptyline alone to improved pain on VAS, score on FIQ and PPT. Whereas its association with amitriptyline produced only marginal additional clinical effect. Melatonin increased the inhibitory endogenous pain-modulating system according assessed by the reduction on $NPS_{(0-10)}$ during CPM-TASK. Also, it highlight that the serum BDNF, a neuromodulator of central sensitization was inversely correlated with the pain reduction in CPM-TASK.

Key words: melatonin; amitriptylin; CPM; BDNF; clinical trial.

INTRODUCTION

Fibromyalgia (FM) is a syndrome characterized by chronic pain widespread musculoskeletal pain, hyperalgesia, allodynia, stiffness of the body, fatigue, sleep disorders, circadian rhythm disturbances, anxiety, depression and is common high level of catastrophizing related to pain [1, 2]. Given that previous study showed that patients with fibromyalgia have low melatonin secretion, which could explain the lack of restorative sleep [3], which is a predisposing factor in trigger point formation, [4] and to dysfunction the pain modulation mechanisms [3]. Melatonin properties should block the cycle of impaired sleep at night, fatigue during the day [5-7], and to induces circadian rhythm synchronization [8]. In addition, in mouse it presented antidepressant effect [9] and anxiolytic properties in human [10].

The melatonin's effect on pain has been demonstrated in animals, in inflammatory [8] and neuropathic pain [11-13], as well in acute [10, 14] and chronic pain in humans [15, 16]. Also, there are some clinical evidences about melatonin's effect on FM [5, 6]. However, the results are not consistent between studies, a possibly reason is that the dose used is low, which range to 3-5 mg. Regarding the melatonin doses in pain, a recent randomized clinical trial (RCT) showed that 10 mg bedtime produced a large size effect in chronic pelvic pain [16]. Additionally, the melatonin reduced the level of serum BDNF in patients with chronic pelvic pain induced by endometriosis [16].

The pain is a dynamic phenomenon resulting from the activity of both endogenous pain excitatory and inhibitory systems, including inhibitory conditioned pain modulation (ICPM) [17]. The efficacy of inhibitory conditioned pain modulation (ICPM) in FM has been related with sleep quality [18]. This relationship is supported in neurobiological grounds, by common neurotransmitters involved in both sleep and ICPM, including noradrenalin (NA), serotonin (5-HT) and dopamine (DA) [19-22]. Thereby, it is

important to investigate therapeutic effect of drugs as melatonin with multifaceted mechanisms, which should interfere in peripheral and central pain mechanisms. The rationale to support this hypothesis are evidences that in long term chronic pain, there is a loss of inhibitory system, as demonstrated in FM by the pain threshold and the conditional pain modulation (CPM) [23]. Accordingly, in recent study we demonstrated that long term musculoskeletal pain concurs with excessive cortical facilitation (lack inhibition), which is associated with lower pain threshold and higher catastrophizing thinking related to pain [24]. Additionally, numerous pre-clinical studies have shown that the ICPM depends on the recruitment of endogenous opioids in the periaqueductal gray, which trigger the release of 5-HT from neurons localized in the raphe nuclei (medulla), which dampens nociceptive afferents at the dorsal horn of the spinal cord [25]. Noradrenergic projections from the locus coeruleus produce similar effects [25]. Together, these evidences justify to assess the melatonin effect in the descendent modulatory pain systems, alone or combined with classic therapeutic agents as amitriptyline, since has been demonstrated that the melatonin increased the pain threshold in healthy subjects [26], it improved sleep quality [15] and it modulates systems involved in pain, such as gabaergic and opioid [12, 27].

Taking all these into account, we hypothesized that the treatment with melatonin alone or in combination with amitriptyline would be better than at amitriptyline alone to modify the endogenous pain-modulating system quantified by conditioned pain modulation (CPM)-TASK, as well the BDNF serum levels in FM. We also tested whether melatonin would improve the clinical symptoms as pain, pain threshold (PPT) and sleep quality related to fibromyalgia.

2. METHODS

The methods and results sections are reported according to the CONSORT guidelines (Schulz et al., 2010). The **figure 1** shows the flow chart of the study. The protocol is registered at clinical trials.gov upon number NCT02041455.

2.1 Design overview, setting, and participants

All patients provided written informed consent before participating in this randomized, double-blind, double-dummy, three-group parallel, clinical trial, which was approved by the Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Institutional Review Board IRB 0000921) in accordance with the Declaration of Helsinki (Resolution 196/96 of the National Health Council). We included 60 adult patients aged higher 18 years old from the pain and physiatrists clinical outpatient of the HCPA and by newspaper publicity. Patients with FM were enrolled according to American College of Rheumatology criteria [28]. To be eligible, patients had to be refractory to treatment that they were taken. Patients were required to have a score of at least 50 mm on the 0-100 mm visual analogue scale (VAS, which 0 means “no pain” and 100 means “worst possible pain” [29] during the baseline week preceding randomization and to have completed at least four pain diaries out of seven. Patients were allowed to remain on analgesic medications, including drugs that they were refractory, which could not be adjusted during the study. At screening, all patients underwent physical examination by a pain specialist, and a psychiatric interview with a psychiatrist. Patients could enroll with or without a history of major depressive disorder, however it could not be the main reason for their functional impairment or study enrollment. Rather subjects were recruited solely for fibromyalgia pain. Patients were excluded if evidence was found of inflammatory rheumatic disease, auto immune disease or other painful disorders that might confound the assessment of fibromyalgia

pain or a history of substance abuse. Patient pregnant, in breast-feeding, with history of neurologic or oncologic disease, ischemic heart disease, kidney or hepatic insufficiency did also excluded.

2.2. Sample size justification

The number of patients in each study group was determined by previous clinical trials [30]. An *a priori* estimate indicated that a total sample size of 57 patients divided into three balanced treatment groups (n=19) was needed to detect a 1.4 cm reduction (average standard deviation 1.2 cm) in pain intensity associated with melatonin or placebo at power and α levels of 0.8 and 0.01, respectively [31, 32]; such a reduction would be clinically relevant and comparable to other pharmacological interventions. To account for multiple outcomes and attrition, we increased the sample size to 20 patients per group. For these calculations, we assumed that this remission was clinically relevant.

2.3. Randomization and masking

The participants were randomized into of the three groups: amitriptyline (+ placebo); melatonin (+ placebo), and amitriptyline + melatonin. Before the recruitment phase, envelopes containing the protocol materials were prepared. Each envelope was sealed and numbered sequentially and contained an allocated treatment. After the participant consent to participate in the trial, the envelope in the sequence was opened by the nurse who administered the medications. During the entire protocol timeline, two investigators who were not involved in patient evaluations were responsible for the blinding and randomization procedures. Other individuals who were involved in patient

care were unaware of the treatment group to which the patients belonged.

2.4. Interventions

Over a six-week period (42 days) the following oral medications were taken at bedtime by the three groups: melatonin (10 mg) tablets + placebo (Sigma Chemical, Germany, provided batch-by-batch certificates of analysis authenticating the purity of each batch), amitriptyline (25 mg) + placebo or amitriptyline (25 mg) + melatonin (10 mg) with identical characteristics. The capsules were manufactured in such a way that the placebo and active treatment had the same size, color, smell and flavor. To measure adherence to medication use, we employed the following strategies: *i*) a researcher counted the number of tablets consumed weekly during the study period; *ii*) the patients were asked to record a diary entry if they failed to use the medication; and *iii*) eligible patients were strongly encouraged to remain on the medication throughout the six weeks, during which time they visit to the clinical center in third week after begin the treatment. Regardless of their decision to continue or discontinue medication at this stage, the patients continued to be assessed during the study period.

2.5. Supplementary analgesic use

All of the patients were permitted to use supplementary analgesic medication (acetaminophen, ibuprofen, codeine or tramadol) to relieve their pain if necessary. Patients were allowed to take 750 mg of acetaminophen up to four times per day (QID) and 200 mg of ibuprofen at maximum QID as a rescue analgesic. If their pain persisted, patients could use Dorflex[®] (Sanofi Aventis, São Paulo, Brazil; 35 mg orfenadrine citrate combined with 300 mg dypirone and 50 mg caffeine). If their pain persisted, patients were permitted to use 60 mg of codeine up to QID or tramadol three times per

day (TID). These medications could be used at a maximum of four times a day. The patients were asked to record their analgesic intake during the treatment period in their diaries, and these diaries were reviewed in the end of treatment section. The total analgesic dose taken during treatment was considered for the analysis.

2.6. Instruments and assessments

All of the psychological tests used in this study had been validated for the Brazilian population [33, 34]. Two independent medical examiners that were blind to the group assignments were trained to administer the pain scales and to conduct the psychological tests. The baseline depressive symptoms of the patients were assessed using the Hamilton Depression Scale [34], and sleep quality was assessed using the Pittsburgh Sleep Quality Index [35]. Psychiatric disorders were evaluated with the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) [36]. To assess catastrophic thinking due to chronic pain, we used the B-PCS [37]. Demographic data and medical comorbidities were assessed using a standardized questionnaire; patients were asked about any changes that occurred during treatment, such as changes in mood, sleepiness, dizziness, headaches or allergic reactions.

2.7. Outcomes

The primary outcome, pain score diaries on VAS [global pain in the last 24 hours] obtained during the last week of treatment and pain reduction on numerical Pain Scale [(NPS)₀₋₁₀] during CPM-TASK. Secondary outcomes were the amount of analgesics used in the last week of treatment, the score on Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), PPT, sleep quality and serum BDNF. The outcomes are described below.

2.7.1. Assessment of pain and sleep quality

a) Pain intensity was measured by a 100-mmVAS. The VAS scores ranged from no pain (zero) to worst possible pain (100 mm). The time of the worst pain during the last 24 h was recorded daily in the patients' diaries obtained in baseline during seven days before begin the treatment and the last week of treatment period. They were asked to answer the following questions using the pain VAS: *i*) considering your pain - how intense was your worst pain during the last 24 hours?

a) Diary entries recording analgesic intake (acetaminophen, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or opioids). The total analgesic dose taken during treatment was considered for analysis.

b) The quality of life of the patients in this study was evaluated using the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ), a disease-specific questionnaire initially proposed by Burckhardt et al. [38] for the evaluation of quality of life in patients with fibromyalgia. It was validated for use in the Brazilian population by Marques et al. [39]. This questionnaire is composed of 10 domains, the first consisting of 10 sub-items or questions and the other nine of only one question each. The first domain contains questions concerning the capacity of the patient to perform certain routine activities. Responses range from 0, always able to perform the activity, to 3, never able to perform the activity. Item two refers to the number of days during which the patient felt well in the previous week and item three to the number of days on which the patient was unable to go to work because of the disease. Possible answers range from 0 to 7 for each item or domain. For domains 4-10, scores range from 0 to 10 in each. These final seven items are designed to collect data on the patient's capacity to work and their perceptions of pain, fatigue, morning stiffness, mood, anxiety and depression. The data from the FIQ are arranged so that no more than 10 points can be scored for any single item. Items 2 and 3 are considered inversely proportional; therefore, the maximum

possible score in this questionnaire will generally be 100.

c) Sleep quality during the study period was assessed using the Pittsburgh Sleep Quality Index sleep quality was assessed using the Pittsburgh Sleep Quality Index [35].

Assessment of PPT and conditioned pain modulation

d) Pressure Pain thresholds (PPT alone): Prior to the test trial, the patient learned to differentiate the perception of pressure versus the perception of the onset of pain. The patient was instructed to verbally report the perception of pain onset. The investigator who assessed pain threshold levels was trained, blinded to the intervention and unable to view the display of pressure intensities. An experienced rehabilitation physician (SAZ) systematically evaluated superficial and deep hyperalgesia by assessing PPT using an algometer [40]. The device had a 1-cm² hard-rubber probe, which was applied over eleven predefined different areas to be examined to define the diagnosis of FM according to American College of Rheumatology criteria [28]. We determined the individual's PPT using the area that was present the lower PPT. The average values of PPT in kgf/ cm² (lb/cm²) for three successive readings taken at intervals of 3-5 min were used as the outcomes).

e) To test CPM (the term CPM rather than diffuse noxious inhibitory control/DNIC is chosen based on the recent recommendations of Yarnitsky et al. [17]), we used the protocol of Tousignant-Laflamme (2008) and consulted the guidelines for the cold-heat task (CPM-TASK) as an experimental pain stimulus [41]. The CPM-TASK activates the diffuse noxious inhibitory control-like effect (CPM), as it is a strong nociceptive stimuli that takes place over a lengthy span of time [42] and is applied over a large body surface area [43]. Thus, the CPM-TASK allows us to modify the endogenous pain-modulating system. To quantify CPM, we evaluated the pain

intensity of three heat pain (HPT) test stimuli separated by a CPM-TASK. Even if the HPT may lead to both habituation and sensitization according to the dual process theory, the cold water zero to is a reliable stimulus to induce CPM [44].

f) CPM-Task: The cold-heat task was used as a conditioning stimulus to elicit a strong and prolonged pain sensation to trigger CPM. The CPM-TASK consisted of immersing the non-dominant hand cold water (zero to 1°C) for 1 minute. During the last 30 seconds of cold-water immersion, the HPT procedure was administered over the right forearm (dominant forearm). The temperature was held constant during the experiment for each subject. The mean temperature eliciting pain ratings of 0/10 on the Numerical Rating Pain Scale [(NRS)₀₋₁₀] (HPT) was used for the HPT. After a short break, the first HPT (Pain baseline, HPT0) was applied at the extensor carpi radialis longus muscle (forearm) of the dominant forearm. Following the first HPT (HPT0), the CPM-TASK was used to trigger CPM. One minute after the CPM-TASK, we applied the second HPT (HPT1). We quantified the amount of CPM by subtracting the mean pain rating of the second HPT after the CPM-TASK (HPT1) from the first HPT before the CPM-TASK (HPT0) [45].

g) Laboratory outcome included serum levels of BDNF. Samples of blood were collected at two time points: at baseline and at the end of treatment. The blood samples were centrifuged in plastic tubes for 10 min at $4500 \times g$ at 4°C, and serum was stored at -80°C for assay. Serum BDNF was determined by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using a ChemiKine BDNF Sandwich ELISA Kit, CYT306 (Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA). The lower detection limit of the kit is 7.8 pg/mL of BDNF.

Statistical Analysis

The differences between the groups on baseline were examined by analysis of variance (ANOVA) for parametric variables with normal distribution or Kruskal Wallis, and categorical variables were examined by chi-square or Fisher's exact tests given that our main independent outcome (intervention) was also categorical.

The results were evaluated using the absolute mean variation on pain measurements, sleep quality and BDNF on delta values (post-treatment minus pre-treatment). Given the several outcomes of pain measurements (VAS, FIQ, PPT, number of tender points and PPT) did not present normal distribution. Linear mixed models were used to compare outcomes within subjects and between subjects in which the independent variables was the treatment (amitriptyline, melatonin and melatonin+amitriptyline) with Bonferroni's Multiple Comparison Test. We performed post hoc analysis using paired t tests to assess the effects of each treatment group. The reduction on NPS₍₀₋₁₀₎ induced by CPM-TASK was adjusted for the baseline HPT and serum BDNF.

To identify possible predictors associated with the change on NPS₍₀₋₁₀₎ during CPM-TASK we fitted a multiple linear regression model, with the stepwise enter method. The variables include in the model were: the B-PCS score, HPT₀, FIQ-score obtained before treatment. Also, it was included the number of analgesic used in the last week of treatment. Finally, in an exploratory analysis to understand a reverse effect of interaction of HPT₀ and BDNF [each alone isolated presented a negative correlation with NPS₍₀₋₁₀₎ during CPM-TASK] that becomes positive it was used the Spearman correlation coefficient (r_s). Within-group the standardized mean difference (SMD) was computed in terms of the ratio between the mean change and the pool of baseline standard deviation (SD). The SMD was interpreted as follows: small, 0.20 to 0.4; moderate, 0.50–0.70 and large, 0.80 or higher, with respective confidence interval (CI) [29 KAZIS 1989]. All of the analyses were performed in assuming intention-to-treat,

hence including all of the randomized subjects for whom there were observations in the study outcomes. The analyses were performed with SPSS version 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

3.1. Patient characteristics

The clinical and demographic characteristics of the patients are shown in **Table 1**. Twenty one patients were allocated to the amitriptyline group; twenty one were allocated to the melatonin group, and twenty for the melatonin+amitriptyline group. Fifteen patients completed the study; three patients in the melatonin+amitriptyline and two in both amitriptyline and melatonin group withdrew due to treatment side effects. Baseline characteristics are presented in (**Table 1**). The randomization produced a balance groups in the most part of characteristics, whereas, it was observed an imbalance between groups in pain on VAS, FIQ and PPT (**Table 1**). Regarding the side effects in amitriptyline group 38.09% (8/21) patients presented minor side effects (MSE) (nausea, mild dizziness, weight gain, dry mouth, and mild headache) and 23.8% (5/21) major side effects (MJSE) (severe dizziness, vivid nightmares, crippling drowsiness, severe headache, behavioral changes, and pain worsening), with three withdraw. In the melatonin group, 23.8% (5/21) presented MSE and 23.8% (5/21) MJSE, with two withdraw. While the association melatonin+amitriptyline produced 15% (3/20) MSE, whereas 25% (5/20) presented MJSE with two withdraw.

3.2. Analysis of the treatment effect on the main outcomes: descendent modulatory system and pain on VAS

Patients receiving melatonin alone or in combination with amitriptyline had significant lower pain on VAS than those receiving amitriptyline alone ($P < 0.01$) (**Figure 2**). A mixed model analysis showed that the increase of one supplementary analgesic dose was associated with 5.1% increase in the adjusted VAS pain change from baseline ($t = 5.87$), $P = 0.0001$.

The change within the group was statistically significant in all treatment groups ($P < 0.0001$, for all comparisons). The cumulative mean (SD) on VAS one week pretreatment vs. the pain scores in the last week of treatment in amitriptyline group was [62.87 (14.26) vs. 50.02 (25.60)], whereas in melatonin was [64.90 (15.43) vs. 47.53 (21.96)] and melatonin+amitriptyline [69.57 (9.09) vs. 48.64 (15.38)], respectively. The effect size assessed by SDM [confidence interval (CI) 95%] within group in amitriptyline group was 0.99 (CI 95%, 0.68-1.30), while in melatonin 1.29 (CI 95%, 0.98-1.58) and melatonin + amitriptyline 1.47 (CI 95% 1.14-1.79), respectively.

The descendent modulators system function was assessed by the CPM-TASK. It was observed that in overall treatment group there was a reduction on pain scores during the CPM-TASK: melatonin+amitriptyline [HPT0 6.89 (1.92) vs. 4.49 (2.17) HPT1]; melatonin [PPT0 7.52 (1.39) vs. 4.87 (1.97) HPT1] and amitriptyline [HPT0 6.07 (1.95) vs. 5.03 (2.17) HPT1]. The effect of treatment on CPM is presented in **Figure 3**. The CPM-TASK induced a pain reduction in melatonin and melatonin+amitriptyline statistically higher than the amitriptyline. However, it was observed that there were patients in all treatment groups that increased the pain intensity (conditioned pain modulation) between HPT0 pain measures (test stimulus) and HPT1 after the cold-pressor task (CPM-TASK, conditioning stimulus). The incidence this summation effect was 15.8% in melatonin, 36.8% in melatonin+amitriptyline and 42% in amitriptyline-

treated. These results are showing that the descendant modulatory system loss its inhibitory function and the heterotopy stimulus induced a summation effect.

-----Insert **figure 3** -----

To understand this result we run an exploratory analysis to identify possible factors associated with this summation effect on pain score during the CPM-TASK. To identify possible predictors it was run a multiple linear regression model, with the stepwise enter method. The variables include in the model were: the B-PCS score, HPT0, FIQ-score obtained before treatment. Also, it was included the number of analgesic used in the last week of treatment. Accordingly, the HPT was only variable retained in the model, that is, that was associated with pain changes on NPS (0 – 10) during CPM-TASK [(r-square= -0.21), standard β coefficient for the HPT= -5.99, $P<0.05$].

Thus, it was run a mixed model to assess the effect of treatments groups and its relationship with the serum BDNF adjusting by the HPT. It was observed that the HPT and serum BDNF were inversely correlated with the change on NPS₍₀₋₁₀₎ during the CPM-TASK (**table 3**). However, when was analyzed the interaction between HPT and BDNF, this effect changed the direction, (it becomes positively associated with the change on NPS₍₀₋₁₀₎ during the CPM-TASK) (**table 3**). To understand this result we run a simple correlation between serum BDNF and HPT, and the Spearman coefficient (r_s) was -0.35 ($P=0.02$). That is, when the HPT0 is low (higher the pain) the serum level of BDNF is high, or vice versa. Hence, it is plausible to suppose that the effect this interaction (HPT*serum BDNF) on pain score during the CPM-TASK, that was negatively correlated when they were included in the model as isolate factor; it becomes in a factor correlated positively with the change reduction during CPM-TASK (**Table 3**).

3.3. Analysis of the efficacy on secondary outcomes: the Delta of pain scores on FIQ score, PPT, tender points, analgesic use, sleep quality and BDNF

Between-group changes in pain, pain threshold, analgesic consumption and sleep quality are shown in **Table 3**. The post hoc analysis indicated significant differences between the amitriptyline+ melatonin and the melatonin from those that had received amitriptyline in the FIQ score and in the PPT. It was not observed difference statistically significant between groups in the number of analgesic used in the last week of treatment, sleep quality and number of tender points. We observed a large effect size within group considering the change pre to post treatment in pain measures, number of tender points and sleep quality **Table 3**.

-----Insert table 3-----

Although we not observed statistically significant difference between treatment groups in the serum BDNF on baseline, it is possible to see a large variability in the serum level this neurotrophin (**Table 1**) From the baseline the mean of serum BDNF decreased 22.57% in the amitriptyline group, whereas the melatonin in the melatonin plus amitriptyline group presented a mean reduction of 36.6 and 34.49% group, respectively (**Figure 3**). The effect size within group as assessed by SDM in amitriptyline group was 0.43 (CI 95%, 0.05-0.83), while in melatonin was 0.8 (CI 95%, 0.4-1.2) and melatonin+amitriptyline 0.67 (CI 95%, 0.24-1.09), respectively.

DISCUSSION

The most clinical relevant finding this study was the melatonin's effect to improve the function of inhibitory endogenous pain-modulating system according assessed by the reduction on NPS₍₀₋₁₀₎ during CPM-TASK. Also, it highlight that the HPT and serum

BDNF on baseline were inversely correlated with the magnitude of treatment effect on descend modulatory system as assessed by CPM-TASK. Furthermore, these findings showed that in general all treatments improved the FM symptoms (pain, sleep quality), however, the clinical effect was better when they used melatonin alone or associated with amitriptyline.

These finding suggests that the melatonin treatment have a direct effect on pain pathways or on the levels of signaling chemicals that regulate pain. Melatonin induced a reduction higher than 35% on $NPS_{(0-10)}$ during CPM-TASK, and as can be observed by the lower limit of confidence interval regarding pain score on VAS presented as SDM [1.29 (CI 95%, 0.98-1.58)], its effect was larger than amitriptyline alone [0.99 (CI 95%, 0.68-1.30)]. The melatonin effect on CPM is biologically plausible and it is supported by evidences of experimental studies about its effect on GABA-ergic [46], opioid and glutamatergic systems [47]. Additionally, this hypothesis is supported by other studies that well-characterized anatomical network that enables us to regulate nociceptive processing (largely within the dorsal horn) in various circumstances to produce either facilitation (pronociception) or inhibition (antinociception) [48]. Thereby, it also may reduce the descending pathways that facilitate pain transmission, which is thought to be circuits with a sustained activation that is underlie of chronic pain, such as a FM [49, 50]. In overall, these findings suggest that the melatonin increased the inhibitory descending pain system effect, which involve anatomical connections between cortical and brainstem regions in the human brain, as demonstrated by tractography [51].

The inverse correlation between CPM-TASK, BDNF and HTT0 (**Table 2**) corroborates with the presence of central sensitization theory, that is related with a reduction of the descending inhibitory system [52], and with greater activation in the brainstem [53].

Hence the reduction on BDNF suggests that this neuromediator is involved in the central sensitization [54, 55]. This neurotrophin is also involved in altering the excitatory/inhibitory balance in the central nervous system (CNS), and in the amplification of pain response [56, 57]. Because BDNF levels can serve as a molecular “sensor” of the global levels of neuronal activity, it has been suggested that the induction of BDNF expression in response to increases in the level of neuronal activity may dampen cortical excitability by promoting the development and/or strengthening of inhibitory synapses in local circuits [58, 59]. Together, these multifaceted mechanisms of melatonin on pain, it also accomplished to reduce the serum BDNF, an effect observed in this study that corroborates similar effect described in previous randomized clinical trial in chronic pelvic pain induced by endometriosis [16].

In addition, the melatonin’s effect on BDNF observed in this study may be explained by its anti-inflammatory effect. This hypothesis is supported by the relation between BDNF and pro-inflammatory cytokines that has been demonstrated in FM patients [60-62]. Melatonin has marked anti-inflammatory effects on peripheral sites by inhibiting the release of proinflammatory cytokines [12]. Additional mechanisms involved in the melatonin’s effect on pain pathways include: an important reduction of nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) levels, two compounds that are closely related to inflammation [63], it inhibits the inflammatory response and inducible NO synthase (iNOS) isoform expression [64] as showed in FM patients by Citera et al. (2000). Also, the melatonin’s effect as adjuvant therapy with drugs that increase the serotonin (e.g., SSRIs, tricyclic antidepressant) could be a benefit pharmacological approach for the management of patients with FM [6]. In overall, these findings show that the melatonin may interrupt a response associated with a maladaptive neuroplasticity process

orchestrated by neuronal, endocrinal, and immune mechanisms that can amplify sensory pain signals to the neural pain matrix.

The present study demonstrated that all treatments reduced pain, whereas in melatonin-treated this effect was better than amitriptyline. The melatonin's effect on pain was demonstrated in VAS, FIQ and PPT. These findings corroborate evidences of experimental studies [8], and previous randomized clinical trials in acute pain [10, 14], and chronic pain such as fibromyalgia [5, 6], temporomandibular disorders [15], endometriosis and a dose response study with healthy subjects [26]. Possibly melatonin play a role in the modulation of nociceptive transmission at peripheral and central pain pathways [65]. The highly lipid-soluble nature of melatonin allows it to easily penetrate the blood-brain barrier. The antinociceptive effect of melatonin is known to involve the activation of supraspinal sites and the inhibition of "spinal windup" [66]. Evidences of experimental studies suggest that the analgesic effects of melatonin are mediated by opioids [55] and by gamma-aminobutyric acid ([GABA]ergic) systems [67] but it is not possible to dissociate the effect of each individual neurobiological system in human experimental and clinical studies. Indeed, only the net effect can be assessed. Studies have also suggested that additional pathways play a role in the analgesic actions of melatonin, such as nuclear signaling pathways, receptor-independent radical scavenging, and inhibition of the release of proinflammatory cytokines at peripheral sites.

According previous clinical studies the most prevalent complains in patients with FM are sleep disturbance, fatigue, and chronic pain; and these symptoms might be a consequence in melatonin secretion disruption [68]. Moreover, serum levels of melatonin precursors (tryptophan and serotonin) were reported to be low in patients with FMS [32]. This could explain the lack of restorative sleep and to be a mechanism

involved in dysfunctional pain modulation [3], thus, the restoring of melatonin could be an additional mechanism of others yet discussed, to explain the discrepancy of its effect compared to amitriptyline. However, one can realize that in overall the association with amitriptyline induced an increment on the clinically effect only marginal. This finding is contrary of our initial hypothesis that the combined (melatonin+amitriptyline) could provide an effect with higher clinical impact. Also, these results not corroborate previous studies that demonstrated that antidepressant drugs (SSRI) associated with melatonin improved fibromyalgia symptoms [6]. This discrepancy can be explained by factors such as sample characteristics, type of antidepressant, differences related to technique, and time of dosage.

The strengths of this study include the comparison of melatonin and amitriptyline association, in a phase II, randomized, in a double-dummy factorial design, placebo-controlled trial, and the use of multiple efficacy and safety measures based on previous trial experience. Although it is well known the important effects of the SSRIs in FM, the effects of association of melatonin and amitriptyline in this chronic pain condition was not previously studied. We conducted this trial according to CONSORT guidelines, and given that we used the Delphi List (a list of criteria for the quality assessment of randomized controlled trials), our trial can be considered to be of strong quality because all 8 items in this scale can be positively scored in our randomized controlled trial [69]. Also, we used the double-dummy method and shield placement to prevent the patient and team members from follow the patients, to control assessment bias. This finding is important, because it demonstrates that the application of new therapeutics can be assessed by each particular context to determine whether it provides enough benefit over those already available [70]. The factorial design is a proposed method for examining the interactions between treatments by generating an interaction ratio, also

this method permit us estimate whether the "at the margins" analyses may have overestimated or underestimated the efficacy (and adverse effects) of each agent. A potential limitation is the short treatment duration, as it would have been difficult to justify a prolonged treatment period in patients experiencing chronic pain if they had high incidence of severe side effects. Accordingly, the incidence of MJSE in amitriptyline group was 38.09%. This finding is according literature, that the tricyclic antidepressants are effective at alleviating pain and improving sleep quality [71], however, the complaints related to common anticholinergic side effects such as dry mouth, sedation, constipation, orthostasis and weight gain are common [72]. We emphasize that the results of this study are relevant only to the patient population investigated. Although the homogeneity of this study population is methodologically advantageous, the issue of external validity arises. Thus, additional research with a larger number of patients is needed to more widely assess the potential benefits of melatonin in several different clinical settings, and future studies are required before definitive conclusions regarding melatonin and pain treatment can be made. Finally, although several strategies were used to prevent patients and evaluator team from unblinding, formal assessment for awareness of the allocation (either active or placebo) was not performed. However, our objective surrogates less prone to bias (ie, serum BDNF, analgesics requirements, CPM-TASK) were consistent with pain scores, hence, unblinding is unlikely to have influenced the direction of our conclusions.

In conclusion, in this 6-week, randomized, double-dummy, placebo-controlled study, melatonin alone or associated with amitriptyline was better than amitriptyline to improve pain on VAS, score on FIQ and PPT, whereas its association with amitriptyline produced only marginal additional clinical effect. Melatonin increased the inhibitory endogenous pain-modulating system according assessed by the reduction on

NPS₍₀₋₁₀₎ during CPM-TASK. Also, it suggests that peripheral BDNF could be used as a biomarker of central sensitization inversely correlated with the pain reduction in CPM-TASK.

List of abbreviations

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Dopamine (DA)

Fibromyalgia (FM)

Heat pain threshold (HPT)

Noradrenalin (NA)

Pain-modulating system (PMS)

Randomized clinical trial (RCT)

Serotonin (5- HT)

Acknowledgements

This research was supported by grants and material support from the following Brazilian agencies:

Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES - PNPd/CAPES (grants to I.C.C.Souza; Deitos A) and material support;

National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (grants to Dr. I.L.S. Torres, Dr. W. Caumo);

Postgraduate Program in Medical Sciences at the School of Medicine of the Federal University of Rio Grande do Sul (material support);

Postgraduate Research Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (material support);

Foundation for Support of Research at Rio Grande do Sul (FAPERGS) (grant to Schwertner A).

Declaration of conflict of interests:

The authors declare that there are no financial or other relationships that might lead to conflicts of interest to any of the following arrangements: financial relationship to the work; employees of a company; consultants for a company; stockholders of the company; members of a speakers bureau or any other form of financial.

REFERENCES

1. Mease PJ, Clauw DJ, Arnold LM, Goldenberg DL, Witter J, Williams DA, Simon LS, Strand CV, Bramson C, Martin S, et al: **Fibromyalgia syndrome.** *J Rheumatol* 2005, **32**:2270-2277.
2. Arnold LM, Hudson JI, Keck PE, Auchenbach MB, Javaras KN, Hess EV: **Comorbidity of fibromyalgia and psychiatric disorders.** *J Clin Psychiatry* 2006, **67**:1219-1225.
3. Wikner J, Hirsch U, Wetterberg L, Röjdmärk S: **Fibromyalgia--a syndrome associated with decreased nocturnal melatonin secretion.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998, **49**:179-183.
4. Bennett RM: **The rational management of fibromyalgia patients.** *Rheum Dis Clin North Am* 2002, **28**:181-199, v.
5. Citera G, Arias MA, Maldonado-Cocco JA, Lázaro MA, Rosemffet MG, Brusco LI, Scheines EJ, Cardinalli DP: **The effect of melatonin in patients with fibromyalgia: a pilot study.** *Clin Rheumatol* 2000, **19**:9-13.
6. Hussain SA, Al-Khalifa II, Jasim NA, Gorial FI: **Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia.** *J Pineal Res* 2011, **50**:267-271.
7. 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**:82-87.
8. Laste G, Vidor L, de Macedo IC, Rozisky JR, Medeiros L, de Souza A, Meurer L, de Souza IC, Torres IL, Caumo W: **Melatonin treatment entrains the rest-activity circadian rhythm in rats with chronic inflammation.** *Chronobiol Int* 2013, **30**:1077-1088.

9. Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, Elisabetsky E: **Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model.** *Eur J Pharmacol* 2009, **607**:121-125.
10. Caumo W, Levandovski R, Hidalgo MP: **Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study.** *J Pain* 2009, **10**:100-108.
11. Laste G, de Macedo IC, Ripoll Rozisky J, Ribeiro da Silva F, Caumo W, Torres IL: **Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats.** *J Pain Res* 2012, **5**:359-362.
12. Ambriz-Tututi M, Granados-Soto V: **Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors.** *Pain* 2007, **132**:273-280.
13. Esposito E, Cuzzocrea S: **Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system.** *Curr Neuropharmacol* 2010, **8**:228-242.
14. Caumo W, Torres F, Moreira NL, Auzani JA, Monteiro CA, Londero G, Ribeiro DF, Hidalgo MP: **The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy.** *Anesth Analg* 2007, **105**:1263-1271, table of contents.
15. Vidor LP, Torres IL, Custódio de Souza IC, Fregni F, Caumo W: **Analgesic and sedative effects of melatonin in temporomandibular disorders: a double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled study.** *J Pain Symptom Manage* 2013, **46**:422-432.
16. Schwertner A, Conceição Dos Santos CC, Costa GD, Deitos A, de Souza A, de Souza IC, Torres IL, da Cunha Filho JS, Caumo W: **Efficacy of melatonin in the**

treatment of endometriosis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain* 2013, **154**:874-881.

17. 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**:611-615.

18. Paul-Savoie E, Marchand S, Morin M, Bourgault P, Brissette N, Rattanaovong V, Cloutier C, Bissonnette A, Potvin S: **Is the deficit in pain inhibition in fibromyalgia influenced by sleep impairments?** *Open Rheumatol J* 2012, **6**:296-302.

19. Houvenagel E, Forzy G, Leloire O, Gallois P, Hary S, Hautecoeur P, Convain L, Henniaux M, Vincent G, Dhondt JL: **[Cerebrospinal fluid monoamines in primary fibromyalgia].** *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1990, **57**:21-23.

20. Legangneux E, Mora JJ, Spreux-Varoquaux O, Thorin I, Herrou M, Alvado G, Gomeni C: **Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites, plasma-rich platelet serotonin and [3H]imipramine reuptake in the primary fibromyalgia syndrome.** *Rheumatology (Oxford)* 2001, **40**:290-296.

21. Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F: **Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1992, **35**:550-556.

22. Wood PB, Glabus MF, Simpson R, Patterson JC: **Changes in gray matter density in fibromyalgia: correlation with dopamine metabolism.** *J Pain* 2009, **10**:609-618.

23. Potvin S, Larouche A, Normand E, de Souza JB, Gaumond I, Grignon S, Marchand S: **DRD3 Ser9Gly polymorphism is related to thermal pain perception and modulation in chronic widespread pain patients and healthy controls.** *J Pain* 2009, **10**:969-975.

24. Volz MS, Medeiros LF, Tarragô MaG, Vidor LP, Dall'Agnol L, Deitos A, Brietzke A, Rozisky JR, Rispolli B, Torres IL, et al: **The relationship between cortical excitability and pain catastrophizing in myofascial pain.** *J Pain* 2013, **14**:1140-1147.
25. Millan MJ: **Descending control of pain.** *Prog Neurobiol* 2002, **66**:355-474.
26. Stefani L, Muller S, Torres I, Razzolini B, Rozisky J, Fregni F, Markus R, Caumo W: **A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Dose-Response Trial of the Melatonin Effect on the Pain Threshold of Healthy Subjects.** *Plos One* 2013, **8**.
27. Zurowski D, Nowak L, Machowska A, Wordliczek J, Thor PJ: **Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. The role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism.** *J Physiol Pharmacol* 2012, **63**:641-647.
28. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB, Yunus MB: **The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010, **62**:600-610.
29. Scott J, Huskisson EC: **Graphic representation of pain.** *Pain* 1976, **2**:175-184.
30. Ga H, Choi JH, Park CH, Yoon HJ: **Dry needling of trigger points with and without paraspinal needling in myofascial pain syndromes in elderly patients.** *J Altern Complement Med* 2007, **13**:617-624.
31. Dao TT, Lavigne GJ, Feine JS, Tanguay R, Lund JP: **Power and sample size calculations for clinical trials of myofascial pain of jaw muscles.** *J Dent Res* 1991, **70**:118-122.
32. Skre I, Onstad S, Torgersen S, Kringlen E: **High interrater reliability for the**

Structured Clinical Interview for DSM-III-R Axis I (SCID-I). *Acta Psychiatr Scand* 1991, **84**:167-173.

33. Kaipper MB, Chachamovich E, Hidalgo MP, Torres IL, Caumo W: **Evaluation of the structure of Brazilian State-Trait Anxiety Inventory using a Rasch psychometric approach.** *J Psychosom Res* 2010, **68**:223-233.

34. Hamilton M: **A rating scale for depression.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960, **23**:56-62.

35. Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ: **The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research.** *Psychiatry Res* 1989, **28**:193-213.

36. Lobbestael J, Leurgans M, Arntz A: **Inter-rater reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID I) and Axis II Disorders (SCID II).** *Clin Psychol Psychother* 2011, **18**:75-79.

37. Sehn F, Chachamovich E, Vidor LP, Dall-Agnol L, de Souza IC, Torres IL, Fregni F, Caumo W: **Cross-cultural adaptation and validation of the Brazilian Portuguese version of the pain catastrophizing scale.** *Pain Med* 2012, **13**:1425-1435.

38. Burckhardt CS, Clark SR, Bennett RM: **The fibromyalgia impact questionnaire: development and validation.** *J Rheumatol* 1991, **18**:728-733.

39. Marques A, Santos A, Assumpcao A, Matsutani L, Lage L, Pereira C: **Validation of a Brazilian version of the Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ).** *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006, **65**:557-557.

40. Fischer AA: **Pressure algometry over normal muscles. Standard values, validity and reproducibility of pressure threshold.** *Pain* 1987, **30**:115-126.

41. Magerl W, Krumova EK, Baron R, Tölle T, Treede RD, Maier C: **Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a**

- novel method for statistical comparison of group data.** *Pain* 2010, **151**:598-605.
42. Marchand S, Arsenault P: **Spatial summation for pain perception: interaction of inhibitory and excitatory mechanisms.** *Pain* 2002, **95**:201-206.
43. Schestatsky P, Valls-Solé J, Costa J, León L, Veciana M, Chaves ML: **Skin autonomic reactivity to thermoalgesic stimuli.** *Clin Auton Res* 2007, **17**:349-355.
44. Tousignant-Laflamme Y, Pagé S, Goffaux P, Marchand S: **An experimental model to measure excitatory and inhibitory pain mechanisms in humans.** *Brain Res* 2008, **1230**:73-79.
45. Tesarz J, Gerhardt A, Schommer K, Treede RD, Eich W: **Alterations in endogenous pain modulation in endurance athletes: an experimental study using quantitative sensory testing and the cold-pressor task.** *Pain* 2013, **154**:1022-1029.
46. Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter RJ, Rosenberg J, Gögenur I: **Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies.** *J Pineal Res* 2011, **51**:270-277.
47. Mantovani M, Kaster MP, Pertile R, Calixto JB, Rodrigues AL, Santos AR: **Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice.** *J Pineal Res* 2006, **41**:382-389.
48. Basbaum AI, Fields HL: **Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry.** *Annu Rev Neurosci* 1984, **7**:309-338.
49. Gebhart GF: **Descending modulation of pain.** *Neurosci Biobehav Rev* 2004, **27**:729-737.
50. Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF: **Chronic pain and medullary descending facilitation.** *Trends Neurosci* 2002, **25**:319-325.
51. Hadjipavlou G, Dunckley P, Behrens TE, Tracey I: **Determining anatomical connectivities between cortical and brainstem pain processing regions in humans:**

- a diffusion tensor imaging study in healthy controls. *Pain* 2006, **123**:169-178.
52. Schwenkreis P, Janssen F, Rommel O, Pleger B, Völker B, Hosbach I, Dertwinkel R, Maier C, Tegenthoff M: **Bilateral motor cortex disinhibition in complex regional pain syndrome (CRPS) type I of the hand.** *Neurology* 2003, **61**:515-519.
53. Graven-Nielsen T, Wodehouse T, Langford RM, Arendt-Nielsen L, Kidd BL: **Normalization of widespread hyperesthesia and facilitated spatial summation of deep-tissue pain in knee osteoarthritis patients after knee replacement.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**:2907-2916.
54. Delafoy L, Gelot A, Ardid D, Eschalier A, Bertrand C, Doherty AM, Diop L: **Interactive involvement of brain derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and calcitonin gene related peptide in colonic hypersensitivity in the rat.** *Gut* 2006, **55**:940-945.
55. Groth R, Aanonsen L: **Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia.** *Pain* 2002, **100**:171-181.
56. Sommer C, Kress M: **Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia.** *Neuroscience letters* 2004, **361**:184-187.
57. Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DL, Trivedi PM, Dassan P, French J, Shelton DB, McMahon SB, Thompson SW: **Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord.** *J Neurosci* 1999, **19**:5138-5148.
58. Genoud C, Knott GW, Sakata K, Lu B, Welker E: **Altered synapse formation**

in the adult somatosensory cortex of brain-derived neurotrophic factor

heterozygote mice. *J Neurosci* 2004, **24**:2394-2400.

59. Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM, Turrigiano GG: **Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures.** *J Neurosci* 1997, **17**:4527-4535.

60. Ortega E, García JJ, Bote ME, Martín-Cordero L, Escalante Y, Saavedra JM, Northoff H, Giraldo E: **Exercise in fibromyalgia and related inflammatory disorders: known effects and unknown chances.** *Exerc Immunol Rev* 2009, **15**:42-65.

61. Bote ME, García JJ, Hinchado MD, Ortega E: **Inflammatory/stress feedback dysregulation in women with fibromyalgia.** *Neuroimmunomodulation* 2012, **19**:343-351.

62. Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hallegua D, Silverman S, Silver D, Weisman MH: **Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study.** *Rheumatology (Oxford)* 2001, **40**:743-749.

63. Bilici D, Akpınar E, Kiziltunç A: **Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation.** *Pharmacol Res* 2002, **46**:133-139.

64. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabó C: **Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity.** *J Pineal Res* 1997, **23**:106-116.

65. Srinivasan V, Zakaria R, Singh H, Acuna-Castroviejo D: **Melatonin, its agonists in pain modulation: clinical application.** *Archives Italiennes De Biologie* 2012, **150**:274-289.

66. MORGAN P, BARRETT P, HOWELL H, HELLIWELL R: **MELATONIN RECEPTORS - LOCALIZATION, MOLECULAR PHARMACOLOGY AND**

PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE. *Neurochemistry International* 1994, **24**:101-146.

67. Wu FS, Yang YC, Tsai JJ: **Noncompetitive inhibition of the glycine receptor-mediated current by melatonin in cultured neurons.** *Brain Res* 2000, **881**:208-211.

68. Bazzichi L, Rossi A, Giacomelli C, Bombardieri S: **Exploring the abyss of fibromyalgia biomarkers.** *Clin Exp Rheumatol* 2010, **28**:S125-130.

69. Verhagen AP, de Vet HC, de Bie RA, Kessels AG, Boers M, Bouter LM, Knipschild PG: **The Delphi list: a criteria list for quality assessment of randomized clinical trials for conducting systematic reviews developed by Delphi consensus.** *J Clin Epidemiol* 1998, **51**:1235-1241.

70. Cazzola M: **Application of Number Needed to Treat (NNT) as a Measure of Treatment Effect in Respiratory Medicine.** *Treat Respir Med* 2006, **5**:79-84.

71. Plesh O, Curtis D, Levine J, McCall WD: **Amitriptyline treatment of chronic pain in patients with temporomandibular disorders.** *J Oral Rehabil* 2000, **27**:834-841.

72. Bendtsen L, Jensen R: **Amitriptyline reduces myofascial tenderness in patients with chronic tension-type headache.** *Cephalalgia* 2000, **20**:603-610.

Table a 1. Epidemiological and clinical characteristics at baseline, according to the treatment group. Values are given as the mean (SD) or frequency (n=62).

	Amitriptyline (n= 21)	Melatonin (n= 21)	Amitriptyline + melatonin (n= 20)	P value
Age (years)	49.80 ± (8.91)	47.40 ± (7.84)	49.72 ± (7.24)	0.59
Body index	27.65 ± (3.91)	27.18 ± (4.04)	27.58 ± (4.62)	0.60
Education (years)	10.95 ± (5.09)	11.30 ± (3.76)	8.22±(5.6)	0.39
Smoking (n / %)	2 (9,5)	2 (9,5)	1(5)	0.83
Clinical Comorbidity Yes/No	10 (47,6)	9 (42,9)	13 (65)	0.33
Hypertension (n/%)	5 (23,8)	5 (23,8)	8 (40)	
Hypothyroidism (n/%)	3 (14,3)	1 (4,8)	7 (35)	
Asthma (n/%)	1 (4,8)	1 (4,8)	2 (10)	
Other (n/%)	3 (15)	0 (0)	1 (4,8)	
Global pain on visual analogue scale †	62.88 ± (14.26) ^a	64.90 ± (15.44) ^a	69.57 ± (10.94) ^b	0.03
FIQ †	53.78 ± (12.83) ^a	64.87 ± (12.83) ^b	65.15 ± (9.94) ^b	0.005
Pain catastrophizing scale for the Brazilian population (B-PCS) †	25.90 ± (10.38)	32.90 ± (12.28)	25.90 ± (10.38)	0.07
Pittsburgh Sleep Questionnaire	19.31 ± (6.58)	22.67 ± (7.69)	24.28 ± (7.79)	0.16
Hamilton Depression Scale †	17.61 ± (6.37)	21.70 ± (5.88)	17.61 ± (6.33)	0.05
Pain pressure threshold †	2.17 ± (0.21) ^a	1.99 ± (0.16) ^b	2.05 ± (0.24) ^a	0.04
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) €				
Mean (SD)	48.28 ± (24.00)	52.54 ± (23.87)	48.28 ± (27.34)	
Median [interquartile (IQ) 25;75]	45.51 (12.8;101.51)	54.78 (20.66; 97.85)	37.51 (18.75; 92.32)	0.79
Psychiatric disease (SCID-I)	16 (76%)	15 (71 %)	13 (65%)	0.45
Depression	8 (38%)	13 (62%)	11 (55%)	
Anxiety	11(52%)	12 (57%)	5 (25%)	
Analgesic used weekly in last 3 months				
Median (Q ₂₅₋₇₅) €	6 (3; 28)	7 (2;26)	7 (3;29)	0.91
Analgesic use: days/week in last 3 months ¥ (<4 = no, ≥4 = es)	20 (95%)	20(95%)	17 (85%)	0.43
Ace aminophen/Dipirone	19 (90,5%)	16 (76,2%)	15 (75%)	
NSAID	7 (33,3%)	10 (47,6%)	9 (45%)	
Opioid	1 (4,8%)	0	0	
Active use of central nervous system active medication ¥				
Yes/No	14 (66,7%)	16 (76%)	14 (70%)	0.16
Antidepressant (n/%)	14 (66,7%)	15 (71%)	13 (65%)	
Anticonvulsant (n/%)	2 (9,5%)	2 (9,5%)	1 (5 %)	
Benzodiazepine (n/%)	0	5 (23,8%)	2 (10%)	

Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I). € Kruskal-Wallis Test; ¥ Qui-Square or Fisher's test, †A NOVA.

Table a 2. Multivariate linear regression of the interaction between the change on NPS (0-10) during the CPM-TASK by the treatment group considering the BDNF and pain thresholds (n = 62).

Parameters	<i>B</i>	<i>t</i>	<i>P</i>	95% CI
Dependent variable: CPM-TASK				
Intercept	9.0	1.14	0.01	(4.33 to 32.35)
Treatment group				
Melatonin + Amitryptiline	-1.27	-	0.09	(-2.76 to 0.21)
		1.72		
Melatonin Amitryptiline	-1.75 0 ^{b(reference)}	-2.5	0.01	(-3.18 to -0.31)
BDNF (ng/mL)	-0.28	-	0.01	(-0.53 to -0.04)
		2.23		
Heat pain threshold	-8.06	-	0.01	(-14.56 to -1.55)
		2.49		
Interaction				
Serum BDNF (ng/mL) vs. PPT Pain pressure threshold (Kgf/cm ²)	0.12	2.07	0.04	(0.04 to 0.24)

Table a 3. The mean delta score [standard deviation (SD)] (post-treatment values minus pre-treatment values) of pain measures (FIQ, PPT, analgesic consumption, tender points) and sleep quality (n = 62).

2A.Secondary outcomes					
Treatment	Mean (SD)	Mean Difference (SD)	Median of the difference (Quartile 75;25)	P Value †	SDM CI 95%
Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) score					
Amitriptyline (n=21)	41.16 (14.61) vs. 53.78 (12.83)	-12.19 (16.27)	-13.78 (-24.39, -4.95)** ^b	0.04	0.88 (0.43 - 1.33)
Melatonin (n=21)	46.42 (16.18) vs. 64.87 (12.83)	-17.73 (13.0)	-16.30 (-22.29, -12.94)** ^b		1.28 (0.83-1.74)
Amitriptyline + melatonin (n= 20)	40.89(10.94) vs. 65.15 (9.94)	-24.65 (12.14)	-26.41 (-32.59, -14.50)** ^a		1.79 (1.29-2.28)
b. Mean pressure pain threshold (PPT) in (kg/cm2/second)					
Amitriptyline (n=21)	2.34 (0.45) vs. 2.05 (0.24)	0.29 (0.31)	0.2 (0.1, 0.5)** ^b	0.03	0.69 (0.34-1.04)
Melatonin (n=21)	2.47 (0.33) vs. 1.99 (0.16)	0.47 (0.34)	0.4 (0.23, 0.55)** ^b		1.13 (0.79-1.47)
Amitriptyline + melatonin (n= 20)	2.70 (0.23) vs. 2.17(0.21)	0.54 (0.60)	0.6 (0.5, 0.7)** ^a		1.27 (0.9-1.64)
Analgesic doses (mean during the last week of treatment) †					
Amitriptyline (n=21)	1.35 (1.2) vs. 2.07 (1.37)	-0.72 (1.40)	-0.22 (-0.82, 0.54) *	0.98	1.03 (0.33-1.67)
Melatonin (n=21)	1.33 (1.29) vs. 2.16 (1.20)	-0.79 (1.52)	-0.14 (-1, 0.57) *		1.09 (0.51-1.66)
Amitriptyline + melatonin (n= 20)	1.04 (0.92) vs. 2.10 (1.03)	-1.1 (1.14)	-0.35 (-0.74, 0.47) *		1.33 (0.77-1.89)
Number of tender points					
Amitriptyline (n=)	10.62 (3.36) vs. 14.10 (2.27)	-3.45 (0.84)	- 4 (-5 , 1.25)**	0.89	1.99 (1.35-2.63)
Melatonin (n=)	10.95 (2.94) vs. 14.71 (1.70)	- 3.75 (2.46)	- 4 (-6.5, -2.25)**		2.17 (1.53-2.80)
Amitriptyline + melatonin (n=)	10.29 (3.15) vs. 14.61 (2.32)	- 4.18 (1.91)	- 4 (-5, -3)**		2.41 (1.72-3.10)
Pittsburgh Sleep Questionnaire					
Amitriptyline (n=21)	11.84 (5.82) vs. 19.31 (6.58)	-7.47 (7.34)	-7 (-11 , -4)*	0.94	1.07 (0.51-1.63)
Melatonin (n=21)	16.68 (8.38) vs. 22.67 (7.69)	-6.42 (6.53)	-5 (-11, -2)*		0.9 (0.38-1.44)
Amitriptyline + melatonin (n= 20)	16.11 (8.40) vs. 24.28 (7.79)	-7.58 (1.91)	-8 (-12, -1.5)*		1.06 (0.52-1.59)

* $P < 0.01$, ** $P < 0.0001$ Comparisons using Mixed ANOVA model.

† Mixed ANOVA model. Mean difference group. Different superscripts (a, b, and c) indicate significant differences among treatment groups according to the Bonferroni test.

Standardized mean difference (SMD) [(pre minus post)/pool baseline standard deviation] with confidence interval (CI) 95%. The size effect was interpreted as follows: small, 0.20 to 0.40; moderate, 0.50–0.70 and large, 0.80 or higher.

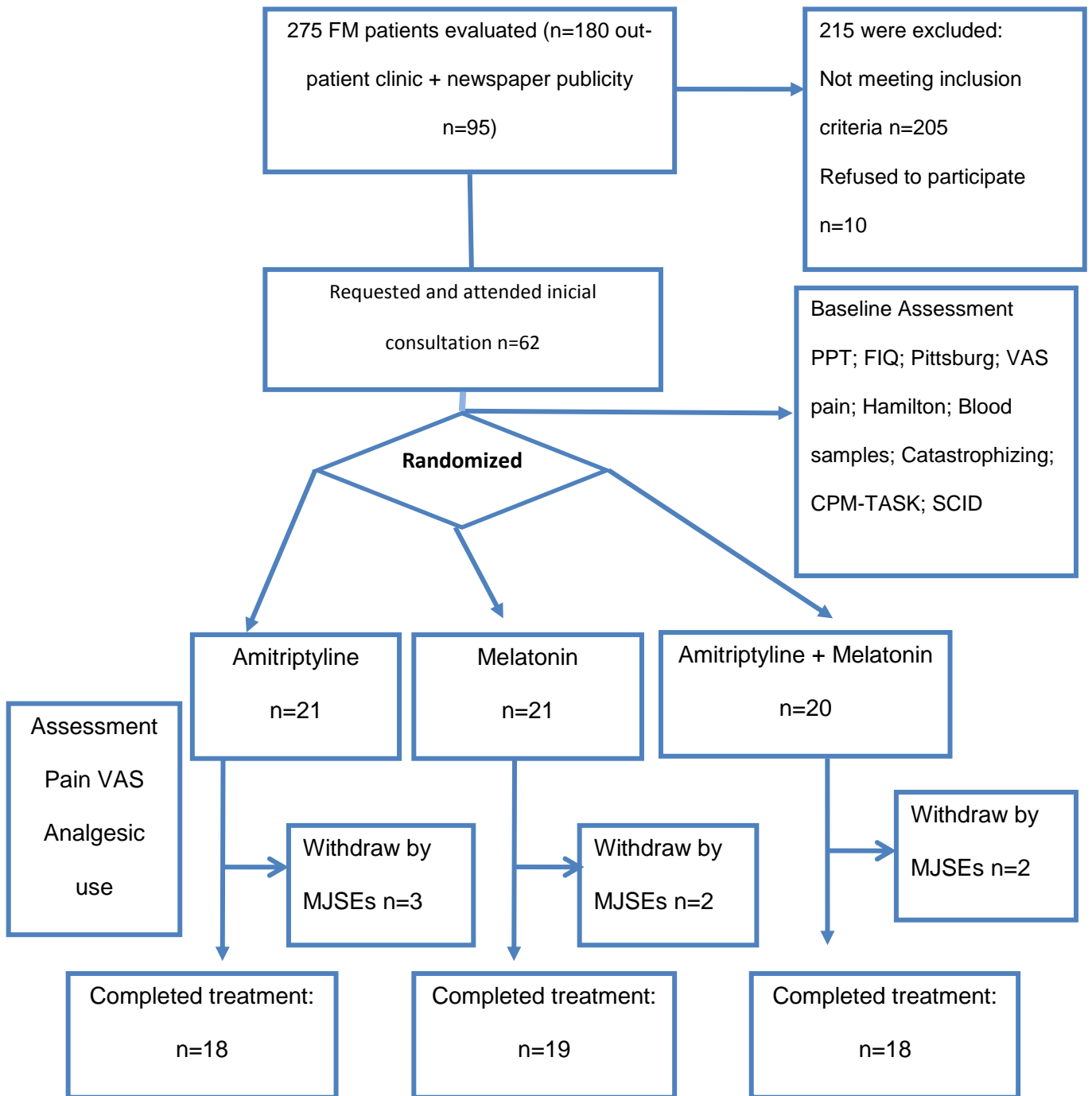


Figure a 1. Flow chart.

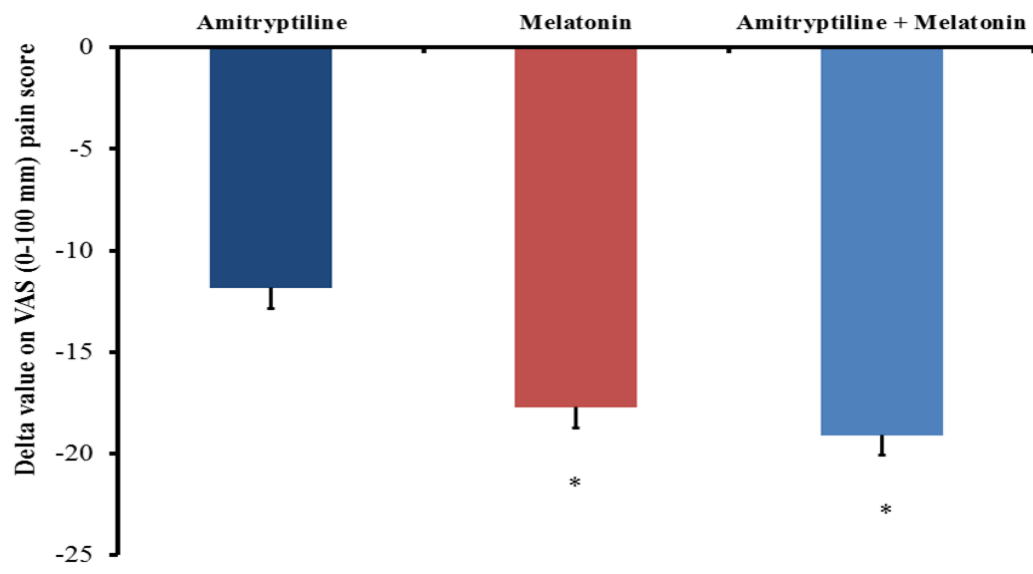


Figure a 2

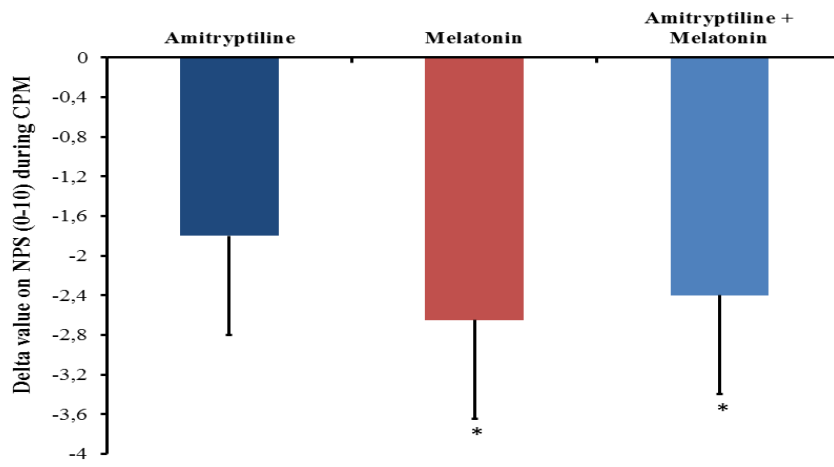


Figure a 3

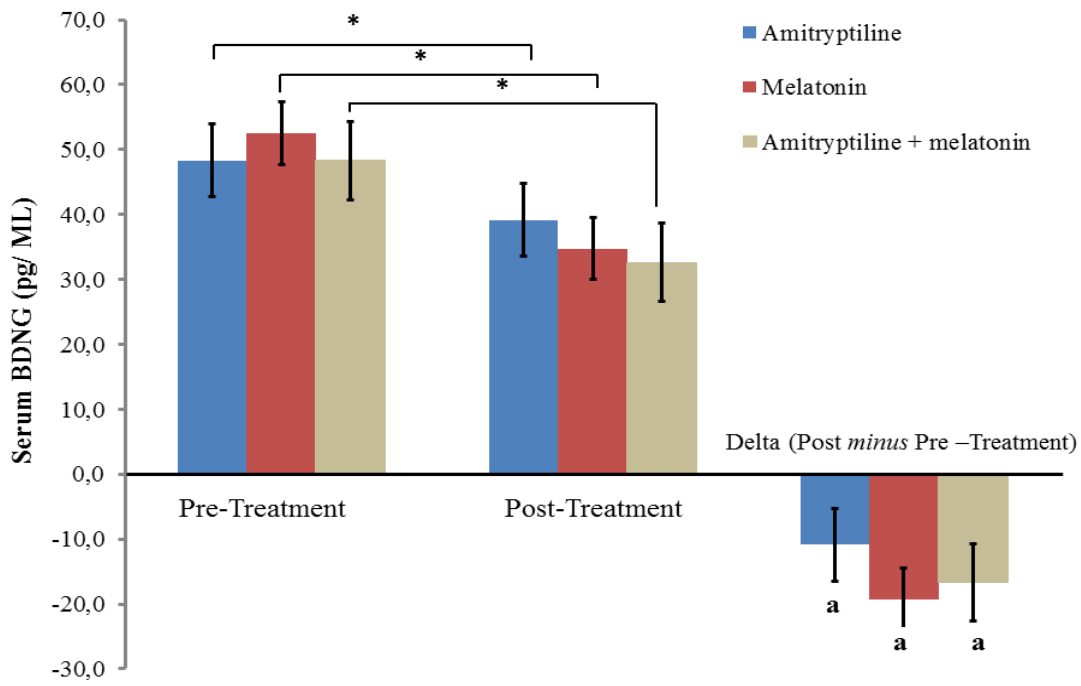


Figure a 4

Figure 1: Flow chart showing recruitment and progress through the study. FM: fibromyalgia syndrome; FIQ: fibromyalgia impact questionnaire; PPT: pain pressure threshold; CPM-TASK: conditioned pain modulation measures; SCID: Structured Clinical Interview for DSM-IV; pain VAS: visual analog scale of pain; major side effects (MJSE) (severe dizziness, vivid nightmares, crippling drowsiness, severe headache, behavioral changes, and pain worsening)

Figure 2. Mean pain levels as Delta value (scores on VAS (0-100 mm) in last week of treatment minus scores one week pretreatment), in the three experimental groups. The error bars indicate the standard error of the mean. Asterisk indicates significant difference between the melatonin and melatonin+amitriptyline from those that had received amitriptyline ($P < 0.05$). All comparisons were performed by a mixed analysis of variance (ANOVA) model, followed by the Bonferroni correction for *post hoc* multiple comparisons.

Figure 3. Delta value on pain NRS₍₀₋₁₀₎ during the CPM-TASK. The error bars indicate the standard error of the mean. Asterisk indicates difference between the melatonin+placebo and melatonin + amitriptyline than amitriptyline group. All comparisons were performed by a mixed analysis of variance (ANOVA) model, followed by the Bonferroni correction for *post hoc* multiple comparisons.

Figure 4. Mean serum BDNF (ng/mL) at baseline and the after treatment presented as mean \pm SEM. The asterisk indicates difference statistically significant within group by paired *Wilcoxon signed-rank test*. Delta values (serum BDNF before treatment minus serum BDNF after pretreatment) were performed by *Mixed ANOVA model with Bonferroni test to identify changes between groups*. The error bars indicate the standard error of the mean. ^a Indicates that the treatment did not induce an effect with difference statically significant between treatment groups ($P > 0.05$).

9 CONCLUSÕES

Neste estudo, observou-se que o uso da melatonina isolada ou associada à amitriptilina no tratamento da FM, durante seis semanas, foi melhor que o uso da amitriptilina isolada na melhora da dor na escala analógica visual, no escore do questionário de impacto da fibromialgia (FIQ) e no limiar de dor à pressão.

A melatonina também atuou no incremento do sistema modulatório endógeno da dor, avaliado através da redução da dor na escala numérica durante a modulação condicionada da dor (CPM-TASK).

Resultados adicionais sugerem ainda que o BDNF e a S100B possam ser usados como biomarcadores do mecanismo de sensibilização central, uma vez que a neurotrofina mostrou-se inversamente correlacionada com a redução da dor na CPM-TASK e ambas foram inversamente correlacionadas ao limiar de dor à pressão.

Os achados referentes ao BDNF corroboram resultados de estudos anteriores, nos quais essa neurotrofina mostrou-se aumentada em pacientes portadores de FM. Por outro lado, este é o primeiro estudo a relacionar a FM à S100B, proteína produzida nas células da glia e implicada nos mecanismos de insulto do sistema nervoso central.

10 PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de, nas últimas décadas, grandes avanços terem sido feitos em relação ao conhecimento da fisiopatologia e do manejo da FM, ainda não se dispõe de marcadores diagnósticos e de um padrão-ouro de tratamento.

Mecanismos neurais distintos e não totalmente elucidados, tais como a CS e um desequilíbrio entre os sistemas pró e antinociceptivos, estão implicados na fisiopatologia dessa doença. Seu tratamento, portanto, deve ser baseado em medicamentos e técnicas não farmacológicas que atuem nos vários mecanismos, na tentativa de inibi-los, modificá-los e até mesmo revertê-los. A melatonina, por seus mecanismos de ação multifacetados, demonstrou interferir nesses mecanismos, sugerindo ser uma opção no tratamento da FM.

O diagnóstico da FM é firmado a partir de critérios clínicos, não apresentando até o presente momento um marcador biológico patognomônico. Sabe-se, porém, que há um aumento das substâncias algio gênicas (substância P, glutamato) e déficit de neurotransmissores envolvidos na modulação inibitória da dor (serotonina, dopamina) nesta condição. O presente estudo relaciona o BDNF, marcador amplamente associado à sensibilização central, e a S100B, proteína produzida a partir da ativação glial e implicada nos mecanismos de lesão central, ao limiar de dor à pressão em pacientes fibromiálgicos. Este estudo foi o primeiro a relacionar esses três aspectos na FM, e seus achados corroboram a ideia de que a fisiopatologia da doença está intimamente relacionada a alterações do sistema nervoso central, seja através da sensibilização central e/ou alterações no sistema modulatório descendente da dor.

Este projeto fez parte de uma das linhas de pesquisa multidisciplinares que vêm sendo desenvolvidas pelo Laboratório de Dor e Neuromodulação do HCPA - UFRGS, voltadas ao

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

Os estudos desta tese inseriram-se no projeto temático desse Laboratório, cujo alvo das investigações é a integração dos diversos mecanismos neurobiológicos, diagnósticos e terapêuticos usando técnicas de neuromodulação, e que visam gerar conhecimento para alicerçar novas políticas de assistência e treinamento no manejo das dores aguda e crônica.

Essa abordagem integra a pesquisa à assistência envolvendo uma equipe de saúde multidisciplinar e permite estabelecer as interfaces da assistência ao paciente com dor e com a educação da equipe de saúde, tendo como prioridade o diagnóstico e tratamento aplicados. Colabora, assim, para a concretização da aplicação do conhecimento aos pacientes, cria uma estrutura funcional para que o conhecimento gerado seja transferido ao paciente e à sociedade e auxilia na elaboração de protocolos clínicos de diagnóstico e de tratamento. Esse conjunto de ações visa qualificar o sistema de saúde com terapêuticas eficazes, baseadas no processo fisiopatológico e suportadas por desfechos clínicos relevantes aos pacientes e à sociedade. Desta forma, buscou-se contribuir para o desenvolvimento dos grupos de pesquisa envolvidos, colaborando tanto qualitativa quanto quantitativamente com o desempenho científico e tecnológico. Com isto, auxiliar o fortalecimento da pesquisa brasileira no cenário nacional e internacional.

11 ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: **EIXO IMUNE-PINEAL NA FIBROMIALGIA: MODULAÇÃO NORADRENÉRGICA E ASPECTOS CRONOTERAPÊUTICOS**

Número do protocolo: _____

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre- HCPA

Pesquisadores Responsáveis: Dr. Wolnei Caumo – 9981-3977 e Dr^a. Iraci Torres - 84764710

Comitê de pesquisa e Ética em saúde do HCPA: (51) 3359-8304

Nome da Paciente:

Você está sendo convidada a participar, se quiser, de um estudo denominado de “Eixo imune-pineal na fibromialgia: modulação noradrenérgica e aspectos cronoterapêuticos”.

A sua participação é voluntária e, caso decida não participar deste estudo, o seu atendimento clínico não será prejudicado. **1. OBJETIVOS DESSE ESTUDO** A finalidade desse estudo é

relacionar a produção de substâncias do eixo imune-pineal (melatonina, por exemplo), os ritmos biológicos (temperatura, ciclo de sono e vigília) e a fibromialgia. **2. EXPLICAÇÃO**

DOS PROCEDIMENTOS. Na 1^a fase do estudo, durante 7 dias, a Sr^a deverá responder a

alguns questionários. Na 2^a fase do estudo, realizaremos a comparação do efeito da melatonina (substância que regula o ritmo de dormir e acordar) associada a um

comprimido sem efeito (**tratamento 1**), amitriptilina associada a um comprimido sem efeito (**tratamento 2**) ou amitriptilina associada à melatonina (**tratamento 3**) durante 6 semanas (na

3^a semana, a Sr^a vai preencher o diário de dor e sono por 7 dias). O tipo de comprimidos que a

Sr^a utilizará será definido por sorteio, por isso, nem a Sr^a nem os profissionais envolvidos com

a pesquisa saberão qual o tratamento que estará recebendo, mas um médico que não

participará das avaliações conhecerá o tratamento. Apesar de os medicamentos serem bastante seguros, a Sr^a será informada de qualquer efeito colateral (boca seca, por exemplo) que possa aparecer e também poderá informar a equipe pesquisadora de qualquer efeito diferente que a Sr^a venha a sentir. A Sr^a terá que responder várias perguntas antes, durante e depois do estudo. Será coletado sangue em duas ocasiões, no início e no final do tratamento, para avaliar a secreções de substâncias. O seu exame e tratamento serão realizados conforme o protocolo desse estudo. Se concordar em participar do estudo, a Sr^a terá que cooperar em todas as etapas do mesmo.

3. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS Possível desconforto do presente estudo poderá ser sentido, por algumas pessoas, na coleta de sangue. Durante o tratamento, algumas pessoas poderão relatar sonolência e algum efeito colateral dos medicamentos (boca seca, tonturas, dor de cabeça).

4. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESTES ESTUDOS O tratamento que será avaliado visa diminuir a dor e melhorar a qualidade de vida das pacientes portadoras de fibromialgia. Acredita-se que, se a melatonina tiver efeito na dor fibromiálgica sozinha ou associada à amitriptilina, ela poderá ser uma alternativa no tratamento desse tipo de dor. Com os resultados deste estudo poderemos obter informações importantes, sobre a relação entre fibromialgia e a regulação do eixo pineal (glândula que produz melatonina).

5. EXCLUSÃO DO ESTUDO O investigador responsável poderá excluí-la do estudo, sem o seu consentimento, quando julgar necessário, para o melhor encaminhamento do seu caso ou se a Sr^a não cumprir o programa estabelecido.

6. DIREITO DE DESISTÊNCIA A Sr^a pode desistir de participar a qualquer momento. Suas decisões de não participar ou de deixar a pesquisa depois de iniciada, não afetará seu atendimento posterior no HCPA.

7. PRIVACIDADE Todas as informações obtidas deste estudo poderão ser publicadas com finalidades científicas, preservando os dados da sua identificação.

8. CONSENTIMENTO

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 parte, voluntariamente, do presente estudo.

Porto Alegre, _____ de _____ de 20__.

ANEXO II

----- Forwarded message -----

From: **BioMed Central Customer Services** <info@biomedcentral.com>
Date: 2014-07-03 13:03 GMT-03:00
Subject: Please pay the article-processing charge for your article in Molecular Pain
To: WOLNEI CAUMO <caumo@cpovo.net>
MS: 1226214500123663

Higher serum S100B and BDNF levels are correlated with a lower pressure-pain threshold in fibromyalgia

by SimoneA Zanette, JairoA Dussan-Sarria, Andressa Souza, Alicia Deitos, IraciDSL Torres and Wolnei Caumo.

Accepted to Molecular Pain on 3 July 2014.

Dear Prof CAUMO,

We are delighted to confirm that your manuscript has been received by the Production team for publication in Molecular Pain and we will be in touch with you shortly.

Please remember that the article-processing charge (APC) must be paid prior to publication. Details of the APC for this manuscript, as well as both credit card and invoice payment methods, are available at:

<http://www.molecularpain.com/author/manuscript/payment/1226214500123663>.

Note, invoice (off-line) payments will incur an additional charge of GBP 50.00 / EUR 55.00 / USD 75.00.

Please do not hesitate to contact us if you have any questions.

Best wishes,
BioMed Central Customer Services

email: info@biomedcentral.com

--

Wolnei Caumo MD, PhD.
Professor of Pharmacology-ICBS/UFRGS
Laboratory of Pain & Neuromodulation
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003
Bairro Rio Branco - Porto Alegre - RS - Phone (51) 3359.8083

--

Você recebeu essa mensagem porque está inscrito no grupo "Dor e Neuromodulação" dos Grupos do Google.

Para cancelar inscrição nesse grupo e parar de receber e-mails dele, envie um e-mail para dor-neuromodulacao+unsubscribe@googlegroups.com.

Para mais opções, acesse <https://groups.google.com/d/optout>.

ANEXO III

----- Forwarded message -----

From: **BioMed Central Editorial** <editorial@biomedcentral.com>
Date: 2014-06-12 11:29 GMT-03:00
Subject: MS: 2910612041243158 - Melatonin analgesia is associated with improvement of the descending endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: A phase II, randomized, double-dummy, controlled trial
To: Prof WOLNEI CAUMO <caumo@cpovo.net>

MS: 2910612041243158

Melatonin analgesia is associated with improvement of the descending endogenous pain-modulating system in fibromyalgia: A phase II, randomized, double-dummy, controlled trial

Simone A Zanette, Rafael Vercelino, Gabriela Laste, Joanna R Rozisky, André Schwertner, Caroline B Machado, Fernando Xavier, Izabel CS de Souza, Alicia Deitos, Iraci LS Torres and Wolnei Caumo

Dear Prof Caumo,

I am delighted to inform you that our Editor has recommended the acceptance of your manuscript for publication in BMC Pharmacology and Toxicology. Before we can proceed, however, we must ask for the following Editorial Requests to be addressed.

Editorial Requests

1. CONSORT checklist

Thank you for including a statement regarding adherence to CONSORT guidelines. It is also our journal policy to ask for a copy of the completed checklist to be attached as an additional file (<http://www.consort-statement.org/>). Please also ensure this is given its own file description at the end of the manuscript that includes the following:

File name (e.g. Additional file 1)

File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)

Title of data

Description of data

2. Trial Registration date

Due to a recent change in journal policy we now must ask that you include the date that your trial was registered at the end of the Abstract.

3. Abstract

At present the Abstract on our submission system does not match that in the main text. Please be sure to upload the latest version onto our system.

4. Competing Interests

Where no financial or non-financial competing interests occur we recommend the following statement; "The authors declare that they have no competing

interests."

5. Authors' Contributions

Thank you for providing this information. Unfortunately we must ask that you refer to each author by their individual initials in this section.

6. Duplicate text

Please remove the duplicate figure headings from pages 39-41.

We would be grateful if you could address the comments in a revised manuscript and provide a cover letter giving a point-by-point response to the concerns.

Please also ensure that your revised manuscript conforms to the journal style (http://www.biomedcentral.com/info/ifora/medicine_journals). It is important that your files are correctly formatted.

We look forward to receiving your revised manuscript by 3 July 2014. If you imagine that it will take longer to prepare please give us some estimate of when we can expect it.

You should upload your cover letter and revised manuscript through http://www.biomedcentral.com/manuscript/login/man.asp?txt_nav=man&txt_man_id=2910612041243158. You will find more detailed instructions at the base of this email.

Please don't hesitate to contact me if you have any problems or questions regarding your manuscript.

With best wishes,

Clare Partridge
Assistant Editor

Tel: +44 (0) 20 3192 2013
e-mail: editorial@biomedcentral.com
Web: <http://www.biomedcentral.com/>

To submit your revised manuscript

When you have revised your manuscript please upload the revised version by following these instructions:

1. Go to http://www.biomedcentral.com/manuscript/login/man.asp?txt_nav=man&txt_man_id=2910612041243158 and log on with your email address and password.
2. With the 'Manuscript details' tab, please update the title, abstract and author details if they have changed since the previous version. It is very important that all changes are updated on this page, as well as in the manuscript file as the information on this page will be used in PubMed and on BioMed Central if your manuscript is accepted for publication.
3. With the 'Cover letter' tab, please provide a covering letter with a point-by-point description of the changes made.

4. With the 'Upload files' tab, please upload the revised version of the manuscript and press 'Submit new version'. Please wait for the confirmation page to appear - this may take a few moments.

--

Wolnei Caumo MD, PhD.
Professor of Pharmacology-ICBS/UFRGS
Laboratory of Pain & Neuromodulation
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003
Bairro Rio Branco - Porto Alegre - RS - Phone (51) 3359.8083

--

Você recebeu essa mensagem porque está inscrito no grupo "Dor e Neuromodulação" dos Grupos do Google.
Para cancelar inscrição nesse grupo e parar de receber e-mails dele, envie um e-mail para dor-neuromodulacao+unsubscribe@googlegroups.com.
Para mais opções, acesse <https://groups.google.com/d/optout>.