## PEDRO SUDBRACK OLIVEIRA

### Caracterização circadiana da excitabilidade cortical motora

### em humanos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria Orientador: Prof. Dr. André Russowsky Brunoni

SÃO PAULO 2022

## PEDRO SUDBRACK OLIVEIRA

## Caracterização circadiana da excitabilidade cortical motora

### em humanos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria Orientador: Prof. Dr. André Russowsky Brunoni

SÃO PAULO 2022

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Pedro Sudbrack Caracterização circadiana da excitabilidade cortical motora em humanos / Pedro Sudbrack Oliveira. -- São Paulo, 2022. Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Psiquiatria. Orientador: André Russowsky Brunoni. Descritores: 1.Córtex motor 2.Excitabilidade cortical 3.Inibição cortical 4.Estimulação Magnética transcraniana 5.Cronotipo 6.Ritmo circadiano USP/FM/DBD-221/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## Dedicatória

Esta tese é dedicada a todos os brasileiros que compreendem a importância da ciência como um instrumento transformador de vidas e da realidade social.

#### **Agradecimentos**

Este trabalho científico é fruto de ampla colaboração. Assim agradeço:

Primeiramente, ao meu orientador, Professor André R. Brunoni, pelos ensinamentos, disponibilidade, apoio, confiança e pela generosidade raramente encontrada nesse meio acadêmico. Um exemplo de professor e ser humano. Muito obrigado!

À Dra. Sigride Thomé de Souza e demais funcionários do serviço de Vídeo-EEG do IPq, pelo acolhimento e dedicação, sem os quais esta pesquisa não poderia ter prosseguido.

Aos colegas e funcionários do Serviço Interdisciplinar de Neuromodulação, pelos ensinamentos, amizade e parceria. Sentirei saudades.

Às graduandas do curso de medicina, Larissa Oliveira e Isaura Gaudêncio, que tanto me auxiliaram na execução desse projeto, tornando o processo menos árduo.

À Dra. Fernanda do Amaral, Dra. Kallene Vidal, Dr. José Cippolla, Dra. Patrícia Nehme e Rose Raad, pelas contribuições fundamentais relativas à fisiologia circadiana.

Aos voluntários da pesquisa. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais, Kátia e Elvis, pelo apoio incondicional, sempre.

À Mariana, pelo amor e paciência. E pela parceria, em todos os aspectos imagináveis.

A realização deste trabalho somente foi possível em decorrência de auxílio financeiro integralmente público. Assim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de Bolsa de doutorado no país (processo nº 2019/10760-9).

"In a very real sense, civilization may be a product of the frontal lobes."

Carl Sagan

### Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

### Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

- AIC: Akaike information criterion
- AP: Amplitude de pico
- BAI: Beck anxiety inventory (Inventário de ansiedade de Beck)
- BDI: Beck depression inventory (Inventário de depressão de Beck)
- BDNF: brain derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado do cérebro)
- BOLD: blood oxygenation level dependent signal (sinal dependente do nível de

oxigenação sanguínea)

colab: colaborador(es)

CM: campo magnético

DLMO: dim light melatonin onset (início da secreção noturna de melatonina)

DP: desvio-padrão

ECM: excitabilidade cortical motora

- EEG: eletroencefalograma
- EMG: eletromiografia
- EMT: estimulação magnética transcraniana
- EMTr: estimulação magnética transcraniana repetitiva
- ESE: escala de sonolência de Epworth
- ESS: escala de sonolência de Stanford
- et al: e outros
- ex: exemplo

fig: figura

GABA: gamma aminobutyric acid (ácido gama aminobutírico)

h: hora

IC: intervalo de confiança

ICF: intracortical facilitation (facilitação intracortical)

IFCN: International Federation of Clinical Neurophysiology (Federação

Internacional de Neurofisiologia Clínica)

ipRGC: intrinsically photosensitive retinal ganglion cell (célula ganglionar

retiniana intrinsecamente fotossensível)

ISI: Insomnia severity index (Índice de gravidade de insônia)

LICI: long interval cortical inhibition (inibição cortical a intervalos longos)

LM: Limiar motor

LOESS: *locally estimated scatterplot smoothing* (suavização local de gráfico de dispersão)

LTD: long term depression (depressão de longa duração)

LTP: long term potentiation (potenciação de longa duração)

M: média

m: mili

Md: mediana

MEQ: Morningness-eveningness questionnaire (Questionário de

matutinidade-vespertinidade)

Met: metionina

M1: córtex motor primário

NMDA: n-methyl-d-aspartate (n-metil-d-aspartato)

NREM: non rapid eye movement

NSQ: Núcleo supraquiasmático

PCS: Período cortical silente

PEM: Potencial evocado motor

PEST: Parameter estimation by sequential testing (estimativa de parâmetro por

testagem sequencial)

PSQI: Pittsburgh sleep quality index (Índice de qualidade de sono de

Pittsburgh)

REM: rapid eye movement (movimento rápido dos olhos)

RM: Ressonância magnética

RPL: Reflexo pupilar à luz

RS: Resposta sustentada

s: segundo

SICI: short interval cortical inhibition (inibição cortical a intervalos curtos)

STC: Sistema temporizador circadiano

V: volts

Val: Valina

Vídeo-EEG: videoeletroencefalograma

µ: micro

# Lista de figuras

Figura 1. Potencial evocado motor11
Figura 2. Efeitos à distância da estimulação do córtex motor14
Figura 3. Período cortical silente17
Figura 4. SICI com intervalo de 2 ms entre os pulsos pareados19
Figura 5. LICI com intervalo de 300 ms entre os pulsos pareados20
Figura 6. Estimativas (IC 95%) para o limiar motor de repouso em função do
tempo46
Figura 7. Limiar repouso por indivíduo e cronotipo em função do tempo, com
curvas de regressão local (LOESS)47
Figura 8. LM (média ± DP) por hemisfério cerebral, ao longo do tempo47
Figura 9. Amplitude do PEM por indivíduo (média bilateral), ao longo do tempo,
com curvas de regressão local (LOESS)48
Figura 10. Duração do PCS por indivíduo (média bilateral), ao longo do tempo,
com curvas de regressão local (LOESS)49
Figura 11. Estimativas (IC 95%) para SICI, por tempo e cronotipo51
Figura 12. Coeficientes (IC 95%), por variável preditora. Referência: cronotipo
intermediário / intervalo 5 ms52
Figura 13. Estimativas (IC 95%) para Inibição a intervalos longos, por tempo e
cronotipo (escala logarítmica)53
Figura 14. Estimativas (IC 95%) para Inibição a intervalos muito longos, por
tempo e cronotipo (escala logarítmica)54

## Lista de tabelas

Tabela 1. Resumo das medidas de Excitabilidade Cortical Motora [adaptado	de
Bauer et al, 2014]	.21
Tabela 2. Características clínicas e demográficas	.44
Tabela 3. Características clínicas e demográficas, por cronotipo	45

#### Resumo

Oliveira PS. *Caracterização circadiana da excitabilidade cortical motora em humanos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

INTRODUÇÃO: Em humanos, diferenças nos níveis de excitabilidade cortical motora relacionadas ao horário do dia já foram descritas. Este fenômeno é potencialmente mediado pela interação entre sistema temporizador circadiano e circuitos corticais inibitórios. Entretanto, evidências nesse sentido ainda são escassas e a possibilidade de influência do componente homeostático de pressão de sono foi pouco explorada. A preferência circadiana comportamental (cronotipo) é outro fator que pode influenciar nas medidas de excitabilidade cortical. OBJETIVO: Caracterizar o perfil circadiano da excitabilidade cortical motora em indivíduos saudáveis a partir de medidas seriadas com a técnica de estimulação magnética transcraniana do córtex motor acoplada a eletromiografia (EMT-EMG), levando em consideração a pressão de sono e o cronotipo dos participantes. MÉTODO: Vinte participantes saudáveis tiveram o cronotipo avaliado por meio do Questionário de Matutinidade-Vespertinidade. Adicionalmente, foram aferidas as amplitudes dos potenciais evocados motores desencadeados por pulsos simples e pareados, além do período cortical silente, em avaliações seriadas ao longo de um período de 24 horas. Com a finalidade de assegurar a presença de um período de sono com duração adequada e promover a habituação dos participantes às condições externas, o estudo teve início após uma noite de sono em ambiente laboratorial/hospitalar.

Ao longo das avaliações, os níveis agudos de sonolência subjetiva foram quantificados. A associação entre variáveis preditoras e resposta foi verificada a partir de modelos lineares de efeitos mistos. RESULTADOS: Indivíduos com cronotipo matutino apresentaram menor inibição cortical pela manhã em avaliação por pulsos pareados de intervalo curto (2 e 5 ms), com aumento progressivo ao longo do tempo e pico de inibição no primeiro dia às 17h (razão 17h/9h: 1,54; IC 95%: 1,06 - 2,22; p = 0,02). Não foram observadas associações significativas entre as demais medidas de excitabilidade em relação ao horário do dia para este cronotipo, tampouco mudanças significativas em quaisquer das medidas relacionadas aos cronotipos vespertino, intermediário e na totalidade da amostra ao longo do tempo. Adicionalmente, os subgrupos matutino e vespertino apresentaram perfis distintos de inibição a intervalos longos, dependentes do intervalo empregado e independentes do horário. CONCLUSÕES: Medidas de inibição cortical apresentam perfis e trajetórias distintas ao longo do tempo, na dependência do cronotipo. Os achados deste trabalho ampliam o entendimento da fisiologia do córtex motor primário, com implicações para o desenvolvimento de biomarcadores de doenças neuropsiquiátricas que sejam baseados em medidas de excitabilidade, bem como no aprimoramento de técnicas de neuromodulação não invasiva que tenham essa região como alvo, seja na pesquisa básica ou em ensaios clínicos futuros.

**Descritores:** Córtex motor; Excitabilidade cortical; Inibição cortical; Estimulação magnética transcraniana; Cronotipo; Ritmo circadiano.

#### Abstract

Oliveira PS. *Circadian characterization of motor cortical excitability in humans* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

INTRODUCTION: In humans, differences in motor cortex excitability levels related to time of day have already been described. This phenomenon is potentially mediated by the interaction between the circadian timing system and inhibitory cortical circuits. However, evidence in this regard is still scarce and the possibility of influence of the homeostatic component of sleep pressure has been little explored. Behavioral circadian preference (chronotype) is another factor that can influence excitability measurements. OBJECTIVE: To characterize the circadian profile of cortical excitability in healthy individuals from serial measurements with the technique of transcranial magnetic stimulation of the motor cortex coupled with electromyography (TMS-EMG), taking into account the participants' chronotype and sleep pressure. METHODS: Twenty healthy individuals had their chronotype assessed using the Morningness-Evenings Questionnaire. Additionally, the amplitudes of motor evoked potentials triggered by single and paired pulses, in addition to the cortical silent period, were measured in serial assessments over a 24-hour period. In order to ensure the presence of an adequate period of sleep and promote the participants' habituation to external conditions, the study began after a night's sleep in a laboratory/hospital environment. Throughout the TMS-EMG evaluations, the acute levels of subjective sleepiness were assessed. The association between predictor and response variables was verified using linear mixed effects models. RESULTS: Individuals with morning chronotype showed lower cortical inhibition in the morning in evaluation by short-interval paired pulses (2 and 5 ms), with a progressive increase over time and same-day peak inhibition in the afternoon period (ratio 5pm/9am: 1.54; 95% CI: 1.06 - 2.22; p = 0.02). No significant associations were observed between the other excitability measures in relation to the time of day for this chronotype, nor significant changes in any of the measures related to evening or intermediary chronotypes and in the entire sample over time. Additionally, the morning and evening subgroups showed distinct profiles of inhibition at long intervals, dependent on the employed interval and independent of the time of day. CONCLUSIONS: Measures of cortical inhibition show distinct profiles and trajectories over time, depending on the chronotype. The findings of this work expand the understanding of the physiology of the primary motor cortex, with implications for the implementation of excitability-based biomarkers of neuropsychiatric diseases, as well as the development of non-invasive neuromodulation protocols that target this region, either in basic research or in future clinical trials.

**Descriptors:** Motor cortex; Cortical excitability; Cortical inhibition; Transcranial magnetic stimulation; chronotype; circadian rhythm.

## Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema temporizador circadiano	1
1.2 Cronotipo	4
1.3 Córtex motor	6
1.4 Inibição e excitação no córtex cerebral	7
1.5 Potencial evocado motor	10
1.6 Excitabilidade cortical motora (ECM)	14
1.7 Estudos de série temporal com EMT-EMG em voluntários saudáveis	21
1.8 Justificativa e hipóteses	25
2 OBJETIVOS	28
3 MÉTODOS	29
3.1 Desenho e local do estudo	29
<ul><li>3.2 Amostra</li><li>3.2.1 Critérios de elegibilidade</li><li>3.2.2 Características clínicas</li></ul>	29 29 30
3.3 Procedimentos	31
<ul> <li>3.4 Medidas de Excitabilidade Cortical Motora (ECM)</li> <li>3.4.1 Limiar motor de repouso (LM)</li> <li>3.4.2 Amplitude do potencial evocado motor (PEM)</li> <li>3.4.3 Período cortical silente (PCS)</li> <li>3.4.4 SICI</li> <li>3.4.5 LICI</li> </ul>	31 33 33 33 34 34
3.5 Eletroencefalograma (EEG)	36
3.6 Melatonina salivar	37
3.7 Reflexo pupilar (RPL)	38
3.8 Cálculo amostral	39
3.9 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	

4.1 Participantes 43

4.2 Excitabilidade cortical motora (ECM)	45
4.2.1 Limiar motor de repouso (LM)	45
4.2.2 Amplitude do potencial evocado motor (PEM)	48
4.2.3 Período cortical silente (PCS)	49
4.2.4 Inib. por pulsos pareados, intervalos curtos (SICI - 2 e 5 ms)	50
4.2.5 Inib. por pulsos pareados, intervalos longos (LICI - 50, 100 e 150 ms)	52
4.2.6 Inib. por pulsos pareados, intervalos longos (LICI - 200, 250 e 300 ms)	54
5 DISCUSSÃO	55
5.1 Limiar motor (LM) e amplitude dos potenciais evocados motores (PEMs)	55
5.2 Período cortical silente (PCS)	59
5.3 Inibição a intervalos curtos (SICI)	63
5.4 Inibição a intervalos longos e longuíssimos (LICI)	65
5.5 Limitações	68
5.6 Considerações finais	69
6 CONCLUSÕES	72
7 REFERÊNCIAS	74

## 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Sistema temporizador circadiano

Os ritmos circadianos são resultado da flutuação cíclica, ao longo de um período de 24 horas, de múltiplos parâmetros fisiológicos a nível celular, Nos tecidual. sistêmico е comportamental<sup>1</sup>. mamíferos. núcleo 0 supraguiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo, é o centro coordenador do sistema temporizador circadiano (STC). Os neurônios do NSQ apresentam atividade elétrica espontânea, sendo esta acoplada e orguestrada em grandes populações neuronais mediante ação inibitória GABAérgica<sup>2,3</sup>. As células do NSQ possuem atividade endógena tipo marca-passo, com período aproximado de 24 horas, apresentando despolarização diurna do potencial de membrana e hiperpolarização noturna<sup>4</sup>. Em condições fisiológicas, esse ritmo endógeno adquire uma periodicidade precisa de 24 horas, a partir da sincronização com sinais externos ao organismo, chamados zeitgebers, sendo a luz solar o principal deles<sup>5</sup>.

A eficiência do sinal luminoso na sincronização do STC deve-se à existência do trato retino-hipotalâmico, aferência direta do NSQ <sup>4</sup>. Este trato é composto predominantemente por vias não visuais formadas por axônios de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina (do inglês *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells* - iPRGCs), que contém o fotopigmento melanopsina<sup>6</sup>. Parte dos axônios das iPRGCs emergem do trato óptico e emitem colaterais que fazem sinapse com neurônios do núcleo olivar pretectal, envolvidos na ativação parassimpática responsável pela contração do

músculo esfíncter da pupila<sup>7</sup>. Assim, atividade destas células pode ser indiretamente aferida por meio do reflexo pupilar à luz (RPL). As iPRGCs possuem maior sensibilidade a estímulos luminosos de pequeno comprimento de onda, na faixa de cor azul, de modo que a resposta sustentada após esse tipo de estímulo reflete indiretamente a excitabilidade dessas células<sup>8</sup>. Deste modo, o RPL representa um marcador fisiológico do estado de atividade de neurônios proximais na via de sincronização do STC, que pode ser estudado *in vivo* em humanos.

Já as vias eferentes do NSQ, dirigem-se a sistemas de controle neuroendócrino, que por sua vez regulam a atividade de múltiplos tecidos <sup>9</sup>. Dentre estes, destaca-se a glândula pineal, que recebe aferências indiretas do NSQ, via sistema autônomo simpático. O principal produto secretório da glândula é o hormônio melatonina, que é prontamente liberado na circulação sistêmica em condições de baixa luminosidade. A avaliação seriada noturna das concentrações desse hormônio permite a obtenção de marcadores temporais robustos e objetivos do STC <sup>10</sup>.

A dosagem seriada da melatonina nos diferentes líquidos biológicos pode ser empregada, por exemplo, para o estabelecimento do horário em que atinge seu valor máximo (acrófase). Entretanto, o momento que representa a acentuação da inclinação da curva de ascensão noturna da secreção do hormônio em condições de baixa luminosidade (do inglês, *dim light melatonin onset* - DLMO), também é um marcador fidedigno da ritmicidade do STC. Possui a vantagem de maior praticidade, pois não há necessidade de despertar voluntários para a dosagem seriada, posto que habitualmente o DLMO antecede o período de sono. Adicionalmente, a dosagem da melatonina por

este método pode ser realizada em amostras de saliva, líquido biológico de fácil obtenção<sup>10</sup>.

O ciclo sono-vigília é possivelmente o processo biológico com ritmo circadiano mais bem estabelecido e estudado. Em 1982, o modelo dos dois processos foi primeiramente concebido, oferecendo um arcabouço explicativo para a alternância entre períodos de vigília e sono e contribuindo para o desenvolvimento da ciência e medicina do sono nas últimas décadas<sup>11</sup>. Resumidamente, este modelo indica que o sono, como fenômeno comportamental e neurofisiológico, depende da propensão à sua ocorrência. Esta propensão, por sua vez, ocorre em momentos específicos ao longo do ciclo circadiano, a partir da interação entre dois processos: circadiano (C) e homeostático (S). No processo C, a permissividade circadiana para ocorrência do sono espontâneo é dada a partir da secreção de melatonina pela glândula pineal em condições de baixa luminosidade. Já o processo S está associado ao acúmulo lento e progressivo da pressão de sono, em relação direta com a duração da vigília. Ainda, acredita-se que o processo S esteja associado ao acúmulo de substâncias sonógenas no córtex cerebral, como a adenosina<sup>12</sup>.

A pressão de sono pode ser estimada de forma indireta a partir do teor de ondas delta no eletroencefalograma (EEG) quantitativo, sendo máximo nos períodos iniciais do sono não REM (do inglês, *non rapid eye movement* -NREM), com decréscimo progressivo ao longo da noite<sup>13</sup>. Durante a vigília, o teor de ondas lentas, predominantemente na faixa teta de frequência, correlaciona-se também com o processo S, com de aumento progessivo ao longo do período de vigília<sup>14</sup>.

#### 1.2 Cronotipo

O cronotipo é um construto que reflete um conjunto de comportamentos relacionados à preferência individual para a realização de diferentes atividades, como tarefas cognitivas, motoras, e também para início e término do sono. Na população geral, cerca de 60% dos indivíduos possuem cronotipo intermediário, ao passo que os 40% restantes são classificados como matutinos ou vespertinos<sup>15</sup>. Entende-se que os cronotipos são estáveis em períodos de meses a poucos anos<sup>16</sup>, porém são modulados por fatores como sexo e idade. Mulheres, por exemplo, apresentam maior chance de serem matutinas, assim como idosos. Por outro lado, uma tendência mais vespertina é uma característica relativamente frequente na adolescência<sup>17</sup>. Nos dois extremos da expressão cronotípica, indivíduos matutinos e vespertinos podem apresentar uma diferença de fase de até 12 horas em determinados comportamentos<sup>15</sup>.

Os cronotipos podem interagir com a saúde física e mental, na dependência de complexa interação entre fatores genéticos e do meio ambiente. Indivíduos vespertinos, por exemplo, apresentam risco mais elevado para o *jet lag* social, quando as atividades rotineiras de trabalho/escola não estão alinhadas com os ritmos endógenos. Tal fenômeno está associado à privação crônica de sono, que por sua vez pode levar a consequências negativas nas esferas afetiva e cognitiva<sup>18</sup>. Entretanto, independente do cronotipo, a ausência de alinhamento dos períodos de sono com o STC está associada a transtornos do sono relacionados ao ritmo circadiano, como avanço ou atraso de fase<sup>19</sup>.

Como esperado, o cronotipo possui associação também com medidas fisiológicas. Assim, a acrófase da concentração plasmática de melatonina, assim como o nadir da temperatura corporal, ocorrem em antecipação de duas horas em indivíduos matutinos em relação aos vespertinos<sup>20</sup>. Padrão similar foi observado para o DLMO<sup>21</sup>, bem como para o RPL relacionado às iPRGcs.<sup>22</sup>

Do ponto de vista comportamental e cognitivo, o cronotipo também se associa com diferentes padrões de atividade motora<sup>16</sup> e cognitiva<sup>23</sup>, com maior performance observada no horário preferencial a depender do cronotipo. Em contrapartida, para determinados desfechos, como controle postural, o cronotipo individual não parece ser relevante<sup>24</sup>. Assim, cronotipos distintos podem apresentar picos de performance semelhantes, padrões temporais com diferença de fase (à semelhança do padrão de temperatura corporal), ou padrões opostos, na dependência da variável aferida. Ademais, as bases neurobiológicas dessas associações não estão completamente elucidadas, sendo que diferentes redes neuronais corticais podem estar implicadas. Nesse sentido, estudos já evidenciaram padrões distintos de ativação por ressonância nuclear magnética (RM) funcional, a depender do horários do dia<sup>25</sup>. Além da avaliação por métodos de neuroimagem funcional, estudos neurofisiológicos foram também empregados para estimar a relação do horário do dia com a atividade cortical, com destaque para a estimulação magnética transcraniana acoplada à eletromiografia (EMT-EMG)<sup>26,27</sup>. A seguir, serão descritos aspectos relevantes da anatomia e fisiologia do córtex motor primário, a região mais explorada a partir da referida técnica.

#### 1.3 Córtex motor

O córtex motor foi inicialmente identificado e descrito por Fritz e Hitzig em trabalho seminal publicado no ano de 1870, no qual descrevem contrações musculares nas patas de cachorros mediante estimulação elétrica realizada diretamente sobre o córtex cerebral desses animais<sup>28</sup>. No interior do córtex motor, a área motora primária localiza-se no giro pré central do lobo frontal e possui menor limiar de excitação para a geração de respostas motoras quando eletricamente estimulada, em comparação a outras regiões corticais<sup>29</sup>. Na década de 1930, o neurocirurgião Penfield, observou, em humanos despertos, que os diferentes segmentos corporais apresentavam representação somatotópica na área motora primária, também chamada de M1<sup>30</sup>.

Quanto à citoarquitetura, M1 difere de outras regiões corticais pela ausência de células granulares na camada IV (uma característica de áreas sensitivas), e pela presença de células piramidais gigantes na camada V, também conhecidas como células de Betz<sup>31</sup>. Com base nessas particularidades citoarquitetônicas, numa classificação que segmentou o córtex em 52 áreas distintas, a porção que se sobrepõe a M1 foi denominada área 4 por Brodmann<sup>32</sup>. Mais recentemente, subdivisões desta região foram incorporadas à classificação inicial e nomeadas como área 4a, de localização mais profunda no sulco central, e 4b, mais próxima do lábio giral<sup>33</sup>.

A maioria dos neurônios do córtex motor são células piramidais excitatórias glutamatérgicas. Estas podem fazer sinapses com neurônios da mesma coluna cortical, em regiões adjacentes, ou mesmo se projetar para regiões corticais distantes ou mesmo subcorticais. Os neurônios piramidais da camada V emitem seus axônios em direção subcortical, formando parte do trato corticoespinhal que inervam os motoneurônios medulares do corno anterior. Acredita-se que os neurônios dessa via de saída estejam localizados tanto na área 4a quanto 4b, predominando na parede anterior do sulco central<sup>34</sup>. Em humanos, a conexão entre motoneurônios superiores (células de Betz) e motoneurônios inferiores, localizados no corno anterior da medula espinhal, é em grande parte monossináptica, ou seja, uma conexão direta não mediada por interneurônios<sup>35</sup>.

O córtex motor possui ainda neurônios inibitórios GABAérgicos. Estes, por sua vez, conectam-se preferencialmente com alvos neuronais locais, dentro do mesmo circuito intracortical. Diferentemente das células piramidais, que possuem como alvo principal os dendritos dos neurônios pós-sinápticos, os interneurônios inibitórios fazem conexão com diferentes compartimentos dos neurônios pós-sinápticos (dendritos, soma, axônio), num padrão de conectividade possivelmente associado com a flexibilidade computacional dos circuitos corticais<sup>36</sup>.

#### 1.4 Inibição e excitação no córtex cerebral

A manutenção do equilíbrio entre as atividades excitatória e inibitória nos diferentes circuitos corticais é fundamental para a manutenção da saúde. Acredita-se que hiperexcitabilidade neuronal decorrente do aumento da atividade excitatória, redução da atividade inibitória ou ambos, seja um fenômeno comum a diversas doenças neuropsiquiátricas, como epilepsia, doença de Alzheimer, depressão e esquizofrenia<sup>37–40</sup>.

O papel regulatório dos sistemas inibitórios é particularmente complexo e pouco compreendido, posto que disfunções inibitórias podem cursar com hiperexcitabilidade decorrente tanto da redução dos potenciais pós-sinápticos inibitórios, por déficit de atividade GABAérgica, quanto por desinibição pré-sináptica de neurônios excitatórios (glutamatérgicos). A desinibição patológica mediada por GABA-B representa um fenômeno descrito tanto em modelos animais <sup>41</sup> quanto em humanos<sup>42</sup>.

A grande diversidade morfofisiológica dos interneurônios inibitórios corticais, bem como a complexidade das suas conexões com as células piramidais, sugerem que a sua função nos circuitos intracorticais vá além do controle da hiperexcitabilidade de escape. Ainda que esta seja uma importante função, prevenindo a ocorrência de crises epilépticas espontâneas, outras funções potencialmente associadas com a atividade inibitória incluem: controle dinâmico do ganho/sensibilidade; estabelecimento de filtros temporais e estabelecimento de comportas de informação (*gating of information*). Assim, estaria assegurado um controle computacional granular e preciso nos diferentes compartimentos neuronais<sup>36</sup>.

O equilíbrio entre inibição e excitação corticais é nitidamente distinto no estado de vigília em comparação aos diferentes estágios do sono, com evidências de neuroimagem funcional mostrando menor metabolismo no córtex cerebral durante o sono NREM, em comparação aos estados de vigília e sono REM<sup>43</sup>. A ativação cortical da vigília é em grande parte mediada por sistemas subcorticais com origem no tronco encefálico, diencéfalo e prosencéfalo basal. Estes emitem projeções axonais difusas para o córtex cerebral, valendo-se da neurotransmissão por acetilcolina, noradrenalina, serotonina, dopamina e

histamina. O início do período de sono, por sua vez, dá-se pela inibição mediada pelos neurotransmissores GABA e galanina, a partir de projeções da área pré-óptica ventrolateral, localizada no hipotálamo anterior, sobre os aludidos sistemas promotores da vigília<sup>44</sup>.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, atuando tanto no córtex cerebral, quanto em núcleos subcorticais, conforme anteriormente discutido. Os receptores GABA-A são proteínas transmembrana tipo canal iônico, que mediante interação com o neurotransmissor, abrem-se e permitem a entrada de íons cloreto do meio extra para o intracelular, promovendo inibição por hiperpolarização do potencial de membrana. Como o próprio receptor é um canal iônico efetor de resposta, os efeitos da interação do neurotransmissor com o receptor GABA-A são mais rápidos quando comparados aos receptores GABA-B, discutidos na sequência. Múltiplas drogas possuem ação sobre os receptores GABA-A (ex. etanol, benzodiazepínicos), potencializando a sua interação com o neurotransmissor e a subsequente resposta hiperpolarizante<sup>45</sup>.

Os receptores GABA-B, por sua vez, promovem inibição por via indireta, posto que são do tipo metabotrópico. A ligação do GABA a este receptor promove uma cascata de reações intracelulares que culmina com a hiperpolarização pós-sináptica mediante abertura de canais de potássio. Já sua ação pré-sináptica ocorre mediante inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem, o que pode ocorrer tanto em neurônios inibitórios quanto excitatórios. Além de influenciar a condutância iônica da membrana plasmática, efeitos intracelulares com maior latência ocorrem *downstream*, modulando efeitos tardios e duradouros relacionados à expressão de proteínas de

superfície e regulação da expressão gênica. Tais propriedades colocam os receptores GABA-B no centro da regulação da excitabilidade neuronal, posto que atuam em diferentes escalas temporais<sup>46</sup>.

Existem evidências de oscilações de base circadiana na expressão de receptores dos neurotransmissores GABA em modelos animais<sup>47</sup>, entretanto este fenômeno ainda não foi demonstrado em humanos. Evidências indiretas, no entanto, apontam diferenças na atividade cortical na vigília, na dependência do horário do dia. Em estudo com RM funcional que avaliou participantes saudáveis, por exemplo, os autores observaram oscilações da atividade de repouso de múltiplas redes neuronais corticais, com período de 24 horas<sup>25</sup>. Dentre as redes identificadas por Blautzik e colegas, está incluída a rede motora. Entretanto, o sinal captado por esse método (*blood oxygenation level dependent* - BOLD) possui baixa resolução temporal, refletindo apenas de forma indireta a atividade neuronal em regiões corticais circunscritas<sup>48</sup>. Antes de detalhar os estudos que avaliaram a excitabilidade neuronal de humanos *in vivo* em diferentes horários, pela técnica da EMT-EMG, à semelhança do que foi realizado no presente trabalho, serão discutidas as bases das medidas de excitabilidade obtidas por esta técnica.

#### 1.5 Potencial evocado motor

A estimulação magnética transcraniana (EMT), técnica desenvolvida por Barker et al. no ano de 1985, tornou possível a realização de uma excitação transitória e artificial do córtex cerebral humano de forma não invasiva e indolor, o que foi demonstrado a partir do registro do potencial evocado motor (PEM)<sup>49</sup>. O PEM nada mais é do que a atividade elétrica muscular que sucede o estímulo do córtex motor, registrada por eletromiografia (EMG) de superfície. Trata-se de uma deflexão habitualmente bi ou polifásica, apresentando tanto componente eletronegativo quanto eletropositivo. Na Figura 1, a seguir, é possível observar um PEM gerado mediante estímulo magnetoelétrico cortical. No tempo 0 visualiza-se o artefato de estímulo seguido do referido potencial após um intervalo de cerca de 20 ms, que é a duração (latência) do trajeto do impulso nervoso através do córtex cerebral. passando pelo trato corticoespinhal, corno anterior da medula, nervo periférico e junção neuromuscular. A amplitude pico a pico do PEM neste exemplo é de aproximadamente 3 mV:



Figura 1. Potencial evocado motor

Eixo x: tempo (ms) Eixo y: diferença de potencial entre eletrodo ativo e referência (mV) FONTE: arquivo pessoal do autor

O sistema de EMT, resumidamente, é composto por um capacitor de alta voltagem que, quando descarregado, ocasiona uma corrente elétrica de grande intensidade que flui através de uma bobina a ele conectada. Esta corrente, por sua vez, apresenta uma conformação sinusóide, com ascensão e decréscimo da sua magnitude ocorrendo em um curtíssimo espaço de tempo (habitualmente até 150 µs). Esta corrente pulsada então, induz um campo magnético (CM) que é perpendicular à superfície da bobina e que penetra o crânio sem sofrer atenuação pelos tecidos interpostos. A intensidade máxima do CM é da ordem de 2 Tesla na proximidade da bobina, porém à medida em que este percorre o trajeto até o córtex cerebral, sua intensidade decresce em função da distância percorrida<sup>34</sup>. Assim, depreende-se que as porções mais superficiais do córtex, que estão a uma menor distância da bobina (ex. coroa do giro cortical), estão expostas a CMs de maior intensidade em comparação a regiões mais profundas (ex. fundo do sulco cortical). Na intimidade do córtex cerebral, que se comporta como um meio condutor, é gerada uma corrente elétrica secundária com direção paralela e sentido oposto em relação à corrente primária (que flui pela bobina), pelo fenômeno da indução magnetoelétrica<sup>50</sup>.

A geometria da corrente e campo elétrico induzidos favorece a despolarização preferencial em segmentos axonais específicos, principalmente aqueles mielinizados, com destaque para o cone axonal, regiões onde os axônios se curvam e pontos de arborização dos seus terminais. Ainda que os neurônios piramidais do córtex possam ser diretamente excitados pela EMT, acredita-se que a ativação dessas células se dê de forma predominantemente indireta, mediante despolarização das ramificações axonais de interneurônios

corticais<sup>34</sup>. Embora em teoria qualquer área cortical possa ser estudada pela EMT, o córtex motor é o alvo preferencial em estudos de fisiologia devido à sua resposta objetivamente mensurável de ativação muscular<sup>51</sup>. O disparo da bobina, quando posicionada sobre M1, na dependência da intensidade do estímulo, é capaz de desencadear eventos que culminam com a despolarização do primeiro neurônio motor e ativação muscular contralateral, que pode ser estudada por meio dos PEMs<sup>52</sup>.

Ainda que a duração de cada pulso magnetoelétrico seja inferior a 1 ms, a estimulação de M1 cursa com potenciais de ação orto e antidrômicos que se propagam transsinapticamente através de circuitos neuronais localizados nessa mesma área ou mesmo em regiões corticais e subcorticais distantes da área estimulada. A partir da técnica de EMT-EEG, potenciais corticais evocados podem ser detectados mesmo após 300 ms da realização do estímulo<sup>53</sup>.

Na figura a seguir estão representados efeitos à distância, que podem ser observados após estimulação magnetoelétrica do córtex motor com um único pulso:



Figura 2. Efeitos à distância da estimulação do córtex motor

FONTE: Sudbrack-Oliveira el al. (no prelo)

#### 1.6 Excitabilidade cortical motora (ECM)

A excitabilidade de circuitos neuronais, definida como a reatividade elétrica de um grupo de neurônios após perturbação direta da sua atividade espontânea<sup>54</sup>, aferida a partir da EMT-EMG, evidencia a ocorrência de fenômenos excitatórios e inibitórios verificados a nível muscular<sup>55</sup>. A excitabilidade cortical motora (ECM) pode ser aferida com diferentes técnicas, tanto a partir da EMT de pulsos simples<sup>49</sup>, quanto por pulsos pareados<sup>49,56</sup> ou tríplices<sup>57</sup>. Pode ainda ser estudada mediante estímulos pareados aplicados em duas regiões distintas do córtex cerebral<sup>58</sup>, ou pela combinação da estimulação central e periférica<sup>59</sup>. Enquanto algumas medidas refletem combinadamente a excitabilidade dos circuitos intracorticais, corticoespinhais e medulares (como a

amplitude do PEM), outras apresentam maior especificidade para avaliação de circuitos intracorticais<sup>60</sup>.

Estudos visando o entendimento da fisiologia do córtex motor com o emprego de pulsos pareados vêm sendo cada vez mais empregados, tanto em voluntários saudáveis quanto em situações patológicas<sup>37,56,61</sup>. A realização de estudos que combinaram o emprego de fármacos com ação conhecida no sistema nervoso central com medidas de ECM, permitiu o estabelecimento de modelos explicativos para os fenômenos observados, como de natureza excitatória ou inibitória<sup>62</sup>. Adicionalmente, o desenvolvimento da EMT na modalidade repetitiva (EMTr), possibilitou ainda a modificação duradoura da atividade neuronal em diferentes regiões cerebrais, com implicações tanto com finalidade de pesquisa quanto terapêutica<sup>63,64</sup>.

Além do amplitude do PEM, anteriormente discutida, outras medidas que podem ser extraídas a partir da estimulação com pulsos únicos incluem: limiar motor (LM – definido como a menor intensidade de estímulo capaz de elicitar uma contração muscular em pelo menos 50% das testagens) e o período cortical silente (PCS)<sup>65</sup>. Este último corresponde à duração da supressão da atividade muscular voluntária após a estimulação magnetoelétrica sobre M1.

No ano de 1989, Rothwell et al. realizaram um estudo engenhoso para verificar os efeitos inibitórios da EMT realizada sobre M1, levando em consideração tanto o PCS quanto o *timing* de uma contração voluntária em indivíduos treinados a realizá-la após um estímulo auditivo<sup>66</sup>. Como achado principal, os autores observaram um padrão fisiológico e esperado de contração voluntária após o estímulo magnético, porém com um atraso de até 150 ms em relação à condição basal (sem o estímulo magnético). Tanto a

presença do reflexo H mediante estimulação elétrica periférica, quanto de PEMs evocados por estímulo transcraniano elétrico durante o PCS evocado por EMT, apontaram para a preponderância de mecanismos inibitórios corticais em detrimento de inibição medular. A interpretação dos autores foi de que os motoneurônios medulares não apresentaram inibição significativa após a EMT, estando acessíveis à alça aferente do reflexo medular no período que abarca o período silente, mas talvez não estivessem acessíveis a um comando voluntário, este dependente da interação entre mecanismos excitatórios e inibitórios a nível cortical. Adicionalmente, a realização de estímulos transcranianos elétricos durante o PCS evocado por estímulo magnetoelétrico foi capaz de gerar PEMs possivelmente em decorrência de a estimulação elétrica ser capaz de despolarizar diretamente os neurônios corticoespinhais. Entretanto, outros estudos sugerem a presença de inibição medular, ainda que de menor monta em relação à inibição cortical, de modo que a porção inicial do PCS (50-75 ms) pode decorrer de inibição segmentar, enquanto o período final (de 75 ms a 300 ms) relaciona-se mais com a inibição intracortical<sup>54,67</sup>.

Quanto aos fenômenos inibitórios envolvidos na gênese do PCS, a evidência na literatura ainda é conflitante, porém admite-se que a ativação pós-sináptica de receptores GABA-B seja um mecanismo relevante<sup>62</sup>. Em um dos primeiros estudos a avaliar o PCS mediante infusão intratecal de baclofeno, um agonista seletivo destes receptores, os autores verificaram um prolongamento deste marcador em um paciente com distonia generalizada<sup>68</sup>. Adicionalmente, Stetkarova e Kofler observaram prolongamento do PCS em 10 pacientes com espasticidade decorrente de lesão medular também após a infusão de baclofeno intratecal, sem efeitos observados no período silente induzido por estimulação periférica<sup>69</sup>. Entretanto, em estudo posterior, não foram observadas alterações significativas na duração do PCS em voluntários saudáveis após a administração de baclofeno oral<sup>70</sup>. Adicionalmente, pode haver contribuição de receptores GABA-A na gênese do PCS. Kimiskidis et al. verificaram aumento significativo do PCS após administração de baixas doses de lorazepam, um modulador alostérico que potencializa a ação desses receptores. Já em doses mais elevadas, houve redução da duração deste marcador em participantes saudáveis<sup>71</sup>. Apesar de o tempo de ação dos receptores GABA-A ser da ordem de 20 ms, a existência efeitos mais duradouros após o uso drogas que potencializam a ação GABAérgica por esse receptor sugere a existência de diferentes alças de circuitaria inibitória no córtex motor primário<sup>72</sup>. Na figura a seguir, está representado um traçado com PCS:



Figura 3. Período cortical silente


Outros paradigmas de EMT foram desenvolvidos a partir da realização de pulsos pareados a intervalos curtos (entre 1 e 20 ms), que incluem fenômenos de inibição cortical (do inglês *short interval cortical inhibition* - SICI) e facilitação intracortical (do inglês *intracortical facilitation* - ICF). Maiores efeitos de excitação e inibição são observados quando o primeiro estímulo (condicionante), possui intensidade subliminar, ou seja, não é capaz de evocar uma resposta motora por si só<sup>56</sup>. Já o segundo estímulo (teste) é feito habitualmente com intensidade acima do LM, evocando, portanto, uma resposta muscular. Quando o intervalo entre os dois estímulos possui duração entre 1 e 6 ms, o segundo estímulo evoca habitualmente um PEM de menor amplitude em comparação à amplitude registrada na estimulação com o estímulo condicionado apenas, indicando inibição cortical (i.e. SICI). Por outro lado, quando o intervalo entre os estímulos possui duração entre 10 e 15 ms, é registrado habitualmente um aumento da amplitude do PEM, indicativo do fenômeno de ICF<sup>56,73</sup>.

A menores intensidades de estímulo, para intervalos entre 1 e 6 ms. a preponderância de ativação de neurônios inibitórios em detrimento dos excitatórios pode ser justificada pela morfologia mais regular das suas arborizações axonais em relação às células piramidais, o que conferiria mais susceptibilidade ao campo elétrico intracortical. Ademais, Enquanto a inibição com ISI de 1 ms pode refletir um componente de período refratário axonal, a inibição a intervalos entre 2 e 5 ms estaria associada com a inibição pós-sináptica<sup>34</sup>. Esta inibição relaciona-se com a ativação pós-sináptica de receptores GABA-A, enquanto a ICF está principalmente relacionada à atividade glutamatérgica mediada por receptores NMDA, segundo evidências

também obtidas mediante estudos com manipulação farmacológica<sup>54,74</sup>. A seguir está representado um traçado com SICI:



Figura 4. SICI com intervalo de 2 ms entre os pulsos pareados

Eixo x: tempo (ms)

Eixo y: diferença de potencial entre eletrodo ativo e referência (mV)

\*\* verifica-se um PEM com menor amplitude em relação ao PEM basal (figura 1)

O emprego de intervalos mais longos entre os pulsos pareados, a partir de 50 ms, relaciona-se com um fenômeno inibitório tardio inicialmente descrito por Valls-Solé e colaboradores<sup>73</sup>. Tais medidas são denominadas *long interval cortical inhibition* (LICI). A avaliação deste marcador é realizada com intervalo entre os pulsos que variam entre 50 e 400 ms. Para a avaliação da LICI, mais comumente ambos os estímulos são realizados com intensidade acima do limiar motor<sup>54</sup>. Apesar de estarem associadas com a ativação pós-sináptica mediada por receptores GABA-B, são medidas complementares ao PCS, e não intercambiáveis, pois podem dissociar-se<sup>62</sup>. A seguir é possível observar um traçado representando LICI:



Figura 5. LICI com intervalo de 300 ms entre os pulsos pareados

Eixo x: tempo (ms)

Eixo y: diferença de potencial entre eletrodo ativo e referência (mV)

\*\* verifica-se um PEM com menor amplitude após o segundo pulso em relação ao primeiro

As principais medidas relacionadas à ECM e o mecanismo fisiológico correspondente mais aceito estão resumidos na Tabela 1, a seguir:

Medida	Mecanismo	↑ excitabilidade	↓ excitabilidade
LM	Potencial de membrana axonal	↓ LM	↑ LM
PEM	Potencial de membrana axonal	↑ amplitude	↓ amplitude
PCS	Receptores GABA-B	↑ duração	↓ duração
SICI	Receptores GABA-A	↓ razão (PEM teste / PEM basal)	↑ razão (PEM teste / PEM basal)
LICI	Receptores GABA-B	↓ razão (PEM teste / PEM condicionante)	↑ razão (PEM teste / PEM condicionante)
ICF	Receptores NMDA	↑ razão (PEM teste / PEM basal)	↓ razão (PEM teste / PEM basal)

**Tabela 1.** Resumo das medidas de Excitabilidade Cortical Motora (adaptado de de Bauer et al, 2014)<sup>54</sup>

ICF: intracortical facilitation LICI: long interval intracortical inhibition LM: limiar motor PCS: período cortical silente PEM: potencial evocado motor SICI: short interval intracortical inhibition

# 1.7 Estudos de série temporal com EMT-EMG em voluntários

## saudáveis

Além dos aspectos anatômicos, fisiológicos e metodológicos anteriormente apresentados, o estado de ativação cortical durante a realização da EMT-EMG é um importante fator que pode influenciar nas medidas de ECM. De maneira mais óbvia, a realização dos estímulos magnetoelétricos mediante contração muscular voluntária, em comparação à sua realização durante repouso, evidencia maior facilitação na primeira situação. Ademais, apenas o ato de imaginar um movimento, porém mantendo o músculo em repouso, é capaz também de levar a aumentos significativos da amplitude do PEM<sup>75</sup>.

Ainda no contexto de estudos de EMT-EMG que compararam avaliações seriadas e realizadas em diferentes estados de ativação cortical, evidências apontam diferenças em medidas de ECM durante sono em relação à vigília, e também entre diferentes estágios do sono. Estudos nessa linha foram realizados valendo-se tanto medidas baseadas em pulsos únicos<sup>76-78</sup> guanto pareados<sup>79,80</sup>. Avesani et al., por exemplo, observaram que o sono NREM está associado à redução da ECM, refletida no aumento dos valores de LM, redução da amplitude do PEM e aumento dos valores de SICI, com retorno aos valores observados na vigília após o despertar<sup>80</sup>. Salih et al., por sua vez, evidenciaram elevação da SICI apenas no estágio N3, fase do sono NREM na qual predominam as ondas lentas no EEG, tanto na comparação com a vigília quanto em relação aos demais estágios do sono NREM e REM. Por outro lado, o sono REM associou-se com valores de SICI similares ao estado de vigília, porém a ICF se mostrou abolida<sup>79</sup>. A interpretação desses achados deve ser cautelosa, uma vez que os referidos estudos foram realizados em condições não fisiológicas, seja em decorrência de privação de sono prévia ou durante sono diurno. Especificamente quanto aos efeitos da privação do sono sobre a ECM, os resultados até então são conflitantes, com estudos mostrando efeitos ausentes sobre essas medidas<sup>27</sup> ou redução da tanto da SICI quanto da ICF<sup>81</sup>.

Quanto aos estudos de EMT-EMG que avaliaram indivíduos em vigília por pulsos simples, Strutton e colaboradores avaliaram 6 voluntários saudáveis, em intervalos de 3h, a partir das 9h da manhã do primeiro dia até as 6h da manhã do dia subsequente. Neste trabalho, os autores não observaram mudanças significativas nos PEMs (área sob a curva) ao longo do tempo. Tampouco foram observadas diferenças em relação ao PCS, aferido mediante contração tônica da musculatura tenar da mão dominante a 10% da força máxima. Os pulsos foram realizados com bobina circular de 9 cm de diâmetro, centralizada sobre o vértex, com intensidade de estímulo que variou entre 80 e 120% do LM. Além das medidas de ECM, os autores avaliaram seriadamente também a força máxima da musculatura tenar, a qual também não evidenciou flutuações significativas ao longo do tempo. Neste estudo não houve avaliação do cronotipo ou qualquer marcador circadiano dos participantes, bem como de parâmetros relacionados ao sono. Adicionalmente, algumas medidas foram realizadas mediante privação de sono, posto que as avaliações foram intervaladas precisamente a cada 3h, inclusive ao longo da noite/madrugada, o que representa um importante fator confundidor e prejudica a interpretação dos resultados <sup>82</sup>.

Em estudo desenhado para avaliar a variabilidade diurna na capacidade de produção de torque mediante flexão plantar, Tamm e colaboradores avaliaram 18 sujeitos, sendo metade da amostra composta por indivíduos matutinos e a outra metade composta por indivíduos vespertinos. Além da medida de força dos membros inferiores, foi realizada avaliação da ECM por meio da facilitação cortical do reflexo H. Este reflexo é representado é um potencial muscular gerado após a estimulação elétrica do nervo tibial anterior. A facilitação cortical é representada pela maior amplitude do reflexo H quando o estímulo elétrico do nervo é acompanhado pelo estímulo cortical em comparação com o potencial gerado apenas mediante estimulação periférica. A intensidade do estímulo condicionante transcraniano foi de 95% do LM, com o intervalo entre os estímulos periférico e central individualizado para cada sujeito, porém mantido constante ao longo das sessões. Os pulsos magnéticos tinham morfologia bifásica e foram disparados a partir de uma bobina do tipo "figura de 8", com seu centro posicionado sobre a representação cortical da área motora da perna direita. Esta foi determinada a partir de mapeamento cortical motor em combinação com sistema de neuronavegação. Os autores não verificaram diferenças significativas no LM ao longo do tempo tanto na amostra total quanto na análise de subgrupos por cronotipo, porém evidenciaram maior facilitação cortical às 9h da manhã em comparação às 13h ou 17h, considerando a totalidade da amostra. Ademais, foi verificada uma interação entre o horário e o cronotipo, com maior facilitação cortical às 9:00h para os indivíduos matutinos e às 21:00h para os indivíduos vespertinos. Um padrão concordante em relação ao torque foi observado para o subgrupo vespertino (com maior força no período da tarde), mas não para o matutino. Uma limitação desse estudo foi a ausência de descrição da presença de indivíduos com cronotipos extremos na amostra estudada<sup>26</sup>.

Koski et al. realizaram estudo desenhado com a finalidade quantificar a variabilidade e normatizar medidas individuais de LM e PCS intra e entre sessões de EMT-EMG. As avaliações foram realizadas em 7 momentos ao longo de um intervalo de 12 h, e os autores verificaram estabilidade das medidas quando a média das amostras foi considerada. Nesse estudo, contudo, o cronotipo dos participantes não foi avaliado e a possibilidade de modulação circadiana não foi discutida<sup>83</sup>.

Estudos com avaliação seriada por EMT-EMG a pulsos pareados também são escassos. Doeltgen e Ridding não encontraram diferenças na SICI

24

ou na ICF em 10 voluntários saudáveis testados às 9h e posteriormente às 16h<sup>84</sup>. Neste trabalho, foi utilizada a bobina em "figura de 8" posicionada sobre a área motora da mão, com intensidade do pulso condicionante variando entre 70 e 90% do limiar motor ativo, e pulso teste com intensidade capaz de elicitar um PEM com 1 mV de amplitude quando empregado isoladamente. Os intervalos entre os estímulos foram de 3 ms para avaliação de SICI, e de 10 ms para avaliação de ICF. Também neste estudo a avaliação do cronotipo dos participantes não foi realizada. Em trabalho subsequente, realizado por Lang et al., foi verificada redução progressiva da inibição cortical ao longo do tempo, refletida nas medidas de PCS e LICI, ambas medidas associadas com a ativação de receptores GABA-B. Não foram encontradas diferenças significativas para o LM, amplitude do PEM ou medidas de SICI. Este trabalho contemplou uma amostra de 15 participantes, todos de cronotipo intermediário<sup>27</sup>.

#### 1.8 Justificativa e hipóteses

A avaliação da ECM por EMT-EMG pode ser realizada de forma rápida e não invasiva, trazendo informações sobre processos de neuroplasticidade e atividade cortical potencialmente associados à fisiopatologia de diferentes transtornos neuropsiquiátricos. Por exemplo, padrões específicos de ECM foram associados ao curso clínico de diferentes condições, como depressão<sup>85,86</sup>, doença de Parkinson<sup>87</sup>, doença de Alzheimer<sup>38</sup> e epilepsia<sup>88</sup>. Ainda, a expressão clínica das referidas condições é comumente flutuante e com padrões circadianos, de modo que a variação da intensidade dos sintomas

ao longo do dia está possivelmente associada às complexas interações entre o STC e o processo fisiopatológico subjacente<sup>89,90,91</sup>.

Adicionalmente, a caracterização temporal da fisiologia do córtex motor pode levar ao aprimoramento de tratamentos baseados em neuromodulação não invasiva que possuem essa região cortical como alvo preferencial, como no acidente vascular cerebral com sequelas motoras, dor neuropática e doença de Parkinson<sup>92</sup>. As aludidas terapias possuem também grande variabilidade interindividual da resposta terapêutica, que podem em parte ser explicadas pela aplicação subótima em relação ao estado cortical de cada indivíduo no momento da intervenção. Nesse contexto, para curtas escalas temporais, há evidências de que a indução de efeitos neuromodulatórios sobre o córtex motor de voluntários saudáveis depende do momento do emprego de pulsos magnetoelétricos em relação à atividade elétrica oscilatória e espontânea desta região<sup>93</sup>. A caracterização de padrões circadianos da ECM pode assim informar o desenho de futuros ensaios clínicos que, no contexto da medicina de precisão, promovam intervenções em momentos específicos do dia, individualizados para cada participante.

Em resumo, o papel modulador do STC sobre o ciclo sono-vigília<sup>11</sup>, cronotipo<sup>94</sup>, desfechos motores<sup>16</sup> e funções cognitivas<sup>95</sup> têm sido extensivamente documentados nos últimos anos. Entretanto, trabalhos que avaliaram a ECM em indivíduos saudáveis em diferentes momentos do dia são escassos e apresentam heterogeneidade com relação aos participantes e à metodologia empregada. Adicionalmente, a ausência da caracterização do cronotipo, da quantidade e qualidade do sono, bem como dos níveis de sonolência aguda foram fatores confundidores na maioria dos estudos até

26

então realizados. Assim, é possível que parte da variabilidade inter e intraindividual das medidas de ECM<sup>96</sup>, um dos fatores limitantes da sua aplicabilidade clínica, estejam associadas com o horário do dia e o STC. Em consonância com os resultados apresentados por Lang et al. <sup>27</sup>, o presente trabalho tem como foco as medidas de inibição cortical, o que também é justificado pela descrição de disfunção inibitória em diferentes estados patológicos<sup>39,97,98</sup> na comparação com amostras controle. Assim, esta pesquisa propõe investigar a associação de medidas de ECM, em voluntários saudáveis, com o horário do dia e o cronotipo. Nossas hipóteses são:

- haverá associação entre horário do dia com as medidas de PCS e LICI, com redução progressiva da inibição ao longo do período de vigília;
- o mesmo padrão será observado independente do cronotipo dos participantes, ainda possa haver uma interação entre horário e cronotipo;
- não haverá associação entre horário do dia com as medidas de LM, amplitude do PEM e SICI.

# 2 OBJETIVOS

2.1 Mensurar e descrever medidas de ECM em participantes saudáveis ao longo de um período de 24 horas;

2.2 Verificar a existência de associação entre o horário do dia e os níveis de inibição cortical, controlando pelos níveis de sonolência aguda;

2.3 Correlacionar marcadores subjetivos (cronotipo) e objetivos (DLMO e RPL)do STC;

2.4 Comparar, entre os diferentes cronotipos, o poder de ondas delta no EEG quantitativo noturno.

# 3 MÉTODOS

#### 3.1 Desenho e local do estudo

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal e prospectivo, no qual foram realizadas medidas repetidas, ao longo de 24h, de marcadores de excitabilidade cortical (ECM) por meio de estimulação magnética transcraniana (EMT) acoplada com eletromiografia (EMG), e eletroencefalograma (EEG). Todas as etapas do trabalho foram realizadas no Setor de Vídeo-Eletroencefalografia do IPq-HCFMUSP.

#### 3.2 Amostra

#### 3.2.1 Critérios de elegibilidade

Participantes saudáveis foram recrutados na comunidade acadêmica do IPq ou por divulgação em página da *internet* e redes sociais. Os critérios de elegibilidade foram: idade entre 18-55 anos; ausência de doenças neurológicas ou transtornos psiquiátricos (queixas relativas ao humor ou ao sono foram permitidas, desde que leves e sem impacto na funcionalidade diária); ensino médio completo; ausência de antecedentes de trauma cranioencefálico grave, neurocirurgia, crise epiléptica, transtornos psiquiátricos graves, gestação em curso, doenças clínicas descompensadas ou deficiência visual; sem antecedente de tabagismo ou abuso de outras drogas recreativas nos 3 meses que antecedem o estudo; ausência de dispositivos intracranianos; não ter realizado trabalho noturno ou em turnos ou viajado mais de um fuso horário no mês que antecede o estudo; não estar em uso de medicações com ação no sistema nervoso central. Todos os participantes foram incluídos no projeto após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMUSP (CAAE 23640619.8.0000.0068, parecer 3.804.516).

#### 3.2.2 Características clínicas

O cronotipo dos participantes foi definido a partir do Questionário de Matutinidade-Vespertinidade (Morningness-Eveningness Questionnaire- MEQ), no qual um escore é gerado a partir de respostas a perguntas, dentro de um paradigma psicométrico, relacionadas aos horários em que os mesmos apresentam maior disposição física e mental para a realização de suas atividades habituais, bem como horários para adormecer e despertar<sup>99,100</sup>. A partir do escore gerado, ao participante é atribuída uma dentre 5 categorias de cronotipos possíveis, indo do matutino extremo ao vespertino extremo. Também foram quantificados a qualidade do sono (Pittsburgh Sleep Quality Index - PSQI), sintomas de insônia (Insomnia Severity Index - ISI), sonolência excessiva diurna (Epworth Sleepiness Scale), sintomas depressivos e ansiosos (Beck Inventories - BDI/BAI), a partir de versões em português dos respectivos instrumentos <sup>101–105</sup>. A lateralidade manual dos voluntários foi caracterizada a partir do questionário de Edimburgo<sup>106</sup>. Todos os instrumentos foram entregues em versão impressa aos participantes no momento da internação, para que fossem preenchidos de acordo com a melhor conveniência destes. Os voluntários foram instruídos que, caso houvesse dúvidas quanto ao seu preenchimento, deixassem em branco para posterior esclarecimento.

#### 3.3 Procedimentos

Os participantes foram admitidos na unidade de vídeo-EEG entre 16 e 17h horas, recebendo alta hospitalar na manhã do terceiro dia, após aproximadamente 40 horas de internação hospitalar. O objetivo da primeira noite foi de habituação ao ambiente externo. As avaliações de ECM iniciaram-se na manhã do segundo dia, com a última avaliação na manhã do terceiro dia. A escolha entre dias de semana ou finais de semana foi determinada pela preferência dos participantes, bem como pela disponibilidade de leitos no setor. Os voluntários foram orientados a não ingerir álcool, cafeína ou outros alimentos estimulantes e a evitar realizar exercícios físicos intensos no dia da admissão e durante a internação. Foram ainda orientados quanto à importância de apresentar ao menos 3 noites sucessivas, imediatamente antes da admissão, de sono estável, com 6 a 9 horas de sono ininterrupto. Durante a internação, não foram permitidos cochilos durante o dia ou consumo de alimentos estimulantes.

#### 3.4 Medidas de Excitabilidade Cortical Motora (ECM)

A sistema EMT-EMG utilizado no estudo é composto pelo estimulador modelo Magstim 200<sup>2</sup> Bistim<sup>2</sup> (Magstim, Spring Gardens, Whitland, Reino Unido), com valor de pico de campo magnético de 1,9 Tesla, acoplado ao amplificador CED 1902, conversor analógico digital CED 1401-3 e *software* dedicado (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, Reino Unido). A máquina de EMT é um modelo que trabalha com pulsos monofásicos, numa conformação associada com recrutamento mais homogêneo de populações neuronais no córtex cerebral<sup>107</sup>. Para registro do PEM, a taxa de amostragem foi de 15 kHz, com filtragem digital na banda de frequência entre 10 e 5000 Hz. Foram utilizados eletrodos de superfície do tipo disco, com 10 mm de diâmetro, de material metálico Ag-AgCl, aderidos à pele com pasta condutora. O eletrodo de superfície ativo para registro de EMG foi posicionado sobre o músculo primeiro interósseo dorsal do membro superior contralateral ao hemisfério cerebral estimulado. O eletrodo de referência foi posicionado sobre a face medial da falange proximal do indicador ipsilateral, a 4 cm de distância do eletrodo ativo.

Durante as avaliações de ECM, os participantes permaneceram sentados em uma poltrona confortável, com encosto reclinável e apoio para os braços e pescoço. Os estímulos magnéticos foram realizados com uma bobina do tipo "figura de 8" com 70 mm de diâmetro (modelo D70<sup>2</sup> 4102-00), posicionada tangencialmente no escalpe sobre o hotspot motor, com cabo direcionado posteriormente a 45 graus da linha média. A determinação do hotspot motor e das medidas de ECM de pulso único foram realizadas de forma manual, sendo os pulsos disparados por meio de um pedal, em intervalos superiores a 5 segundos. Na seguência, para realização de pulsos pareados, a bobina foi fixada sobre o hotspot com auxílio de um braço metálico articulado, sendo o seu posicionamento verificado regularmente ao longo das avaliações tendo como referência uma marca feita no escalpo com caneta dermográfica, a fim assegurar a consistência do posicionamento nas diferentes sessões. O disparo dos pulsos pareados foi realizado de forma automática pelo software Signal, versão 7 (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, Reino Unido). Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo operador, sempre iniciando com a estimulação do hemisfério cerebral direito e subsequentemente do esquerdo. Cada avaliação de medidas de ECM durou entre 60 e 75 minutos.

As medidas a seguir foram implementadas, na sequência:

3.4.1 Limiar motor de repouso (LM)

Intensidade de estimulação capaz de elicitar PEMs com amplitude mínima de 50 μV, pelo método probabilístico de *Parameter Estimation by Sequential Testing* (PEST) e *Maximum Likelihood Regression*, com *software* dedicado <sup>65,108</sup>.

3.4.2 Amplitude do potencial evocado motor (PEM)

Aferida, em milivolts, no eixo das ordenadas, a partir do ponto mais negativo ao ponto mais positivo da onda. A intensidade do estímulo foi de 120% do LM. As médias individuais de 10 medidas foram consideradas como desfecho.

#### 3.4.3 Período cortical silente (PCS)

Duração, em milissegundos, do silêncio eletromiográfico a partir do artefato de estímulo magnético realizado com 120% da intensidade do LM. O reaparecimento da atividade muscular voluntária foi caracterizado por inspeção visual, definido como o pico da primeira onda com amplitude igual ou superior a 50  $\mu$ V. O estímulo foi realizado durante contração tônica voluntária com 40% da força máxima, determinada por um dinamômetro analógico. As médias individuais de 10 medidas foram consideradas como desfecho. Todos os testes

para identificação do PCS foram associados com um PEM correspondente no qual a amplitude também foi aferida.

3.4.4 SICI (pulsos pareados a 2 e 5 ms)

Aplicação inicial de estímulo condicionante com intensidade de 80% do LM, seguido por um estímulo teste com intensidade de 120% do LM. As medidas referentes a este paradigma serão representadas como uma razão entre a amplitude do PEM após estímulo teste e aquela relativa ao estímulo controle (pulso único com intensidade de 120% do limiar motor de repouso - item *b*).

3.4.5 LICI - intervalos longos (50, 100 e 150 ms) e muito longos (200, 250 e 300 ms)

Dois estímulos (condicionante e teste) com intensidade de 120% do LM foram realizados sequencialmente. Os resultados referentes a este desfecho foram representados como uma razão entre a amplitude do PEM no estímulo teste em relação àquela no estímulo condicionante que o precedeu.

Para as medidas com pulsos pareados, as séries foram disparadas em intervalos regulares de 11 ou 12 segundos, com intervalos entre os estímulos realizados aleatoriamente, até que 10 testes para cada intervalo fossem realizados (total de 80 testes, 10 por intervalo, 8 intervalos). Para as medidas de SICI, traçados com ausência de PEMs foram descartados. Para as medidas de LICI, apenas os traçados com presença de PEM após o estímulo condicionante foram considerados nas análises. Caso a presença de traçados insatisfatórios (ex. ausência de PEMs ou artefatos de contração muscular) fosse prontamente identificada, testes adicionais para aquele intervalo específico foram realizados manualmente ao término da sequência aleatória. Traçados com evidência de ativação muscular voluntária (à exceção do PCS) foram descartados.

Caso traçados insatisfatórios fossem identificados somente após as avaliações, foram considerados para análise, para cada medida de ECM, apenas aquelas variáveis que contavam com pelo menos 5 traçados de boa qualidade. Este número foi considerado pois uma metanálise evidenciou que estudos que realizaram ao menos 5 trials obtiveram maior confiabilidade nas aferições de PEMs intra- sessão<sup>109</sup>. Assim, as médias individuais obtidas a partir de traçados em número entre 5 e 10, por parâmetro de ECM, foram incluídos nas análises. Essa abordagem foi escolhida pois o número desigual de traçados não compromete a avaliação quando são consideradas as médias dos PEMs, ao contrário do que ocorreria caso fosse considerada apenas a amplitude do maior PEM entre os traçados. Ademais, o descarte de traçados para igualar o número de testes por condição reduziria o poder estatístico do estudo e poderia inflar a taxa de erros tipo 2, em consonância com os achados de Luck, referente a potenciais evocados por eventos<sup>110</sup>.

Durante o dia, cada estudo de ECM foi realizado em intervalos de 4 horas, com início às 9 horas da manhã (segundo dia de internação), até que os pacientes apresentassem sono espontâneo no seu horário habitual. Assim, os participantes foram avaliados nos seguintes horários: 9h, 13h, 17h, 21h e 9h (manhã do dia subsequente). Para controle de flutuações nos níveis de alerta durante as avaliações, a Escala de Sonolência de Stanford (ESS),<sup>111</sup> versão em

35

português, foi aplicada duas vezes, ao início e ao término de cada avaliação de ECM .

#### 3.5 Eletroencefalograma (EEG)

Durante toda a internação (à exceção dos momentos em que foram realizados estudos com EMT-EMG), o EEG foi registrado continuamente. Os eletrodos foram posicionados de acordo com o Sistema Internacional 10-20, aderidos ao escalpo com pasta condutora e posteriormente fixados com bandagens, conforme a rotina habitual de serviços que realizam monitorização prolongada (>12h). A taxa de amostragem foi de 250 Hz, com banda de filtro entre 0,5 e 70 Hz (Nihon Kohden, Tóquio, Japão).

O tempo total de sono ao longo da primeira e segunda noites será quantificado como o tempo total a partir do início do sono até o despertar final, descontando o tempo dos despertares noturnos. Com a finalidade de caracterizar a pressão de sono (processo S), o EEG quantitativo noturno será decomposto em diferentes bandas de frequência a partir da transformada rápida de Fourier, realizada em épocas de 5 segundos de duração, a partir de derivações frontocentrais, com referência promediada. Serão computadas então a potência absoluta ( $\mu$ V<sup>2</sup>) e relativa da atividade elétrica espontânea na banda delta (1-4 Hz) de frequência. A análise quantitativa será realizada apenas em épocas com ausência de artefatos, previamente identificadas mediante inspeção visual. Posteriormente, serão avaliadas possíveis diferenças no teor de ondas lentas entre a primeira e segunda noite, e também entre subgrupos de diferentes cronotipos.

#### 3.6 Melatonina salivar

Com a finalidade de obter um marcador objetivo do sistema temporizador circadiano, foram realizadas coletas seriadas de saliva, para posterior cálculo da variável dim light melatonin onset (DLMO). Para cada sujeito, foram coletadas entre 7 e 9 amostras intervaladas por 30 minutos, com início às 19h do primeiro dia, até o momento de início do sono espontâneo, verificado pelo tracado de EEG. Para essas coletas, foi realizada inspecão da cavidade oral de todos os indivíduos com a finalidade de assegurar a ausência de lesões na mucosa oral que possam comprometer a mensuração das concentrações de melatonina. Todas as coletas foram realizadas com tubos Salivette® (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) em condições de baixa luminosidade (<10 lux), garantidos a partir do uso de um luxímetro. Ademais, óculos com filtro de luz azul foram fornecidos aos voluntários, para que fossem usados durante a noite, e o uso de aparelhos eletrônicos e televisão foi limitado. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em geladeira com temperatura controlada (entre 2 e 4º C). Subsequentemente, passadas entre 12 e 36 horas, as amostras foram centrifugadas e armazenadas em temperatura de -80° C, no Laboratório de Neurociências (LIM-27), localizado no IPq.

No momento, as amostras aguardam transporte ao Laboratório de Neurobiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Prof. Dr. José Cipolla Neto, onde serão processadas pelo método ELISA. O DLMO será estimado como o horário em que a concentração de melatonina exceder em dois desvios-padrão a média de concentração encontrada nas três primeiras amostras, para todos os participantes<sup>10</sup>. Será então verificada a presença de correlação entre cronotipo (pontuação na MEQ) e DLMO. Posteriormente, serão realizadas análises exploratórias adicionais nas quais as medidas repetidas de excitabilidade cortical serão avaliadas em função do tempo normalizado pelo DLMO de cada sujeito, com a finalidade de levar em consideração a fase individual do ciclo circadiano, eliminando assim o fator confundidor de eventuais avanço ou atraso de fase circadiana. Abordagem similar foi empregada no estudo de Hofstra e colaboradores<sup>112</sup>.

#### 3.7 Reflexo pupilar (RPL)

O RPL será aferido monocularmente pelo sistema RETiport Super Color Ganzfeld Q450SC (Roland Consult, Brandenburg, Alemanha), com diodos emissores de luz responsáveis pelo estímulo luminoso. O diâmetro pupilar será mensurado por uma câmera infravermelha integrada ao sistema, capaz de registrar imagens no escuro com alta resolução espacial e temporal, em registro contínuo (com gravação) e taxa de amostragem de 30 Hz. O protocolo a ser empregado baseia-se no estudo realizado por Park e colaboradores<sup>113</sup>.

Os sujeitos serão adaptados ao escuro (luminância < 5 lux) por 10 minutos. Ambos os olhos serão testados monocularmente em pupilas não dilatadas, cobrindo o olho não avaliado com um tapa-olho, em ordem aleatória. Após a adaptação ao escuro, um *flash* vermelho (comprimento de onda =  $638 \pm$  9 nm) de intensidade 2.4 log cd/m<sup>2</sup> será apresentado seguido por um *flash* azul (comprimento de onda =  $469 \pm 11$  nm) da mesma intensidade, após um

38

intervalo de 2 minutos. Os registros da resposta pupilar serão analisados usando o diâmetro médio da pupila durante 3 s antes do início do *flash* como um valor de linha de base. A amplitude de pico (AP) será calculada como a constrição máxima da pupila e expressa em relação ao valor da linha de base (AP = diâmetro de constrição máximo / diâmetro da linha de base). A resposta sustentada (RS) será expressa como o diâmetro mediano da pupila entre 6-8 s após o início *flash*, em relação à linha de base. Posteriormente, tanto a AP quanto a RS em resposta aos estímulos na cor vermelha e azul serão comparados entre subgrupos de diferentes cronotipos, bem correlacionados com a pontuação na MEQ. A avaliação dos sujeitos será realizada no IPq pela mesma avaliadora, Dra. Kallene Vidal, oftalmologista e pós-doutoranda pelo Instituto de Psicologia da USP. Por questões logísticas da instituição e disponibilidade dos participantes, as avaliações serão realizadas no período vespertino, entre 12 e 16h.

#### 3.8 Cálculo amostral

O tamanho da amostra foi calculado a partir da ferramenta *General Linear Mixed Model Power and Sample Size* (GLIMMPSE), disponível em *glimmpse.samplesizeshop.org.* Foram consideradas médias e desvios-padrão observadas no estudo de Lang e colaboradores (Lang 2011), com medidas repetidas em 5 tempos, poder estatístico de 0,8 e alfa de 0,05. O tamanho calculado da amostra foi de 20 sujeitos.

#### 3.9 Análise estatística

As características clínicas e sociodemográficas foram descritas pelas médias e desvio-padrão para variáveis contínuas e como frequência ou porcentagem para as variáveis categóricas. A comparação das características basais estratificada por cronotipo foi realizada por meio do Teste T para amostras independentes, no caso de variáveis com distribuição normal ou Mann-Whitney para variáveis com distribuição não normal, no caso de variáveis contínuas (bicaudal). A distribuição dos dados foi avaliada a partir da inspeção do histograma e por meio do teste de Shapiro-Wilk. No caso de comparações entre variáveis categóricas, o teste qui-quadrado foi empregado.

Para a avaliação dos desfechos de ECM foram utilizadas variações de modelos de efeitos lineares mistos. Tal abordagem é justificada pois apresenta a vantagem de lidar com a variabilidade sistemática e heterogeneidade de medidas de excitabilidade interindividual entre sujeitos, que foram incluídos em todos os modelos como efeitos aleatórios. Ademais, tais modelos admitem a inclusão de variáveis preditoras contínuas e categóricas, além de apresentar robustez para dados ausentes e também na análise de medidas repetidas<sup>114</sup>.

Considerando os desfechos de limiar motor de repouso (LM), amplitude do potencial evocado motor (PEM) após pulsos únicos, período cortical silente (PCS), inibição a intervalos curtos (SICI a 2 e 5 ms) e inibição a intervalos muito longos (LICI a 200-300 ms), cada variável dependente foi testada em um modelo separado. No caso de resíduos com distribuição não normal, verificada por gráficos Q-Q e teste de Shapiro-Wilk, uma transformação logarítmica foi aplicada. Especificamente para o teste de hipóteses considerando intervalos longos (LICI a 50-150 ms), devido à presença de dados com significativo número de zeros, foi utilizado um modelo linear misto generalizado com especificação de distribuição do tipo *Tweedie*, com *link* para transformação logarítmica. Tal abordagem se mostrou mais apropriada para avaliação de dados com distribuição semicontínua em comparação a outros modelos<sup>115</sup>.

Para cada modelo, além do tempo, foram incluídas como variáveis preditoras a interação do horário (variável contínua ou fator com 5 níveis: 9h, 13h, 17h, 21h e 9h da manhã do dia subsequente) com o cronotipo (3 níveis: intermediário, matutino e vespertino). Para os desfechos associados aos pulsos pareados, o intervalo entre os estímulos foi incluído no termo de interação, com 2 níveis para intervalos curtos (2 e 5 ms), 3 níveis para intervalos longos (50, 100 e 150 ms) e 3 níveis para intervalos muito longos (200, 250 e 300 ms). Para o modelo do PCS, a amplitude do PEM subsequente ao mesmo estímulo que gerou a inibição foi incluída como covariável, posto que representa um fenômeno excitatório potencialmente confundidor<sup>67</sup>. Adicionalmente, para todos os modelos, os níveis agudos de vigilância aferidos pela ESS foram incluídos como covariáveis.

Ademais, com a finalidade de acomodar eventuais efeitos não lineares, foram rodados dois modelos separados para cada desfecho, um na ausência e outro com a presença de um preditor quadrático do tempo. Na sequência, os esses modelos foram comparados e apenas aquele com melhor ajuste a partir de avaliação pelo AIC (*Akaike Information Criterion*) foi posteriormente explorado. Em caso de verificação de associações entre o desfecho e as variáveis preditoras, análises *post hoc* pareadas foram realizadas para verificar os contrastes e as respectivas diferenças. Um *p* valor <0.05 foi considerado significativo para todas as análises, não sendo realizada correção para múltiplas comparações em virtude da natureza exploratória do estudo.

A análise estatística foi realizada por meio do software R versão 4.1.0 [R Core Team (2020). R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria], com os pacotes *Imer4* (modelos lineares mistos), *glmmTMB* (modelos generalizados *tweedie*), *ImerTest* (resultados e comparação entre modelos) e *emmeans* (análises *post hoc*).

# **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Participantes

Ao todo, 49 voluntários demonstraram interesse inicial em participar da pesquisa. Desses, 13 foram excluídos por não preencherem critérios de elegibilidade na avaliação de triagem ou por posterior desistência. Um participante adicional foi excluído por apresentar episódio de elevação súbita da pressão arterial sistêmica já durante o estudo, inviabilizando a realização de duas sessões de EMT-EMG. Tratava-se de paciente sabidamente hipertenso, em tratamento farmacológico e compensado clinicamente no momento da admissão. Este recebeu os cuidados iniciais na nossa instituição e não apresentou complicações, sendo encaminhado para reavaliação clínica e seguimento ambulatorial. Nenhum dos demais participantes apresentou efeitos adversos ao longo do estudo.

Após demonstrar interesse na pesquisa, os voluntários foram triados sequencialmente por ligação telefônica, videochamada, ou eventualmente de forma presencial. O agendamento das avaliações ocorreu de acordo com a melhor conveniência dos participantes e também com a disponibilidade de leitos na Unidade de Vídeo-EEG. O estudo foi interrompido assim que foi alcançado o tamanho amostral inicialmente estimado. Assim, um total de 20 participantes saudáveis realizaram o estudo, com média de idade de 29,9 anos (desvio padrão [DP] = 7,8), sendo 65% mulheres (13/20) e 90% (18/20) destros. Todos os participantes possuem escolaridade superior completa ou incompleta.

Quanto à avaliação de cronotipos pela escala MEQ, nenhum voluntário foi categorizado nos extremos de matutinidade e vespertinidade. Assim, 35% (7/20) foram classificados como intermediários, 35% (7/20) como matutinos moderados e 30% (6/20) como vespertinos moderados. Os não intermediários serão doravante denominados apenas como matutinos ou vespertinos, com supressão do sufixo "moderado". As características clínicas e demográficas dos sujeitos estão dispostas na Tabela 2. Quanto às características basais, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos estratificados por cronotipo (Tabela 3).

Variável	<i>n</i> = 20
Idade (média/DP), anos	29,9 (7,8)
Gênero (F/M)	13/20 (65%)
Lateralidade manual	
direita	18 (90%)
esquerda	2 (10%)
Cronotipo	
intermediário	7 (35%)
matutino	7 (35%)
vespertino	6 (30%)
Tempo de sono (Minutos; M ± DP)	443.02 ± 48.3
Qualidade de sono - Pittsburgh (M ± DP)	6.05 ± 2.87
Sintomas de insônia - ISI (M±DP)	8.10 ± 5.26
Sintomas de depressão -BDI (Md. IIQ)	4.50 [2.00: 9.25]
Sintomas de ansiedade - BAI (Md. IIQ)	5.00 [2.00: 8.00]

BAI: Beck anxiety inventory BDI: Beck depression inventory DP: desvio-padrão IIQ: intervalo interquartílico ISI: Insomnia severity index M: média Md: mediana

2					
	Cronotipo				
Características	Intermediário (n=7)	Matutino (n=7)	Vespertino (n=6)	p	
Sexo Femino (%)	5 (71.4%)	4 (57.1%)	4 (66.7%)	0.85	
Idade (anos M±SD)	31.71 ± 7.61	27.14 ± 7.01	31.00 ± 9.12	0.52	
Pittsburgh (M±SD)	6.00 ± 2.08	4.86 ± 3.13	7.50 ± 3.15	0.26	
Duração do sono(minutos;M±SD)	430.67 ± 49.21	432.45 ± 52.02	469.78 ± 38.51	0.28	
ISI (M±SD)	7.86 ± 3.98	5.43 ± 5.38	11.50 ± 5.24	0.11	
EPW (M±SD)	8.00 ± 5.07	5.57 ± 3.51	9.00 ± 6.48	0.46	
BDI (Md IQR)	6.00 [4.00:9.50]	2.00 [1.50:4.50]	4.50 [4.00:14.75]	0.18	
BAI (Md IQR)	5.00 [1.00:6.00]	3.00 [2.50:8.00]	6.50 [6.00:11.50	0.252	

Tabela 3. Características clínicas e demográficas, por cronotipo

BAI: Beck anxiety inventory BDI: Beck depression inventory DP: desvio-padrão IIQ: intervalo interquartílico ISI: Insomnia severity index M: média Md: mediana

# 4.2 Excitabilidade cortical motora (ECM)

4.2.1 Limiar motor de repouso (LM)

Para análise desse desfecho, o modelo linear misto evidenciou distribuição normal dos resíduos, portanto os dados originais da variável resposta foram analisados sem necessidade de transformação. A medida mostrou-se estável ao longo do tempo, sem diferenças significativas observadas em relação aos preditores de interação entre horário do dia e cronotipo. Entretanto, observamos um efeito associado ao preditor de lateralidade, com menores valores de LM (indicando maior excitabilidade por

essa medida) no lado esquerdo em comparação ao direito (Estimativa = 3,38; IC 95%: 1,88 - 4,88; p < 0,001). A partir da observação dessas diferenças, modelos adicionais foram testados, adicionando o preditor de lateralidade à interação horário X cronotipo. Também foram realizados dois modelos adicionais, em análise separada do LM nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo. Em ambas as situações, não houve associação significativa do desfecho com quaisquer das variáveis preditoras. Na Figura 6 podem ser observadas as estimativas do modelo para a totalidade dos participantes, enquanto na Figura 7 são observados os valores individuais de LM (média bilateral) por cronotipo. Na Figura 8 é possível observar que a média do LM foi superior no hemisfério cerebral direito em todas as avaliações.





MSO: *maximum stimulator output* RMT: *resting motor threshold* 



**Figura 7.** Limiar repouso por indivíduo e cronotipo em função do tempo, com curvas de regressão local (LOESS)

MSO: *maximum stimulator output* RMT: *resting motor threshold* 



Figura 8. LM (média ± DP) por hemisfério cerebral, ao longo do tempo.

MSO: *maximum stimulator output* RMT: *resting motor threshold* 

### 4.2.2 Amplitude do potencial evocado motor (PEM)

Para essa análise dessa variável, foi realizada transformação logarítmica em virtude de distribuição não normal dos resíduos. Não foram observadas diferenças significativas do desfecho em associação com quaisquer das variáveis preditoras. Na Figura 9 estão representadas as médias bilaterais para essa medida.



**Figura 9.** Amplitude do PEM por indivíduo (média bilateral), ao longo do tempo, com curvas de regressão local (LOESS)

MEP: motor evoked potential (mV)

#### 4.2.3 Período cortical silente (PCS)

Para a análise dessa variável, foi realizada transformação logarítmica em virtude de distribuição não normal dos resíduos. Não foram observadas diferenças significativas justificadas pelo horário ou pela interação entre tempo e cronotipo. Um efeito principal da amplitude do PEM gerado durante o pulso que gerou o silêncio eletromiográfico foi evidenciado (Estimativa: 0,01 [escala log10]; IC 95% 0,016 - 0,004; p < 0,001). A adição da amplitude do PEM ao termo de interação não evidenciou associação entre o desfecho e quaisquer das variáveis preditoras em um modelo estatístico adicional. Na Figura 10, observa-se o comportamento do PCS ao longo do tempo, por cronotipo.





CSP: cortical silent period

4.2.4 Inibição por pulsos pareados, intervalos curtos (SICI - 2 e 5 ms)

Para essa análise, realizamos transformação logarítmica da variável (razão entre amplitude PEM após pulso teste pela amplitude após o pulso condicionante), pois os resíduos do modelo com os dados originais apresentaram distribuição não normal. Nas análises, foram observados efeitos significativos da interação entre tempo e cronotipo. Análise post hoc evidenciou, nos indivíduos matutinos, um incremento progressivo da inibição ao longo do tempo, com efeitos estatisticamente significativos às 17h em comparação às 9h (Razão: 1,54; IC 95%: 1,06 - 2,22; p = 0,02), às 9h da manhã do dia subsequente em comparação à manhã do primeiro dia (Razão: 1,72; IC 95%: 1,18 - 2,5 ; p = 0,004) e também em relação às 13h do dia anterior (Razão: 1,54; IC 95%: 1,06 - 2,22; p = 0,02). Observamos ainda uma tendência à maior inibição às 17h em comparação às 13h (Razão:1,37; IC 95%: 0,96 - 1,97; p = 0,08). Não foram observadas diferenças de inibição ao longo do tempo para os demais cronotipos, tampouco efeitos de interação dependentes do intervalo entre os estímulos. Na Figura 11, observa-se as estimativas do modelo por tempo e cronotipo, com intervalos de confiança de 95%.

Na comparação entre cronotipos, evidenciamos maior inibição cortical nos indivíduos matutinos em comparação com intermediários (Estimativa = -0,01 [escala logarítmica]; IC 95%: -0,001 a -0,02; p = 0,03), com tendência a maior inibição também na comparação entre matutinos e vespertinos (Estimativa = -0,01 [escala logarítmica]; IC 95%: -0,02 a -0,00004; p = 0,06).

Ademais, foi observada uma tendência à maior inibição associada com o intervalo de 2 ms em comparação a 5 ms (Estimativa = -0,274; p = 0,096). Na Figura 12 estão dispostas as estimativas para todos os preditores do modelo estatístico.



Figura 11. Estimativas (IC 95%) para SICI, por tempo e cronotipo

MEP: motor evoked potencial

# **Figura 12.** Coeficientes (IC 95%), por variável preditora. Referência: cronotipo intermediário / intervalo 5 ms



4.2.5 Inibição por pulsos pareados, intervalos longos (LICI - 50, 100 e 150 ms)

Para a análise dos intervalos longos, em virtude da presença de dados inflados de zeros, o modelo estatístico empregado foi o generalizado misto com distribuição tipo *Tweedie* para dados semicontínuos e *link* log.

Não foram observadas diferenças significativas para o efeito principal do horário do dia, tampouco para termos interação com o tempo. Entretanto, evidenciamos efeitos significativos para interação entre cronotipo e intervalo entre os estímulos.

Análise *post hoc* evidenciou maior inibição em matutinos em 150 ms em comparação a intermediários (Est: -1,44; IC 95%: -2,18 a -0,69; p < 0.001) e também com vespertinos (Est: - 1,40; IC 95%: -2,16 a -0,62; p < 0,001). O mesmo padrão foi observado para o intervalo de 100 ms, com maior inibição

em matutinos em relação a intermediários (Est: -1,45; IC 95%: -2,2 a –0,71; p < 0.001) e também em relação a vespertinos (Est: - 0,9; IC 95%: ; p = 0,02). Para 50 ms, os vespertinos apresentaram maior inibição em relação aos matutinos (Est: -0,76; IC 95%: -1,69 a -0,12; p < 0.04).

**Figura 13.** Estimativas (IC 95%) para Inibição a intervalos longos, por tempo e cronotipo (escala logarítmica)


4.2.6 Inibição por pulsos pareados, intervalos muito longos (LICI - 200, 250 e 300 ms)

Para essa análise, realizamos transformação logarítmica da variável dependente, pois os resíduos do modelo com os dados originais apresentaram distribuição não normal. Não foram observados efeitos significativos em relação ao horário, cronotipo, intervalo ou sua interação. Entretanto, evidenciamos um efeito principal para níveis agudos de sonolência (Est = 0,06; p = 0,03).



**Figura 14.** Estimativas (IC 95%) para Inibição a intervalos muito longos, por tempo e cronotipo (escala logarítmica)

## 5 DISCUSSÃO

5.1 Limiar motor (LM) e amplitude dos potenciais evocados motores (PEMs)

Corroborando as hipóteses iniciais desta pesquisa, não foram verificadas variações significativas do LM ao longo do tempo, um achado que está de acordo com demais estudos que realizaram avaliação seriada deste parâmetro em voluntários saudáveis<sup>27,84,116,117,118</sup>. No entanto, observamos médias de LM inferiores no hemisfério cerebral esquerdo em relação ao direito em todos os horários avaliados. A presença de assimetria dessa medida já foi descrita em estudos anteriores, evidenciando diferenças significativas entre os lados. Padrão similar foi constatado tanto em amostra composta primariamente por destros<sup>119</sup> quanto em amostra balanceada composta por indivíduos destros e canhotos, sugerindo não haver necessariamente uma relação com a lateralidade manual<sup>120</sup>. Entretanto, outros trabalhos não verificaram assimetrias hemisféricas do LM<sup>121–123</sup>.

Algumas explicações poderiam justificar a presença de assimetrias hemisféricas nas medidas de LM. A primeira delas, de ordem técnica, diz respeito à acurácia da localização do *hotspot* motor. A presença de área motora com maior representação cortical no lado correspondente à mão dominante, mais comumente em M1 à esquerda, já foi descrita em estudo que realizou mapeamento cortical motor com EMT<sup>124</sup>. Deste modo, a presença uma representação cortical mais extensa do lado esquerdo poderia estar relacionada com uma maior precisão na localização do *hotspot* motor deste

lado, o que por sua vez poderia levar a medidas menores de LM. O mapeamento de M1 valendo-se da EMT, particularmente em associação com sistemas de neuronavegação, possibilita o delineamento de áreas de representação cortical de diferentes músculos da mão com alta definição e resolução espacial<sup>125</sup>. Apesar de tal abordagem ser fundamental em determinados contextos, como na identificação de áreas eloquentes previamente à realização de neurocirurgias ressectivas, seu emprego na pesquisa em neurofisiologia torna-se limitado por fatores como baixa disponibilidade de equipamento específico, necessidade de capacitação, além de demandar maior tempo para realização dos testes. Desta forma, abordagens simplificadas para a identificação do ponto motor são habitualmente empregadas em pesquisas da área. Em guideline da International Federation of Clinical Neurophysiology (IFCN), por exemplo, recomenda-se o posicionamento da bobina figura de 8 em posição 5 cm lateral e 0-1 cm anterior ao vértex, em uma localização que seria equivalente ao *hotspot* motor<sup>65</sup>. Entretanto, advoga-se atualmente que a identificação do ponto motor seja feita de forma individualizada, com estímulos sucessivos em regiões adjacentes próximas ao ponto descrito por Groppa e colaboradores, sempre com intensidade de estímulo acima do LM. Assim, o hotspot correspondente ao músculo estudado é definido como o ponto onde consistemente são obtidos PEMs de maior amplitude, mantendo-se fixa a intensidade do estímulo<sup>125</sup>. Entretanto, tal abordagem permanece algo artesanal e, diferentemente do que ocorre para a mensuração do LM, não existem métodos detalhados e universalmente aceitos para a determinação deste ponto. No presente estudo, esta etapa transcorreu de maneira similar ao processo descrito por Fried e

colaboradores, de modo que o *hotspot* motor foi determinado a partir da variação sistemática de apenas um parâmetro por vez (i.e. intensidade do estímulo, localização da bobina, angulação da bobina)<sup>126</sup>. Ainda assim, tanto o número de regiões estimuladas quanto a distância entre elas até a determinação do ponto motor não foram avaliados de forma sistemática. Deste modo, a presença de mapas corticais motores assimétricos nas regiões homólogas de M1 poderia justificar a identificação de pontos motores com menor precisão no hemisfério cerebral direito, levando a valores de LM maiores em relação ao lado esquerdo.

Uma segunda explicação para a assimetria do LM seria de ordem anatômica. Eventuais assimetrias da distância entre os neurônios piramidais ativados pela EMT e a bobina, nas regiões homólogas de M1, justificariam menores valores de LM em caso de maior proximidade com o escalpo do lado esquerdo em relação ao direito. Em estudo que avaliou a associação entre a distância escalpo e M1 à direita, Stokes e colaboradores verificaram uma relação direta entre essa distância e o estímulo necessário para evocar PEMs, demonstrando que para cada milímetro de aumento na distância entre escalpo e córtex (coroa do giro precentral), uma intensidade adicional de 3% da capacidade da máquina de EMT é necessária para evocar uma resposta motora equivalente<sup>127</sup>. Entretanto, apesar da distância córtex-escalpo variar para diferentes lobos e regiões corticais<sup>128</sup>, regiões homólogas costumam estar igualmente distantes da superfície do crânio<sup>129</sup>. Por outro lado, se a ativação corticoespinhal pela EMT se dá predominantemente nas porções sulcais do córtex motor<sup>130</sup>, em detrimento das coroas dos giros, o fator anatômico poderia ainda ser relevante.

Uma terceira hipótese para assimetria seria de base verdadeiramente funcional, refletindo uma assimetria de excitabilidade entre hemisférios quando da estimulação das regiões M1 homólogas. Nesse contexto, um estudo recente mostrou assimetrias em diferentes medidas de ECM, inclusive do LM, com maior excitabilidade do lado esquerdo em amostra de indivíduos saudáveis portadores do polimorfismo do gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (brain derived neurotrophic factor - BDNF) contento os alelos Val/Val (um genótipo presente na maioria dos indivíduos caucasianos). Essas assimetrias, contudo, não foram observadas na presença do haplótipo Met, seja em hetero ou homozigose<sup>131</sup>. Nesse sentido, uma revisão sistemática recente aponta que polimorfismos do gene do BDNF podem explicar parte da variabilidade das respostas neuroplásticas de M1 induzidas por técnicas de neuromodulação não invasiva, tanto em protocolos excitatórios quanto inibitórios<sup>132</sup>. Uma hipótese instigante seria a de que a excitabilidade basal desta região seria uma etapa intermediária desse processo, com o polimorfismo Val/Val estando associado com maior facilitação cortical, em um estado cortical mais suscetível à indução de efeitos plásticos duradouros mediante protocolos de neuromodulação não invasiva.

Quanto à amplitude dos PEMs elicitados por estimulação com intensidade de 120% do LM. em consonância com as nossas hipóteses iniciais, não evidenciamos diferenças significativas ao longo do tempo. Tal achado se assemelha aos demais estudos que avaliaram essa medida de forma seriada em participantes saudáveis<sup>27,84</sup>. Chamou-nos a atenção a grande variância das amplitudes ao longo do tempo, além das diferentes trajetórias apresentadas por indivíduos de diferentes cronotipos. De forma interessante, o horário no qual os

grupos com cronotipos distintos apresentaram medidas mais próximas foi às 13h. Isto sugere a possibilidade de que a realização dessa medida, que é base para outras medidas de ECM, como inibição a intervalos curtos e facilitação cortical, possa minimizar a variância dependente de fatores circadianos caso seja realizada nesse horário.

#### 5.2 Período cortical silente (PCS)

Não foram observadas variações significativas do PCS ao longo do tempo, contrariando a hipótese inicial do estudo. Entretanto, achados similares foram observados em estudos anteriores<sup>82,116,117</sup>. Cumpre ressaltar que, nos estudos supracitados, não foi realizada a caracterização de cronotipos nas amostras incluídas, representando um fator confundidor. Já no trabalho de Lang e colaboradores, que evidenciou redução progressiva do PCS ao longo do tempo, foram excluídos os indivíduos matutinos e vespertinos, restando somente aqueles de cronotipo intermediário<sup>27</sup>. Contudo, nem mesmo o cronotipo intermediário mostrou-se associado com variações temporais significativas do PCS no presente estudo.

Há algumas possíveis explicações para estes achados. Primeiramente, a inclusão da amplitude do PEM, que representa um efeito de facilitação corticoespinhal, como covariável nos modelos estatísticos empregados, pode ter contribuído para os resultados do presente estudo. Optamos por assim fazê-lo pois, apesar de o PCS refletir parcialmente um fenômeno inibitório local, mediado predominantemente por receptores metabotrópicos GABA-B intracorticais, o estímulo eletromagnético responsável por gerar a resposta inibitória possui efeitos excitatórios quase simultâneos que se refletem na

amplitude do potencial evocado pelo mesmo estímulo que gerou o PCS. Desta forma, uma eventual redução do PCS ao longo do tempo poderia estar associada a uma redução concomitante da amplitude do PEM correspondente, de forma que o equilíbrio intracortical entre excitação e inibição fosse mantido. Concordante com esta hipótese, o modelo empregado mostrou um efeito principal da amplitude do PEM sobre o PCS, com o incremento de 1 mV no preditor estando associado a um aumento de 1 ms no desfecho. Assim, a abordagem que empregamos é justificada com o objetivo de controlar as análises para um fator confundidor relevante<sup>67</sup>.

Em segundo lugar, diferenças metodológicas podem ter contribuído para a discrepância entre os nossos resultados e aqueles obtidos por Lang e colegas. Para efeito de comparação, no estudo de Lang foram observados valores mais elevados de PCS, com média de 175 ms para avaliação matutina, de 162 ms para avaliação ao meio-dia e 158 ms para avaliação noturna<sup>27</sup>. Já no presente trabalho, as medidas de PCS, considerando a média bilateral para todos os indivíduos incluídos, foram de 119 ms para avaliação matutina, 124 ms para avaliação às 13h e 116 ms para avaliação noturna. Apesar de termos realizado as avaliações com atraso de uma hora em relação ao estudo supracitado (e uma avaliação adicional às 17h), não acreditamos que essa diferença temporal justifique por si só os achados discordantes. Quanto à metodologia empregada, ambos os estudos foram semelhantes em diversos aspectos, com uso do mesmo sistema de EMT, pulsos eletromagnéticos monofásicos, intensidade de estimulação, intensidade de contração muscular tônica (40% da força máxima no presente estudo contra 30-50% no estudo de Lang) e músculo avaliado. Entretanto, apesar de a definição de início do PCS

ter sido semelhante em ambos os estudos (i.e. a partir do artefato do estímulo magnético), o final da inibição foi definido de forma distinta. No presente estudo, o término do PCS foi caracterizado a partir da primeira deflexão com amplitude igual ou maior a 50 µV. Já no estudo de Lang, o final do PCS foi definido como o momento em que a atividade muscular voluntária após o estímulo apresentou uma amplitude média comparável àquela presente antes da realização do estímulo, sendo esta média mantida por pelo menos 5 ms. Assim, a diferença metodológica pode ter levado a uma subestimativa do PCS em pelo menos 5 ms no presente trabalho. Outra diferença importante foi a média das amplitudes do PEM mediante estimulação a 120% do LM (mesma intensidade utilizada para evocar o PCS), sendo esta com valores entre 0,8 e 0,9 mV no presente estudo e entre 1 e 1,5 mV no estudo de Lang. Assim, é provável que tenhamos gerado respostas de PEM e PCS na fase mais inicial da curva de estímulo-reposta para essas medidas. Além da possibilidade da ocorrência de efeito chão, a evocação de PCS a baixas intensidades de estímulo pode estar mais relacionada com atividade mediada por receptores GABA-A, em detrimento da inibição mediada por receptores GABA-B<sup>71</sup>.

Outra explicação para os nossos achados, também relacionada com a presença de PCS mais curto em comparação com estudos prévios, seria a presença de maior contribuição relativa da inibição por interneurônios medulares. Advoga-se que esta contribuição seja da ordem de 25%, enquanto os fenômenos estritamente corticais estariam associados com 75% da duração do PCS. Vale ressaltar que a porção segmentar é mais atuante no início do PCS (primeiros 50 ms), enquanto para períodos entre 50 e 200 ms, a inibição cortical seria mais atuante<sup>133</sup>. Deste modo, na vigência de PCS de duração

relativamente curta, a contribuição total da inibição segmentar poderia abarcar uma fração maior do PCS total, mascarando assim eventuais flutuações circadianas de origem cortical.

No estudo de Pfutze e colaboradores também foram verificados valores mais elevados de PCS em relação ao presente estudo, com média de 189 ms em avaliação matutina (entre 6 e 9h) e 178 ms em avaliação vespertina/noturna (entre 17 e 20h), sem diferenças significativas em relação ao horário<sup>117</sup>. Chama a atenção os valores elevados de PCS, uma vez que o equipamento utilizado para a estimulação foi o mesmo empregado no presente estudo. Ademais, a intensidade do estímulo no trabalho de Pfütze foi mais baixa (110% do LM) e o PCS definido como um fenômeno de mais curta duração, contabilizado a partir do início do PEM, ou seja, cerca 20 ms após o artefato de estímulo magnético, com término ao aparecimento de qualquer atividade eletromiográfica em alta ampliação. Assim, a discrepância entre valores de PCS pode estar relacionada ao método empregado na definição da força da contração muscular tônica. Esta etapa foi realizada por *feedback* audiovisual de atividade eletromiográfica no estudo de Pfütze, enquanto no presente estudo foi feito com o uso de dinamômetro analógico, com movimento de pinça.

Ademais, tanto no estudo de Lang quanto no de Pfütze, o tipo de contração muscular não foi especificado (ex. pinça ou abdução do indicador). Apesar de a evidência atual ser inconsistente quanto à possibilidade de a intensidade da contração tônica influenciar na duração do PCS<sup>67</sup>, o tipo de movimento realizado é um fator relevante. O movimento de pinça por nós empregado, é um movimento complexo que leva à ativação sinérgica de diversos músculos. Conforme evidenciado por Tinazzi e colaboradores, o

movimento sustentado de pinça levou a PCS mais curtos em comparação a movimentos isolados de abdução do indicador. A explicação para tal fenômeno seria a presença de excitação mais intensa dos neurônios corticais associada com a realização de movimentos manuais complexos, que requerem a ativação sinérgica de múltiplos músculos adjacentes. Em contrapartida, a contração isolada do primeiro interósseo dorsal, na abdução do indicador, representaria uma inibição maior pois os músculos não utilizados para a tarefa, bem como suas respectivas representações corticais, estariam inibidos<sup>134</sup>.

#### 5.3 Inibição a intervalos curtos (SICI)

Corroborando a nossa hipótese inicial, não observamos associação entre horário do dia e as referidas medidas de inibição, presumivelmente mediadas por atividade dos receptores GABA-A, considerando a totalidade da amostra. Tais achados convergem com trabalhos que evidenciaram ausência de modificação deste parâmetro ao longo do tempo em indivíduos com cronotipo intermediário<sup>27</sup> e em amostra de participantes saudáveis que não tiveram o cronotipo avaliado<sup>84</sup>. Entretanto, verificamos uma interação significativa entre horário do dia e cronotipo matutino, de modo que para este subgrupo, houve aumento progressivo da inibição ao longo do período de 24 horas, com maior inibição às 17h em comparação às 9h e tendência à maior inibição às 17 em relação às 13h. A presença de menor inibição no período matutino, para este grupo, é concordante com os achados de Salehinejad e colaboradores<sup>23</sup>. Neste estudo, foram realizadas diferentes medidas de ECM, dentre as quais inibição a intervalos curtos (2, 3 e 5 ms), com resultados mostrando menores níveis de inibição cortical no período matutino em relação ao período vespertino, em uma amostra de 16 indivíduos saudáveis classificados como matutinos moderados. Ademais, o referido estudo evidenciou um padrão oposto no subgrupo vespertino, com menor inibição no período vespertino em relação ao período matutino, um achado não verificado no presente estudo. Cumpre salientar que as avaliações matutina e vespertina/noturna, no estudo de Salehinejad, foram realizadas em dias distintos, admitindo a possibilidade da influência de ciclos multidianos (i.e. com período superior a 24h) nos desfechos aferidos.

Chamou-nos atenção a verificação de níveis maiores de inibição às 9h do dia subsequente em comparação ao período matutino do dia anterior, para o cronotipo matutino. Uma possível explicação para essa observação seria o efeito de primeira noite, descrito como um sono de qualidade e quantidade inferior ao sono habitual. Trata-se de um fenômeno multifatorial relacionado com peculiaridades inerentes ao ambiente laboratorial (ex. desconforto relacionado aos eletrodos cefálicos, restrição de movimentação pelos cabos, ansiedade). Em metanálise recente, foi verificado que o sono da primeira noite, em comparação com a segunda, apresentou maior latência, menor duração total, menor eficiência, maior tempo desperto e menor duração do estágio rapid eye movement (REM), sem efeitos significativos para o sono de ondas lentas<sup>135</sup>. Deste modo, a ocorrência de período de sono mais reparador na segunda noite poderia estar associado associado com uma maior inibição cortical na manhã do dia subsequente em comparação com o período matutino do dia anterior. Corroborando essa hipótese, a privação de sono foi associada com redução da inibição a intervalos curtos em trabalhos prévios<sup>81,136</sup>. A presença desse achado apenas em relação ao cronotipo matutino pode estar relacionada à maior susceptibilidade ao efeito de primeira noite neste grupo. É sabido que indivíduos matutinos apresentam horários para início de sono e despertar mais constantes, com pouca ou nenhuma diferença na comparação entre dias de trabalho e dias livres. Em contrapartida, indivíduos vespertinos costumam acumular débito de sono durante a semana em virtude do fenômeno de *jet lag* social<sup>15</sup>. Assim, a quebra de rotina imposta pelo ambiente laboratorial/hospitalar pode ser mais impactante para os matutinos, enquanto os indivíduos vespertinos (e eventualmente intermediários) estariam mais preparados para essa ruptura posto que estão mais habituados a variações do período de sono na rotina diária, além de apresentar maior débito de sono acumulado, com possibilidade de menor latência para o sono. Ademais, a presença de privação crônica de sono nos indivíduos vespertinos e intermediários poderia justificar nossos achados de menor inibição cortical nesses subgrupos, em comparação aos indivíduos matutinos.

Evidenciamos ainda uma tendência à maior inibição com o intervalo de 2 ms em comparação a 5 ms, o que é concordante com observação prévia de efeitos inibitórios distintos entre intervalos curtos precoces e tardios, refletindo mecanismos particulares<sup>137</sup>, possivelmente relacionados a contribuições desiguais de circuitos intracorticais reverberantes e período refratário axonal, a depender do intervalo entre os pulsos.

#### 5.4 Inibição a intervalos longos e longuíssimos (LICI)

Não foram observados efeitos temporais para os intervalos de 50, 100 e 150 ms. Entretanto, uma interação significativa entre cronotipo e intervalo foi verificada, com maior inibição em matutinos nos intervalos de 100 e 150 ms em comparação aos outros dois cronotipos. Entretanto, para o intervalo de 50 ms, o efeito inibitório foi superior nos vespertinos em comparação aos matutinos, o que sugere mecanismos de inibição distintos para este intervalo, possivelmente relacionado com mecanismos de inibição segmentar na medula espinhal<sup>70</sup>. Em estudo que avaliou a excitação medular por estímulo periférico, não foram verificadas diferenças na amplitude do reflexo H entre indivíduos com cronotipo matutino em relação aos vespertinos<sup>26</sup>. Apesar de essa observação ser aparentemente contraditória com os nossos achados para 50 ms, o estímulo cortical, ao contrário do estímulo periférico, é provavelmente um *input* suprasegmentar relevante para a modulação da excitabilidade do segundo neurônio motor, apresentando mecanismos distintos do reflexo H. Ademais, enquanto o primeiro avalia predominantemente processos inibitórios, o segundo relaciona-se mais com fenômenos facilitatórios<sup>138</sup>.

A ausência de mudanças nas medidas de inibição por intervalos longos em relação ao horário do dia contrasta o estudo de Lang e colaboradores, que evidenciou redução progressiva da inibição em participantes de cronotipo intermediário<sup>27</sup>. Aqui, as discrepâncias observadas podem também estar relacionadas ao emprego de metodologias algo distintas, mais notadamente a utilização de estímulos com intensidade de 110% do LM no trabalho supracitado, em oposição a 120% no presente estudo. Não podemos deixar de considerar ainda o tamanho da amostra. Ainda que nós tenhamos estudado 20 participantes, estes apresentaram distribuição balanceada entre os diferentes cronotipos, enquanto a amostra avaliada por Lang incluiu 15 participantes saudáveis, todos classificados como cronotipo intermediário. Desta forma, tanto o número reduzido de participantes por subgrupo, quanto a presença de trajetórias notadamente distintas dos padrões de inibição entre os cronotipos no presente estudo são fatores que contribuem para a perda de poder estatístico e inflam a probabilidade de erro do tipo 2.

Considerando intervalos longuíssimos, a partir de 200 ms, o único efeito observado foi a associação dos níveis agudos de sonolência com o desfecho. Curiosamente, maior sonolência foi associada com maiores valores de LICI e, portanto, com menores níveis de inibição. Uma possível explicação para este fenômeno seria a geração de uma espécie de startle response pelo estímulo tátil/auditivo associado ao primeiro pulso eletromagnético. Entre o primeiro e o segundo pulsos haveria tempo suficiente para que os sistemas subcorticais de ativação ascendente promovessem maior ativação cortical, de modo que, no momento do segundo pulso, uma facilitação bottom-up poderia suplantar o efeito inibitório do primeiro pulso. Tal hipótese encontra plausibilidade, uma vez a latência para potenciais auditivos corticais (que dependem de impulsos que trafegam em todos os níveis do sistema nervoso central) pode chegar a 300 ms, ou seja, dentro de uma escala temporal compatível com os intervalos entre pulsos pareados empregados no presente estudo<sup>139</sup>. Essa observação nos faz atentar para a possibilidade de o estímulo tátil e auditivo influenciar na resposta motora evocada por pulsos pareados, principalmente a intervalos longos, uma questão muito debatida em estudos que utilizam EMT-EEG,<sup>140</sup> mas pouco levada em consideração nos estudos de EMT-EMG, de forma geral.

#### 5.5 Limitações

Os métodos padrão-ouro para desmascaramento de fenômenos circadianos endógenos incluem protocolos de rotina constante ou de dessincronização forçada. Entretanto, sua longa duração, bem como complexidade e desconforto imposto aos participantes, limitam a aplicabilidade clínica<sup>141</sup>. Assim, no presente estudo, optamos por avaliar os participantes ao longo de um ciclo sono-vigília completo, precedidos por uma noite de habituação ao ambiente hospitalar. Nesse sentido, foi possível impor algum nível de controle ambiental de fatores como luminosidade, temperatura e horários das refeições, com a finalidade de limitar e padronizar a influência de fatores externos no sistema temporizador circadiano dos participantes. Por outro lado, reconhecemos que a realização do estudo em ambiente laboratorial controlado pode não refletir padrões de atividade cortical motora habitual dos indivíduos no seu dia a dia.

Outra limitação deste trabalho foi a determinação do hotspot motor sem o emprego de sistema de neuronavegação, técnica que empregaria maior acurácia conforme anteriormente discutido. espacial. 0 uso da neuronavegação possibilitaria ainda monitorar de forma mais consistente o adequado posicionamento da bobina ao longo do tempo. Nesse contexto, não podemos excluir a possibilidade de que pequenas variações no posicionamento da bobina no curso de um longo protocolo de avaliação tenham interferido nas medidas de ECM. Entretanto, tentamos limitar essa influência nos protocolos de pulsos pareados, nos quais a bobina foi sustentada pelo braço articulado, excluindo os traçados com PEMs ausentes quando da estimulação com intervalos curtos (2 e 5 ms). Quanto aos intervalos longos e longuíssimos (50 a 300 ms), foram excluídos os traçados com ausência de PEMs após o pulso condicionante, independente da resposta evocada pelo estímulo teste, partindo do pressuposto que a chance de um deslocamento da bobina em relação ao alvo é maior no intervalo entre cada série de pulsos pareados (10-11 segundos) do que na fração de segundo que separa o pulso teste do pulso condicionante.

Temos ainda de levar em conta potenciais efeitos confundidores relativos ao ambiente do estudo. Nesse sentido, embora tenhamos controlado o nível basal de atividade muscular excluindo traçados com atividade artefatual, cerca de um segundo antes do disparo dos pulsos pareados, a máquina de EMT emitia um ruído de baixa intensidade. Entretanto, este era claramente audível e capaz de alertar os participantes imediatamente antes do estímulo subsequente, potencialmente gerando um fenômeno do tipo *readiness to move*, algo já descrito em um estudo pivotal da área<sup>73</sup>. Adicionalmente, as atividades motoras não foram controladas, de modo que os participantes tinham liberdade para utilizar as mãos ao longo das 40 horas de internação. Assim, não é possível excluir os efeitos de aprendizado motor presente em voluntários que tenham realizado tarefas repetitivas (ex: *games* no celular ou *laptop*), culminando com algum grau de aprendizado motor e modificações associadas da ECM<sup>142</sup>.

#### 5.6 Considerações finais

Nosso trabalho expandiu o entendimento da influência do STC sobre a ECM. Em comparação ao estudo de Lang et al., que pioneiramente evidenciou

inibição GABAérgica distinta e dependente do horário em indivíduos de cronotipo intermediário, nós realizamos uma avaliação adicional no final do período vespertino, além de não termos limitado o cronotipo na amostra. Adicionalmente, as medidas de ECM foram realizadas bilateralmente, não evidenciando quaisquer assimetrias hemisféricas para as medidas de inibição cortical.

ECM representam processos potencialmente As medidas de biomarcadores de predição de resposta em doenças neuropsiquiátricas. Por exemplo, um ensaio clínico com pessoas deprimidas evidenciou a associação de maior inibição GABA-B no hemisfério cerebral direito, avaliada pelo PCS, a uma pior resposta clínica ao tratamento com escitalopram.<sup>85</sup> Déficits de LICI, outra medida relacionada a receptores GABA-B, foram evidenciadas para intervalos de até 300 ms em pacientes com epilepsia que não responderam ao tratamento medicamentoso<sup>88</sup>. Nesse contexto, julgamos importante a inclusão, neste estudo, dos intervalos de 250 e 300 ms, ainda não avaliados em período de 24h em trabalhos anteriores. Assim, nossos achados indicam que o cronotipo e o horário do dia são fatores relevantes que devem ser levados em estudos neurofisiológicos futuros, com importantes consideração em implicações caracterização biomarcadores para а de de doenças neuropsiquiátricas que sejam baseados em medidas de inibição cortical. Ademais, a caracterização circadiana da fisiologia do córtex motor pode levar aprimoramento de tratamentos (ex. personalização do timing da ao intervenção) baseados em neuromodulação não invasiva que possuem essa região cortical como alvo, como acidente vascular cerebral, dor crônica e epilepsia, dentre outras<sup>92</sup>. Julgamos assim que a intervenção em diferentes momentos (ex. EMTr pela manhã em indivíduos matutinos, quando a inibição cortical é menor), é uma abordagem que deve ser explorada em ensaios clínicos futuros.

Este estudo é pioneiro ainda no estudo seriado da ECM em indivíduos que vivem em regiões tropicais, sendo que a sua expressão, ainda que sob modulação do STC, pode ser distinta do que foi observado nos estudos provenientes de regiões temperadas. Nesse contexto, a influência da latitude onde vivem os indivíduos já foi observada, por exemplo, na expressão de cronotipos <sup>143</sup>. Para concluir, os resultados deste trabalho podem contribuir para estudos futuros além da esfera clínica, uma vez que o estilo de vida moderno está cada vez mais dissociado do ciclo luz-escuridão, com potenciais implicações para a saúde pública e mental, bem como para o bem-estar humano de uma maneira geral.

### 6 CONCLUSÕES

Esta tese teve como objetivo investigar a associação do horário do dia, cronotipo e interação entre eles com medidas de excitabilidade cortical motora (ECM) em voluntários saudáveis, tendo como desfecho primário aquelas mediadas por inibição cortical. Em resumo, não foram observadas variações da ECM ao longo do tempo guando consideradas medidas relacionadas à atividade de receptores GABA-B corticais (PCS e pulsos pareados a intervalos longos e longuíssimos), contrariando as nossas hipóteses iniciais. Por outro lado, verificamos uma associação entre a interação horário e cronotipo para a inibição a intervalos curtos (relacionadas à ativação do receptor GABA-A), de modo que o subgrupo de indivíduos matutinos apresentou aumento progressivo da inibição cortical ao longo do tempo. Levando em consideração que as análises realizadas foram controladas para os níveis agudos de sonolência, os resultados obtidos sugerem que as flutuações da inibição nesse grupo sejam mediadas pelo sistema temporizador circadiano. Trata-se da primeira descrição que temos conhecimento, da presença de flutuações da inibição a intervalos curtos em humanos, observadas em medidas realizadas dentro de um único período de 24 horas.

Observamos ainda uma associação entre cronotipo e intervalo de pulsos pareados, com evidência de maior inibição em indivíduos matutinos para 100 e 150 ms em comparação aos vespertinos, ao passo que esses últimos apresentaram maior inibição com o intervalo de 50 ms. Tais achados sugerem padrões específicos de inibição cortical que dependem do cronotipo e apontam para mecanismos distintos de inibição cortical a depender do intervalo empregado.

# 7 REFERÊNCIAS

- 1. Turek FW. Circadian clocks: Not your grandfather's clock. Science. 2016 Nov 25;354(6315):992–3.
- Moore RY, Speh JC. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. Neurosci Lett. 1993 Feb 5;150(1):112–6.
- Albus H, Vansteensel MJ, Michel S, Block GD, Meijer JH. A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. Curr Biol. 2005 May 24;15(10):886–93.
- Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus [Internet]. Vol. 19, Nature Reviews Neuroscience. 2018. p. 453–69. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z
- 5. Roenneberg T, Foster RG, Klerman EB. The circadian system, sleep, and the health/disease balance: a conceptual review. J Sleep Res. 2022 Jun 7;e13621.
- Contreras E, Nobleman AP, Robinson PR, Schmidt TM. Melanopsin phototransduction: beyond canonical cascades. J Exp Biol [Internet]. 2021 Dec 1;224(23). Available from: http://dx.doi.org/10.1242/jeb.226522
- van der Meijden WP, Van Someren JL, Te Lindert BHW, Bruijel J, van Oosterhout F, Coppens JE, et al. Individual Differences in Sleep Timing Relate to Melanopsin-Based Phototransduction in Healthy Adolescents and Young Adults. Sleep. 2016 Jun 1;39(6):1305–10.
- 8. Do MTH. Melanopsin and the Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: Biophysics to Behavior. Neuron. 2019 Oct 23;104(2):205–26.
- 9. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. Nature. 2005 Oct 27;437(7063):1257–63.
- 10. Benloucif S, Burgess HJ, Klerman EB, Lewy AJ, Middleton B, Murphy PJ, et al. Measuring melatonin in humans. J Clin Sleep Med. 2008 Feb 15;4(1):66–9.
- 11. Borbély AA, Daan S, Wirz-Justice A, Deboer T. The two-process model of sleep regulation: a reappraisal. J Sleep Res. 2016 Apr;25(2):131–43.
- 12. Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. Science. 1997 May 23;276(5316):1265–8.
- 13. Achermann P, Dijk DJ, Brunner DP, Borbély AA. A model of human sleep

homeostasis based on EEG slow-wave activity: quantitative comparison of data and simulations. Brain Res Bull. 1993;31(1-2):97–113.

- Finelli LA, Baumann H, Borbély AA, Achermann P. Dual electroencephalogram markers of human sleep homeostasis: correlation between theta activity in waking and slow-wave activity in sleep. Neuroscience. 2000;101(3):523–9.
- Adan A, Archer SN, Hidalgo MP, Di Milia L, Natale V, Randler C. Circadian typology: a comprehensive review. Chronobiol Int. 2012 Nov;29(9):1153–75.
- Schneider J, Fárková E, Bakštein E. Human chronotype: Comparison of questionnaires and wrist-worn actigraphy. Chronobiol Int. 2022 Feb;39(2):205–20.
- Hagenauer MH, Lee TM. The neuroendocrine control of the circadian system: adolescent chronotype. Front Neuroendocrinol. 2012 Aug;33(3):211–29.
- Taillard J, Sagaspe P, Philip P, Bioulac S. Sleep timing, chronotype and social jetlag: Impact on cognitive abilities and psychiatric disorders. Biochem Pharmacol. 2021 Sep;191:114438.
- 19. Sun SY, Chen GH. Treatment of Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders. Curr Neuropharmacol. 2022;20(6):1022–34.
- 20. al Duffy JF et. Relationship of Endogenous Circadian Melatonin and Temperature Rhythms to Self-Reported Preference for Morning Or Evening Activity in Young and Older People.
- Reiter AM, Sargent C, Roach GD. Concordance of Chronotype Categorisations Based on Dim Light Melatonin Onset, the Morningness-Eveningness Questionnaire, and the Munich Chronotype Questionnaire. Clocks Sleep. 2021 Jun 17;3(2):342–50.
- 22. Zauner J, Plischke H, Strasburger H. Spectral dependency of the human pupillary light reflex. Influences of pre-adaptation and chronotype. PLoS One. 2022 Jan 12;17(1):e0253030.
- Salehinejad MA, Wischnewski M, Ghanavati E, Mosayebi-Samani M, Kuo MF, Nitsche MA. Cognitive functions and underlying parameters of human brain physiology are associated with chronotype. Nat Commun. 2021 Aug 3;12(1):4672.
- 24. Bougard C, Davenne D. Morning/Evening differences in somatosensory inputs for postural control. Biomed Res Int. 2014 Aug 18;2014:287436.
- 25. Blautzik J, Vetter C, Peres I, Gutyrchik E, Keeser D, Berman A, et al. Classifying fMRI-derived resting-state connectivity patterns according to their daily rhythmicity. Neuroimage. 2013 May 1;71:298–306.

- Tamm AS, Lagerquist O, Ley AL, Collins DF. Chronotype influences diurnal variations in the excitability of the human motor cortex and the ability to generate torque during a maximum voluntary contraction. J Biol Rhythms. 2009 Jun;24(3):211–24.
- Lang N, Rothkegel H, Reiber H, Hasan A, Sueske E, Tergau F, et al. Circadian modulation of GABA-mediated cortical inhibition. Cereb Cortex. 2011 Oct;21(10):2299–306.
- 28. Gross CG. The discovery of motor cortex and its background. J Hist Neurosci. 2007 Jul;16(3):320–31.
- Vaalto S, Säisänen L, Könönen M, Julkunen P, Hukkanen T, Määttä S, et al. Corticospinal output and cortical excitation-inhibition balance in distal hand muscle representations in nonprimary motor area. Hum Brain Mapp. 2011 Oct;32(10):1692–703.
- Snyder PJ, Whitaker HA. Neurologic heuristics and artistic whimsy: the cerebral cartography of Wilder Penfield. J Hist Neurosci. 2013 May 16;22(3):277–91.
- 31. McColgan P, Joubert J, Tabrizi SJ, Rees G. The human motor cortex microcircuit: insights for neurodegenerative disease. Nat Rev Neurosci. 2020 Aug;21(8):401–15.
- Brodmann K. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues von Dr. K. Brodmann,.. 1909. 332 p.
- Geyer S, Ledberg A, Schleicher A, Kinomura S, Schormann T, Bürgel U, et al. Two different areas within the primary motor cortex of man. Nature. 1996 Aug 29;382(6594):805–7.
- 34. Siebner HR, Funke K, Aberra AS, Antal A, Bestmann S, Chen R, et al. Transcranial magnetic stimulation of the brain: What is stimulated? – a consensus and critical position paper. Clin Neurophysiol [Internet]. 2022 May; Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388245722002723
- 35. Chouinard PA, Paus T. The primary motor and premotor areas of the human cerebral cortex. Neuroscientist. 2006 Apr;12(2):143–52.
- 36. Fino E, Packer AM, Yuste R. The logic of inhibitory connectivity in the neocortex. Neuroscientist. 2013 Jun;19(3):228–37.
- 37. Badawy RAB, Strigaro G, Cantello R. TMS, cortical excitability and epilepsy: the clinical impact. Epilepsy Res. 2014 Feb;108(2):153–61.
- Di Lazzaro V, Bella R, Benussi A, Bologna M, Borroni B, Capone F, et al. Diagnostic contribution and therapeutic perspectives of transcranial magnetic stimulation in dementia. Clin Neurophysiol. 2021

Oct;132(10):2568–607.

- Kinjo M, Wada M, Nakajima S, Tsugawa S, Nakahara T, Blumberger DM, et al. Transcranial magnetic stimulation neurophysiology of patients with major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis. Psychol Med. 2021 Jan;51(1):1–10.
- 40. Rogasch NC, Daskalakis ZJ, Fitzgerald PB. Cortical inhibition, excitation, and connectivity in schizophrenia: a review of insights from transcranial magnetic stimulation. Schizophr Bull. 2014 May;40(3):685–96.
- 41. Motalli R, Louvel J, Tancredi V, Kurcewicz I, Wan-Chow-Wah D, Pumain R, et al. GABA(B) receptor activation promotes seizure activity in the juvenile rat hippocampus. J Neurophysiol. 1999 Aug;82(2):638–47.
- 42. Caux-Dedeystère A, Allart E, Morel P, Kreisler A, Derambure P, Devanne H. Late cortical disinhibition in focal hand dystonia. Eur J Neurosci. 2021 Jul;54(2):4712–20.
- Maquet P, Dive D, Salmon E, Sadzot B, Franco G, Poirrier R, et al. Cerebral glucose utilization during sleep-wake cycle in man determined by positron emission tomography and [18F]2-fluoro-2-deoxy-d-glucose method [Internet]. Vol. 513, Brain Research. 1990. p. 136–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(90)91099-3
- 44. Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE. Sleep state switching. Neuron. 2010 Dec 22;68(6):1023–42.
- 45. Knoflach F, Bertrand D. Pharmacological modulation of GABA receptors. Curr Opin Pharmacol. 2021 Aug;59:3–10.
- 46. Rose TR, Wickman K. Mechanisms and Regulation of Neuronal GABA Receptor-Dependent Signaling. Curr Top Behav Neurosci. 2022;52:39–79.
- 47. Hannou L, Roy PG, Ballester Roig MN, Mongrain V. Transcriptional control of synaptic components by the clock machinery. Eur J Neurosci. 2020 Jan;51(1):241–67.
- 48. Kandel ER, Jessell TM, Siegelbaum SA. Principles of Neural Science, Sixth Edition. McGraw Hill Professional; 2021. 1760 p.
- Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. NON-INVASIVE MAGNETIC STIMULATION OF HUMAN MOTOR CORTEX [Internet]. Vol. 325, The Lancet. 1985. p. 1106–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(85)92413-4
- 50. Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. Neuron. 2007 Jul 19;55(2):187–99.
- 51. de Goede AA, Ter Braack EM, van Putten MJAM. Single and paired pulse transcranial magnetic stimulation in drug naïve epilepsy. Clin Neurophysiol.

2016 Sep;127(9):3140-55.

- Rossini PM, Rossi S. Transcranial magnetic stimulation: Diagnostic, therapeutic, and research potential [Internet]. Vol. 68, Neurology. 2007. p. 484–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000250268.13789.b2
- 53. Rossini PM, Di Iorio R, Bentivoglio M, Bertini G, Ferreri F, Gerloff C, et al. Methods for analysis of brain connectivity: An IFCN-sponsored review. Clin Neurophysiol. 2019 Oct;130(10):1833–58.
- 54. Bauer PR, Kalitzin S, Zijlmans M, Sander JW, Visser GH. Cortical excitability as a potential clinical marker of epilepsy: a review of the clinical application of transcranial magnetic stimulation. Int J Neural Syst. 2014 Mar;24(2):1430001.
- 55. Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. Lancet. 1985 May 11;1(8437):1106–7.
- Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, et al. Corticocortical inhibition in human motor cortex [Internet]. Vol. 471, The Journal of Physiology. 1993. p. 501–19. Available from: http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019912
- 57. Ni Z, Müller-Dahlhaus F, Chen R, Ziemann U. Triple-pulse TMS to study interactions between neural circuits in human cortex. Brain Stimul. 2011 Oct;4(4):281–93.
- Arai N, Lu MK, Ugawa Y, Ziemann U. Effective connectivity between human supplementary motor area and primary motor cortex: a paired-coil TMS study. Exp Brain Res. 2012 Jul;220(1):79–87.
- 59. Turco CV, El-Sayes J, Savoie MJ, Fassett HJ, Locke MB, Nelson AJ. Shortand long-latency afferent inhibition; uses, mechanisms and influencing factors. Brain Stimul. 2018 Jan;11(1):59–74.
- Curra A, Modugno N, Inghilleri M, Manfredi M, Hallett M, Berardelli A. Transcranial magnetic stimulation techniques in clinical investigation [Internet]. Vol. 59, Neurology. 2002. p. 1851–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000038744.30298.d4
- Seo HY, Kim GW, Won YH, Park SH, Seo JH, Ko MH. Changes in Intracortical Excitability of Affected and Unaffected Hemispheres After Stroke Evaluated by Paired-Pulse Transcranial Magnetic Stimulation. Ann Rehabil Med. 2018 Aug;42(4):495–501.
- 62. Ziemann U. Pharmaco-transcranial magnetic stimulation studies of motor excitability. Handb Clin Neurol. 2013;116:387–97.
- 63. Kobayashi M, Pascual-Leone A. Transcranial magnetic stimulation in neurology [Internet]. Vol. 2, The Lancet Neurology. 2003. p. 145–56.

Available from: http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00321-1

- 64. Brunoni AR, Sampaio-Junior B, Moffa AH, Aparício LV, Gordon P, Klein I, et al. Noninvasive brain stimulation in psychiatric disorders: a primer. Braz J Psychiatry. 2019 Jan;41(1):70–81.
- 65. Groppa S, Oliviero A, Eisen A, Quartarone A, Cohen LG, Mall V, et al. A practical guide to diagnostic transcranial magnetic stimulation: report of an IFCN committee. Clin Neurophysiol. 2012 May;123(5):858–82.
- Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Marsden CD. Interruption of motor programmes by electrical or magnetic brain stimulation in man. Prog Brain Res. 1989;80:467–72; discussion 465–6.
- 67. Hupfeld KE, Swanson CW, Fling BW, Seidler RD. TMS-induced silent periods: A review of methods and call for consistency. J Neurosci Methods. 2020 Dec 1;346:108950.
- Siebner HR, Dressnandt J, Auer C, Conrad B. Continuous intrathecal baclofen infusions induced a marked increase of the transcranially evoked silent period in a patient with generalized dystonia [Internet]. Vol. 21, Muscle & Nerve. 1998. p. 1209–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199809)21:9<1209::aid-mus15>3. 0.co;2-m
- 69. Stetkarova I, Kofler M. Differential effect of baclofen on cortical and spinal inhibitory circuits. Clin Neurophysiol. 2013 Feb;124(2):339–45.
- McDonnell MN, Orekhov Y, Ziemann U. The role of GABA(B) receptors in intracortical inhibition in the human motor cortex. Exp Brain Res. 2006 Aug;173(1):86–93.
- Kimiskidis VK, Papagiannopoulos S, Kazis DA, Sotirakoglou K, Vasiliadis G, Zara F, et al. Lorazepam-induced effects on silent period and corticomotor excitability. Exp Brain Res. 2006 Sep;173(4):603–11.
- 72. Mohammadi B, Krampfl K, Petri S, Bogdanova D, Kossev A, Bufler J, et al. Selective and nonselective benzodiazepine agonists have different effects on motor cortex excitability. Muscle Nerve. 2006 Jun;33(6):778–84.
- Valls-Solé J, Pascual-Leone A, Wassermann EM, Hallett M. Human motor evoked responses to paired transcranial magnetic stimuli [Internet]. Vol. 85, Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section. 1992. p. 355–64. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/0168-5597(92)90048-g
- 74. Florian J, Müller-Dahlhaus M, Liu Y, Ziemann U. Inhibitory circuits and the nature of their interactions in the human motor cortex a pharmacological TMS study. J Physiol. 2008 Jan 15;586(2):495–514.
- 75. Kaneko F, Hayami T, Aoyama T, Kizuka T. Motor imagery and electrical

stimulation reproduce corticospinal excitability at levels similar to voluntary muscle contraction. J Neuroeng Rehabil. 2014 Jun 5;11:94.

- Stalder S, Rösler KM, Nirkko AC, Hess CW. Magnetic stimulation of the human brain during phasic and tonic REM sleep: recordings from distal and proximal muscles. J Sleep Res. 1995 Jun;4(2):65–70.
- Grosse P, Khatami R, Salih F, Kühn A, Meyer BU. Corticospinal excitability in human sleep as assessed by transcranial magnetic stimulation. Neurology. 2002 Dec 24;59(12):1988–91.
- Manganotti P, Fuggetta G, Fiaschi A. Changes of motor cortical excitability in human subjects from wakefulness to early stages of sleep: a combined transcranial magnetic stimulation and electroencephalographic study. Neurosci Lett. 2004 May 13;362(1):31–4.
- Salih F, Khatami R, Steinheimer S, Hummel O, Kühn A, Grosse P. Inhibitory and excitatory intracortical circuits across the human sleep-wake cycle using paired-pulse transcranial magnetic stimulation. J Physiol. 2005 Jun 1;565(Pt 2):695–701.
- Avesani M, Formaggio E, Fuggetta G, Fiaschi A, Manganotti P. Corticospinal excitability in human subjects during nonrapid eye movement sleep: single and paired-pulse transcranial magnetic stimulation study. Exp Brain Res. 2008 May;187(1):17–23.
- 81. Civardi C, Boccagni C, Vicentini R, Bolamperti L, Tarletti R, Varrasi C, et al. Cortical excitability and sleep deprivation: a transcranial magnetic stimulation study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2001 Dec;71(6):809–12.
- Strutton P, Catley M, Davey N. Stability of corticospinal excitability and grip force in intrinsic hand muscles in man over a 24-h period [Internet]. Vol. 79, Physiology & Behavior. 2003. p. 679–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9384(03)00170-7
- Koski L, Schrader LM, Wu AD, Stern JM. Normative data on changes in transcranial magnetic stimulation measures over a ten hour period. Clin Neurophysiol. 2005 Sep;116(9):2099–109.
- Doeltgen SH, Ridding MC. Behavioural exposure and sleep do not modify corticospinal and intracortical excitability in the human motor system [Internet]. Vol. 121, Clinical Neurophysiology. 2010. p. 448–52. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2009.11.085
- Brunoni AR, Moffa AH, Sampaio-Junior B, Borrione L, Moreno ML, Fernandes RA, et al. Trial of Electrical Direct-Current Therapy versus Escitalopram for Depression. N Engl J Med. 2017 Jun 29;376(26):2523–33.
- 86. Hinchman CA, Fried PJ, Jannati A, Press DZ, Pascual-Leone A, Stern AP. Corticomotor plasticity as a predictor of response to high frequency transcranial magnetic stimulation treatment for major depressive disorder. J

Affect Disord. 2022 Apr 15;303:114-22.

- 87. Filipović SR, Kačar A, Milanović S, Ljubisavljević MR. Neurophysiological predictors of response to medication in Parkinson's disease. Front Neurol. 2021 Nov 16;12:763911.
- 88. Badawy RAB, Jackson GD, Berkovic SF, Macdonell RAL. Cortical excitability and refractory epilepsy: a three-year longitudinal transcranial magnetic stimulation study. Int J Neural Syst. 2013 Feb;23(1):1250030.
- Volicer L, Harper DG, Manning BC, Goldstein R, Satlin A. Sundowning and circadian rhythms in Alzheimer's disease. Am J Psychiatry. 2001 May;158(5):704–11.
- 90. Leguia MG, Andrzejak RG, Rummel C, Fan JM, Mirro EA, Tcheng TK, et al. Seizure Cycles in Focal Epilepsy. JAMA Neurol. 2021 Apr 1;78(4):454–63.
- 91. Smagula SF, Capps CS, Krafty RT. Evaluating the timing of differences in activity related to depression symptoms across adulthood in the United States. J Affect Disord. 2021 Apr 1;284:64–8.
- Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014-2018). Clin Neurophysiol. 2020 Feb;131(2):474–528.
- Stefanou MI, Baur D, Belardinelli P, Bergmann TO, Blum C, Gordon PC, et al. Brain State-dependent Brain Stimulation with Real-time Electroencephalography-Triggered Transcranial Magnetic Stimulation. J Vis Exp [Internet]. 2019 Aug 20;(150). Available from: http://dx.doi.org/10.3791/59711
- 94. Bauducco S, Richardson C, Gradisar M. Chronotype, circadian rhythms and mood. Curr Opin Psychol. 2020 Aug;34:77–83.
- 95. Gerstner JR, Yin JCP. Circadian rhythms and memory formation. Nat Rev Neurosci. 2010 Aug;11(8):577–88.
- 96. Corp DT, Bereznicki HGK, Clark GM, Youssef GJ, Fried PJ, Jannati A, et al. Large-scale analysis of interindividual variability in single and paired-pulse TMS data. Clin Neurophysiol. 2021 Oct;132(10):2639–53.
- 97. Dutra TG, Baltar A, Monte-Silva KK. Motor cortex excitability in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): A systematic review and meta-analysis. Res Dev Disabil. 2016 Sep;56:1–9.
- 98. Cincotta M, Giovannelli F, Borgheresi A, Tramacere L, Viggiano MP, Zaccara G. A Meta-analysis of the Cortical Silent Period in Epilepsies. Brain Stimul. 2015 Jul;8(4):693–701.
- 99. Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine

morningness-eveningness in human circadian rhythms. Int J Chronobiol. 1976;4(2):97–110.

- Benedito-Silva AA, Menna-Barreto L, Marques N, Tenreiro S. A self-assessment questionnaire for the determination of morningness-eveningness types in Brazil. Prog Clin Biol Res. 1990;341B:89–98.
- 101. Reis C, Madeira SG, Lopes LV, Paiva T, Roenneberg T. Validation of the Portuguese Variant of the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ). Front Physiol. 2020 Jul 14;11:795.
- 102. Bertolazi AN, Fagondes SC, Hoff LS, Dartora EG, Miozzo IC da S, de Barba MEF, et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. Sleep Med. 2011 Jan;12(1):70–5.
- 103. Bertolazi AN, Fagondes SC, Hoff LS, Pedro VD, Menna Barreto SS, Johns MW. Portuguese-language version of the Epworth sleepiness scale: validation for use in Brazil. J Bras Pneumol. 2009 Sep;35(9):877–83.
- 104. Gomes-Oliveira MH, Gorenstein C, Lotufo Neto F, Andrade LH, Wang YP. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample. Braz J Psychiatry. 2012 Dec;34(4):389–94.
- 105. Clemente V, Gomes AA, Mendes MM, Marques D, Russo B, Serra J, et al. The European Portuguese version of the insomnia severity index (ISI): reliability, validity and diagnostic accuracy. Sleep Med. 2017 Dec;40:e67.
- 106. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. Neuropsychologia. 1971 Mar;9(1):97–113.
- Spampinato D. Dissecting two distinct interneuronal networks in M1 with transcranial magnetic stimulation. Exp Brain Res. 2020 Aug;238(7-8):1693–700.
- 108. Awiszus F. Chapter 2 TMS and threshold hunting. In: Transcranial Magnetic Stimulation and Transcranial Direct Current Stimulation, Proceedings of the 2nd International Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) and Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Symposium. Elsevier; 2003. p. 13–23. (Supplements to Clinical neurophysiology).
- 109. Cavaleri R, Schabrun SM, Chipchase LS. The number of stimuli required to reliably assess corticomotor excitability and primary motor cortical representations using transcranial magnetic stimulation (TMS): a systematic review and meta-analysis. Syst Rev. 2017 Mar 6;6(1):48.
- 110. Luck SJ. An Introduction to the Event-Related Potential Technique, second edition. MIT Press; 2014. 416 p.
- 111. Hoddes E, Zarcone V, Smythe H, Phillips R, Dement WC. Quantification

of sleepiness: a new approach. Psychophysiology. 1973 Jul;10(4):431-6.

- 112. Hofstra WA, Gordijn MCM, van der Palen J, van Regteren R, Grootemarsink BE, de Weerd AW. Timing of temporal and frontal seizures in relation to the circadian phase: a prospective pilot study. Epilepsy Res. 2011 May;94(3):158–62.
- 113. Park JC, Moura AL, Raza AS, Rhee DW, Kardon RH, Hood DC. Toward a clinical protocol for assessing rod, cone, and melanopsin contributions to the human pupil response. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Aug 22;52(9):6624–35.
- 114. Boisgontier MP, Cheval B. The anova to mixed model transition. Neurosci Biobehav Rev. 2016 Sep;68:1004–5.
- 115. Kurz CF. Tweedie distributions for fitting semicontinuous health care utilization cost data. BMC Med Res Methodol. 2017 Dec 19;17(1):171.
- 116. Puri V, Sajan PM, Chowdhury V, Chaudhry N. Cortical excitability in drug naive juvenile myoclonic epilepsy. Seizure. 2013 Oct;22(8):662–9.
- 117. Pfütze M, Reis J, Haag A, John D, Hattemer K, Oertel WH, et al. Lack of differences of motorcortical excitability in the morning as compared to the evening in juvenile myoclonic epilepsy—A study using transcranial magnetic stimulation [Internet]. Vol. 74, Epilepsy Research. 2007. p. 239–42. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.03.013
- Ter Braack EM, de Goede AA, van Putten MJAM. Resting Motor Threshold, MEP and TEP Variability During Daytime. Brain Topogr. 2019 Jan;32(1):17–27.
- 119. Chagas AP, Monteiro M, Mazer V, Baltar A, Marques D, Carneiro M, et al. Cortical excitability variability: Insights into biological and behavioral characteristics of healthy individuals. J Neurol Sci. 2018 Jul 15;390:172–7.
- Bäumer T, Dammann E, Bock F, Klöppel S, Siebner HR, Münchau A. Laterality of interhemispheric inhibition depends on handedness. Exp Brain Res. 2007 Jun;180(2):195–203.
- Daligadu J, Murphy B, Brown J, Rae B, Yielder P. TMS stimulus-response asymmetry in left- and right-handed individuals. Exp Brain Res. 2013 Feb;224(3):411–6.
- 122. De Gennaro L, Bertini M, Pauri F, Cristiani R, Curcio G, Ferrara M, et al. Callosal effects of transcranial magnetic stimulation (TMS): the influence of gender and stimulus parameters. Neurosci Res. 2004 Feb;48(2):129–37.
- 123. Cueva AS, Galhardoni R, Cury RG, Parravano DC, Correa G, Araujo H, et al. Normative data of cortical excitability measurements obtained by transcranial magnetic stimulation in healthy subjects. Neurophysiol Clin. 2016 Feb;46(1):43–51.

- 124. Triggs WJ, Subramanium B, Rossi F. Hand preference and transcranial magnetic stimulation asymmetry of cortical motor representation. Brain Res. 1999 Jul 24;835(2):324–9.
- 125. Rossini PM, Burke D, Chen R, Cohen LG, Daskalakis Z, Di Iorio R, et al. Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an I.F.C.N. Committee. Clin Neurophysiol. 2015 Jun;126(6):1071–107.
- 126. Fried PJ, Santarnecchi E, Antal A, Bartres-Faz D, Bestmann S, Carpenter LL, et al. Training in the practice of noninvasive brain stimulation: Recommendations from an IFCN committee. Clin Neurophysiol. 2021 Mar;132(3):819–37.
- 127. Stokes MG, Chambers CD, Gould IC, Henderson TR, Janko NE, Allen NB, et al. Simple metric for scaling motor threshold based on scalp-cortex distance: application to studies using transcranial magnetic stimulation. J Neurophysiol. 2005 Dec;94(6):4520–7.
- 128. Wassermann EM, Lisanby SH. Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: a review. Clin Neurophysiol. 2001 Aug;112(8):1367–77.
- 129. Okamoto M, Dan H, Sakamoto K, Takeo K, Shimizu K, Kohno S, et al. Three-dimensional probabilistic anatomical cranio-cerebral correlation via the international 10-20 system oriented for transcranial functional brain mapping. Neuroimage. 2004 Jan;21(1):99–111.
- 130. Fox PT, Narayana S, Tandon N, Sandoval H, Fox SP, Kochunov P, et al. Column-based model of electric field excitation of cerebral cortex. Hum Brain Mapp. 2004 May;22(1):1–14.
- 131. Dubbioso R, Pellegrino G, Ranieri F, Di Pino G, Capone F, Dileone M, et al. polymorphism and interhemispheric balance of motor cortex excitability: a preliminary study. J Neurophysiol. 2022 Jan 1;127(1):204–12.
- 132. Sasaki R, Kojima S, Onishi H. Do Brain-Derived Neurotrophic Factor Genetic Polymorphisms Modulate the Efficacy of Motor Cortex Plasticity Induced by Non-invasive Brain Stimulation? A Systematic Review. Front Hum Neurosci. 2021 Sep 28;15:742373.
- 133. Chen R, Lozano AM, Ashby P. Mechanism of the silent period following transcranial magnetic stimulation. Evidence from epidural recordings. Exp Brain Res. 1999 Oct;128(4):539–42.
- 134. Tinazzi M, Farina S, Tamburin S, Facchini S, Fiaschi A, Restivo D, et al. Task-dependent modulation of excitatory and inhibitory functions within the human primary motor cortex. Exp Brain Res. 2003 May;150(2):222–9.
- 135. Ding L, Chen B, Dai Y, Li Y. A meta-analysis of the first-night effect in

healthy individuals for the full age spectrum. Sleep Med. 2022 Jan;89:159–65.

- 136. Kreuzer P, Langguth B, Popp R, Raster R, Busch V, Frank E, et al. Reduced intra-cortical inhibition after sleep deprivation: a transcranial magnetic stimulation study. Neurosci Lett. 2011 Apr 15;493(3):63–6.
- Cengiz B, Murase N, Rothwell JC. Opposite effects of weak transcranial direct current stimulation on different phases of short interval intracortical inhibition (SICI). Exp Brain Res. 2013 Mar;225(3):321–31.
- 138. Lagerquist O, Zehr EP, Baldwin ERL, Klakowicz PM, Collins DF. Diurnal changes in the amplitude of the Hoffmann reflex in the human soleus but not in the flexor carpi radialis muscle. Exp Brain Res. 2006 Mar;170(1):1–6.
- 139. Joos K, Gilles A, Van de Heyning P, De Ridder D, Vanneste S. From sensation to percept: the neural signature of auditory event-related potentials. Neurosci Biobehav Rev. 2014 May;42:148–56.
- 140. Conde V, Tomasevic L, Akopian I, Stanek K, Saturnino GB, Thielscher A, et al. The non-transcranial TMS-evoked potential is an inherent source of ambiguity in TMS-EEG studies. Neuroimage. 2019 Jan 15;185:300–12.
- 141. Hofstra WA, de Weerd AW. How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature. Epilepsy Behav. 2008 Oct;13(3):438–44.
- 142. Christiansen L, Madsen MJ, Bojsen-Møller E, Thomas R, Nielsen JB, Lundbye-Jensen J. Progressive practice promotes motor learning and repeated transient increases in corticospinal excitability across multiple days. Brain Stimul. 2018 Mar;11(2):346–57.
- 143. Miguel M, Oliveira VC de, Pereira D, Pedrazzoli M. Detecting chronotype differences associated to latitude: a comparison between Horne--Östberg and Munich Chronotype questionnaires. Ann Hum Biol. 2014 Mar;41(2):105–8.