



GISELLE MACHADO MAGALHÃES MORENO

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA
SOBRE PARÂMETROS CELULARES E MOLECULARES DO CÓRTEX CEREBRAL.**

GISELLE MACHADO MAGALHÃES MORENO

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA
SOBRE PARÂMETROS CELULARES E MOLECULARES DO CÓRTEX CEREBRAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciência do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Kátia Karina do Monte Silva

Coorientadora:

Prof^a Dr^a Belmira Lara da Silveira
Andrade da Costa

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M843e Moreno, Giselle Machado Magalhães.
Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre
parâmetros celulares e moleculares do córtex cerebral / Giselle Machado
Magalhães Moreno. – Recife: O autor, 2014.
56 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Kátia Karina do Monte Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento, 2014.
Inclui referências.

1. ETCC anódica. 2. Córtex cerebral. 3. Microglia. 4. GAP-43. 5.
Astrócitos. I. Silva, Kátia Karina do Monte (Orientadora). II. Título.

612.665 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2014-114)

GISELLE MACHADO MAGALHÃES MORENO

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE
CONTÍNUA SOBRE PARÂMETROS CELULARES E MOLECULARES DO
CÓRTEX CEREBRAL.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neuropsiquiatria e Ciência do
Comportamento da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em
Neurociências.

Aprovada em: 07/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Kátia Karina do Monte Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Professor Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues (Examinador interno -
Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Professor Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Professor Dr. Ricardo Abadie Guedes (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

*“...Não ofereço a face nem um sorriso amarelo,
Dentro do meu peito uma vontade bigorna
Um desejo martelo...”*

(Lenine)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento através de seus professores, funcionários e colegas.

Ao Laboratório de Neurofisiologia-UFPE, ao Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT-UFPE) e ao Laboratório de Neuroplasticidade-UFF, que tão gentilmente me acolheram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de pesquisa.

Aos professores que me guiaram.

À família e amigos por tudo.

RESUMO

A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) consiste na aplicação de corrente direta de baixa intensidade através do crânio e tem se mostrado eficaz no tratamento de diversas desordens neurológicas e psiquiátricas. Dentre as técnicas de estimulação do sistema nervoso central a ETCC ocupa posição de destaque por ser capaz de modular a excitabilidade cortical com vantagens como: não ser invasiva, ser indolor, de baixo custo, fácil uso e fácil mascaramento na realização de estudos. No entanto, apesar de extensas pesquisas sobre os efeitos da ETCC em diversos estados patológicos, seus mecanismos básicos de ação permanecem desconhecidos. Partindo do entendimento do grande envolvimento glial e de moléculas envolvidas no crescimento axonal na dinâmica de funcionamento das sinapses e excitabilidade cortical, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da ETCC anódica sobre parâmetros celulares e moleculares relacionados à plasticidade sináptica. Foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos adultos, divididos aleatoriamente em dois grupos: (i) ETCC ativa anódica (E), e (ii) ETCC fictícia, *sham* (S). Os animais receberam ETCC anódica com intensidade de corrente igual a 400 μ A, durante 10 minutos por dia, durante cinco dias consecutivos. Após o tratamento foi feita análise imunohistoquímica para reatividade microglial (Iba1) e astrocitária (GFAP), foram investigadas possíveis alterações teciduais estruturais (HE) e degeneração neuronal (FJC), bem como quantificação da expressão da proteína associada ao crescimento axonal, GAP-43. Os ratos do grupo E apresentaram aumento de ~90% na expressão da proteína GAP-43 em homogenados de todo o córtex cerebral ($p = 0.032$) e na reatividade microglial por uma extensa área cortical em torno da região estimulada, quando comparados ao grupo S. Não foram observadas alterações anatomopatológicas no tecido nem sinais de astrogliose ou neurodegeneração no córtex cerebral dos animais que receberam ETCC. Conclui-se que os parâmetros de estimulação utilizados no presente estudo são capazes de induzir alterações moleculares e celulares no córtex cerebral de animais saudáveis, na ausência de injúria ao tecido nervoso. É possível que tais efeitos estejam envolvidos em algumas das ações da ETCC sobre a plasticidade sináptica e excitabilidade cortical.

Palavras-chaves: ETCC anódica. Córtex cerebral. Microglia. GAP-43. Astrócitos

ABSTRACT

The transcranial stimulation by direct current (tDCS) is the application of a continuous current of low intensity through the cranium and has been shown to be efficient on the treatment of many neurological and psychiatric disorders. Among the stimulation techniques of central nervous system, tDCS is able to modulate the cortical excitability with advantages such as: noninvasive, painless, easy application and cheap. However, despite the large amount of research on tDCS effects in many pathological conditions, basic mechanisms involved in such effects remains unknown. Considering the involvement of glial cells and some molecules related to axonal growth in the dynamic function of synapses and cortical excitability, this study aims to investigate transcranial stimulation's effect by anodic current on cellular and molecular parameters related to synaptic plasticity. Twenty adult male wistar rats were used, randomly divided in two groups: anodic active tDCS (E) sham tDCS (S). Animals received anodic tDCS with 400 μ A intensity, for 10 minutes for every day, five days consecutives. After the treatment, possible histopathological changes and neuronal degeneration as well as the quantification of the expression for the GAP-43 and the immunoreactivity to IBA-1 and GFAP were investigated. The rats of the E group presented increased levels of GAP-43 protein expression (~90%) and in the microglia immunoreactivity around the stimulated area and adjacent cortical areas, compared to the S group. No pathological alterations were observed on the tissue nor signals of astrogliosis or neurodegeneration in the cerebral cortex of the animals that received tDCS. In conclusion, the stimulation parameters used on this work are able to induce molecular and cellular alterations on the cortex cerebral of healthy animals, in the absence of injury to the nervous tissue. It's possible that these changes are related with some actions of the tDCS synaptic plasticity and cortical excitability.

Keywords: Anodic tDCS. Cerebral cortex. Microglia; GAP-43; Astrocytes

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC - Acidente vascular cerebral

AVE - Acidente vascular encefálico

BSA – Albumina de soro bovino

DAB - Diaminobenzidina

DAC - Depressão alastrante cortical

ECr - Estimulação cortical repetitiva

ERK- Quinase regulada por sinais extracelulares, do inglês extracellular-signal-regulated kinase

EMT - Estimulação magnética transcraniana

ETCC - Estimulação transcraniana por corrente contínua

ETCC-A - Estimulação transcraniana por corrente contínua anódica

ETCC-A/C - Estimulação transcraniana por corrente contínua anódica catódica

ETCC-C - Estimulação transcraniana por corrente contínua catódica

FBS - Soro fetal bovino

FITC - Isotiocianato de fluoresceína, do inglês fluorescein isothiocyanate

FJC – Fluoro-Jade C

GAP-43 – Proteína 43 associada ao crescimento, do inglês growth associated protein 43

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial, do inglês Glial fibrillary acidic protein

HE – Hematoxilina-eosina

IBA-1 – do inglês ionized calcium-binding adapter molecule 1

ICAM- Molécula de adesão intercelular 1, do inglês intercellular adhesion molecule 1

LTD - Depressão a longo prazo

LTP - Potenciação a longo prazo

MAP-2- Microtubulo associado a proteína 2, do inglês microtubule-associated protein2

NMDA - N-metil-D-aspartato

PEM - Potencial evocado motor

SDS - Dodecil sulfato sódio

SE - *status epilepticus*

SNC - Sistema nervoso central

PBS - Tampão fosfato-salina

TBS-T - Tampão fosfato-salina e tween

TMS - Estimulação magnética transcraniana

TNF α – Fator de necrose tumoral-alfa, do inglês Tumor necrosis factor -alpha

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Estudos que investigaram mecanismos neurofarmacológicos envolvidos com os efeitos da ETCC

Quadro 2: Quadro esquemático apresentando trabalhos relacionando ETCC e patologias em modelos animais.

Quadro 3: Identificação dos anticorpos utilizados nos procedimentos do imunoblot.

Tabela 1: Composição do gel de 8% de acrilamida utilizado no procedimento da eletroforese no Western blot.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: efeitos da estimulação por corrente direta catódica e anódica, nos disparos espontâneos de neurônios piramidais do córtex cerebral de gatos (retirado de Purpura e McMurtry, 1965).

Figura 2: Estimativa do “limiar de lesão” a partir da relação entre densidade de carga aplicada e volume de lesão induzido (figura retirada de LIEBETANZ et al, 2009)

Figura 3: Número de artigos publicados por ano sobre ETCC (dados obtidos a partir do *pubmed* em fevereiro de 2014).

Figura 4. Esquema demonstrativo dos procedimentos experimentais do estudo.

Figura 5. Esquema demonstrativo dos grupos experimentais.

Figura 6: a) *Handling* e b) *Restraint* (imagens obtidas em KEMP (2000) e SHARP E LA REGINA (1998))

Figura 7: Ilustração indicando o local de implante do eletrodo (esquerda) e fotografia mostrando o momento do implante nas coordenadas indicadas com uso do aparelho estereotático.

Figura 8: Contenção do animal durante sessão de estimulação transcraniana por corrente contínua, à esquerda o amperímetro indicando a corrente aplicada de 400 μ A.

Figura 9: Fotomicrografias de secções sagitais do córtex parietal direito coradas com Hematoxilina-eosina em região imediatamente abaixo ao ponto de implantação do tubo para estimulação, em um animal do grupo Sham (A) e do grupo submetido à ETCC-A (B). Barras de calibração equivalentes a 100 e 50 μ m nas imagens de menor e maior aumento, respectivamente.

Figura 10: Fotomicrografias de secções sagitais do córtex parietal direito processadas pela técnica do fluoro-jade C evidenciando ausência de degeneração neuronal, em um animal do grupo *sham* (A) e submetido à ETCC (B). Barras de calibração equivalentes a 100 e 50 μ m nas imagens de menor e maior aumento, respectivamente.

Figura 11: Reconstrução panorâmica de um corte sagital do córtex parietal direito imunorreagido para IBA-1, de um animal submetido à ETCC-A por 5 dias. Observar a intensa marcação de microglia estendendo-se às camadas mais profundas, principalmente na região subjacente ao local de estimulação. Barra = 0,5 mm.

Figura 12: Fotomicrografias de secções sagitais do córtex parietal direito evidenciando a distribuição da microglia imunorreativa à proteína IBA-1. A e B ilustram regiões de camadas corticais superficiais e profundas, respectivamente, de um animal do grupo submetido à ETCC. C e D ilustram camadas superficiais e profundas de um animal do grupo Sham. Barra= 50 µm.

Figura 13: Comparação do percentual de área imunorreativa à proteína IBA-1 ao longo da extensão rostro-caudal do córtex parietal, entre os hemisférios direito e esquerdo de 2 animais representativos do grupo Sham. **A** corresponde à camada mais superficial e **B** à camada adjacente e mais profunda do córtex parietal.

Figura 14: Comparação do percentual de área imunorreativa à proteína IBA-1 ao longo da extensão rostro-caudal do córtex parietal, entre os hemisférios direito e esquerdo de 4 animais do grupo estimulado. **A** corresponde a camada mais superficial e **B** a camada adjacente e mais profunda do córtex parietal.

Figura 15: Fotomicrografias de secções sagitais do córtex parietal direito evidenciando a distribuição de astrócitos imunorreativos à proteína GFAP, em um animal submetido à ETCC (A) e um animal do grupo Sham (B). Barra= 100 µm

Figura 16: Aumento na expressão da proteína GAP-43 Total nos animais estimulados (bandas da direita) em relação aos não estimulados (bandas da esquerda). Os valores obtidos foram normalizados pela expressão da ERK TOTAL. O gráfico mostra o aumento significativo observado no hemisfério direito do grupo estimulado em relação ao mesmo hemisfério do grupo Sham ($p = 0,0327$).

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC): ASPECTOS GERAIS	15
2.1.1 Histórico	15
2.1.2 Importância dos parâmetros utilizados para a ETCC	16
2.2 ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC): ASPECTOS FISIOLÓGICOS	19
2.2.1 Evidências farmacológicas da ação da ETCC	19
2.2.2 Evidências sobre ações da ETCC em modelos de experimentação animal: Uma breve revisão da literatura	22
3 HIPÓTESE DO ESTUDO.....	28
4 OBJETIVOS.....	28
4.1 OBJETIVO GERAL.....	28
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	29
5 MÉTODOS.....	29
5.1 Animais e plano experimental	29
5.2 <i>Handling e Restraint</i>	30
5.3 Pesagem dos animais	31
5.4 Procedimento cirúrgico	31
5.5 Estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC)	32
5.6 Obtenção de homogenado, preparação das amostras e <i>western blot</i>	33
5.7 Perfusão de animais e microtomia	35
5.8 Hematoxilina e Eosina	36
5.9 Imunohistoquímica	36
5.9 Fluoro-Jade C.....	37
6 RESULTADOS	37
6.1 Análise histopatológica do córtex cerebral	37

6.2 Análise da distribuição da microglia e de astrócitos	39
6.3 Expressão da proteína gap-43 em homogenados do córtex cerebral	45
7 DISCUSSÃO	45
8 CONCLUSÃO	48
9 PERSPECTIVAS	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma promissora técnica de estimulação cerebral que por décadas permaneceu esquecida foi redescoberta e desde então vem sendo largamente aplicada em estudos clínicos em humanos. A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) consiste na aplicação de corrente contínua de baixa intensidade através do crânio por meio de eletrodos de diferentes polaridades. Uma diminuição da excitabilidade cortical é observada sob o cátodo (eletrodo positivo, ETCC catódica) e um efeito inverso, um aumento da excitabilidade, é observado sob o ânodo (eletrodo positivo, ETCC anódica) (NITSCHKE & PAULUS, 2000).

A capacidade de induzir esses efeitos neuromodulatórios de funções cerebrais de modo não invasivo e indolor tem impulsionado o uso da técnica no tratamento de diversas desordens neurológicas e psiquiátricas (KENNEDY et al., 2003; WILLIAMS et al., 2009). Resultados promissores têm sido demonstrados no tratamento de pacientes vítimas de acidentes vasculares cerebrais (ELSNER et al, 2013), portadores de doença de *Parkinson* (KOCH, 2013), depressão maior (BERLIM et al, 2013), epilepsia (NITSCHKE & PAULUS, 2009), esquizofrenia (ARGAWAL et al, 2013), migrânea (MAGIS et al, 2012) e dor crônica (ANTAL & PAULUS, 2010).

Para aumentar sua aplicabilidade clínica, nos últimos anos, pesquisas envolvendo ETCC tem se destinado a testar parâmetros de estimulação (ex. duração, intensidade, número de sessões, intervalo entre as estimulações, etc) capazes de aumentar a eficácia terapêutica da técnica. Contudo, os mecanismos pelos quais a ETCC é capaz de interferir em diversas funções do sistema nervoso central (SNC) e assim repercutir na recuperação de pacientes ainda não estão elucidados.

A constatação de que esta técnica induz efeito a longo prazo na excitabilidade neuronal, observado tanto em animais (BINDMAN et al, 1962; BINDMAN et al, 1964) como em humanos (NITSCHKE & PAULUS, 2000), direcionou as investigações acerca dos mecanismos básicos de ação da ETCC para alterações moleculares e estruturais no sistema nervoso central. Estudos farmacológicos em humanos elucidaram que os efeitos imediatos e tardios da ETCC anódica eram dependentes da abertura de canais de Na^+ (LIEBETANZ et al, 2002; NITSCHKE et al, 2003) e Ca^{++} (NITSCHKE et al, 2003) e que seus efeitos tardios, bem como da ETCC catódica, estavam intimamente relacionados à atividade do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) (LIEBETANZ et al, 2002; NITSCHKE et al, 2003; NITSCHKE et al, 2004; NITSCHKE et al, 2004c). Sugere-se que tais efeitos estão relacionados com potenciação a longo prazo (LTP) e depressão a longo prazo (LTD) (NITSCHKE et al, 2008). Neste contexto, acredita-se que a ETCC é capaz de promover plasticidade sináptica (ADACHI et al, 2012). Aumento na arborização dendrídica tem sido observado em estudos com ratos tratados com corrente direta (YOON et al, 2012; JIANG et al, 2012) diante de condições isquêmicas, no entanto pouco se conhece ainda sobre os possíveis mecanismos moleculares envolvidos com tais efeitos.

Sob condições fisiológicas normais, o funcionamento da sinapse neuronal envolve a participação ativa de astrócitos e microglia, compondo uma estrutura quadripartite. Estas células são elementos ativos nos processos de plasticidade sináptica, principalmente pela sua capacidade de liberar substâncias bioativas e tróficas envolvidas com a excitabilidade e sobrevivência neuronal (DITYATEV & RUSAKOV, 2011). Diante disto torna-se necessária a investigação de mecanismos moleculares e da participação de componentes não neuronais nas alterações sinápticas provocadas pela ETCC, o que motivou o presente estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA: ASPECTOS GERAIS

2.1.2. HISTÓRICO

A estimulação elétrica do sistema nervoso central pode ser considerada um novo velho mundo que foi praticamente redescoberto nas últimas décadas e tem sido crescentemente explorado. Os registros do uso da eletricidade como recurso terapêutico são antigos, Scribomius Largus, médico romano, deixou escritos datados de 43-48 dC sobre a utilização das descargas produzidas pelo peixe-elétrico no tratamento de diversas enfermidades (UTZ et al, 2010). O século XVIII trouxe importantes descobertas neste cenário: Luigi Galvani (1737-1798) descobriu o que chamou de “eletricidade animal” a partir da estimulação elétrica de patas de rãs e , em 1800, Alessandro Volta (1745-1827) inventou a pilha elétrica. Estudos clínicos e eletrofisiológicos em humanos e animais utilizando corrente contínua se multiplicaram (PICCOLINO, 1984) e em 1804, Aldini relata ter obtido sucesso no tratamento de pacientes melancólicos utilizando estimulação por corrente contínua do SNC (GOLDENSOHN, 1997).

A eletroconvulsoterapia concentrou grande atenção de cientistas e clínicos, no entanto, com o avanço da farmacologia e o desenvolvimento dos psicofármacos, o interesse por essa modalidade de tratamento diminuiu e seu uso teve um grande declínio a partir da década de 60 (AROSA, 2005). No entanto, a última década do século XX configurou a situação ideal para o estabelecimento da técnica de estimulação elétrica cerebral como eficaz e confiável. A busca por meios não-farmacológicos capazes de modular a atividade cerebral foi um dos grandes motivos para o “resurgimento” do uso da eletricidade como terapêutica. Adicionalmente, o desenvolvimento do método científico na segunda metade do século XX originou uma série de estudos em animais sugerindo efeitos modulatórios da estimulação do SNC por corrente contínua de baixa intensidade (BINDMAN et al, 1962; CREUTZFELDT e STRUCK, 1962; ; BINDIMAN et al, 1964; PURPURA & McMURTRY, 1965). Além disso, o desenvolvimento tecnológico ofereceu a possibilidade de mensurar os efeitos dessas estimulações quando aplicadas em humanos por meio de exames de imagem como ressonância magnética funcional, tomografia computadorizada por emissão de pósitrons, eletroencefalograma e estimulação magnética transcraniana (NITSCHKE et al, 2008; PAULUS, 2011) .

A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) tem ocupado posição de destaque entre as técnicas de estimulação (elétrica e magnética) do SNC por tratar-se de uma ferramenta capaz de modular a excitabilidade cortical interferindo no potencial de membrana e nas taxas de disparos neuronais (PAULUS, 2011). Esta técnica apresenta vantagens em relação a outras por ser não invasiva, indolor, de baixo custo, fácil uso e fácil mascaramento na realização de estudos (LEFAUCHEUR, 2008).

2.1.2.IMPORTÂNCIA DOS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A ETCC

A ETCC consiste na aplicação de corrente contínua de baixa intensidade através do crânio por meio de eletrodos, normalmente posicionados no escalpo (NITSCHKE *et al.*, 2007). Apesar de haver certa variedade de montagens na colocação desses eletrodos a maioria dos estudos (em humanos e animais) utiliza a aplicação composta por um cátodo e um ânodo (UTZ *et al.*, 2010).

Ambos os eletrodos possuem efeitos neuromodulatórios. Em 1964, Purpura e McMurtry observaram os efeitos da estimulação por corrente direta, nos disparos espontâneos de neurônios piramidais do córtex cerebral de gatos. Foi verificado um aumento na taxa de disparos neuronais após uso da corrente anódica, e uma diminuição quando usada corrente catódica (Figura 1). A aplicação de ETCC anódica (eletrodo positivo) induz alterações no potencial de membrana neuronal no sentido da despolarização tendo um efeito excitatório, já a ETCC catódica (eletrodo negativo) modula a membrana neuronal no sentido de uma hiperpolarização resultando num efeito inibitório (PAULUS, 2003). Um dado interessante é que tais efeitos parecem depender ainda da localização e orientação do neurônio em relação ao eletrodo uma vez que há um fluxo de cargas devido à polaridade aplicada. Creutzfeldt e Struck (1962) demonstraram que neurônios de camadas corticais profundas do cérebro de gatos eram excitados por aplicação superficial de corrente contínua catódica e inibidos pela anódica. Tais dados sugerem que a ETCC anódica gera um acúmulo de cargas negativas na camada superficial cortical subjacente ao eletrodo que, consequentemente, dará origem a uma zona adjacente com polaridade positiva. Além disso, as correntes anódica e catódica também têm efeitos sobre neurônios inibitórios das camadas superficiais do córtex, mas os mecanismos envolvidos com tais efeitos ainda não estão esclarecidos (NITSCHKE E PAULUS, 2000)

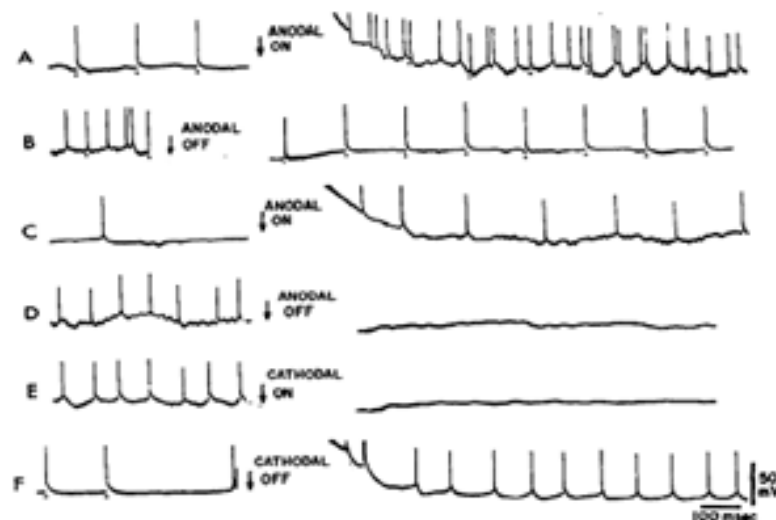


Figura 1: efeitos da estimulação por corrente direta catódica e anódica, nos disparos espontâneos de neurônios piramidais do córtex cerebral de gatos (retirado de Purpura e McMurtry, 1965).

Além da polaridade, outros parâmetros determinantes para os efeitos da ETCC são a intensidade da corrente, a duração da estimulação e o tamanho dos eletrodos. Em relação à intensidade da corrente, Nitsche e Paulus (2000) publicaram o artigo que pode ser considerado o marco da “nova era” do uso de corrente elétrica para modular o funcionamento do SNC. Neste artigo, referindo-se a ETCC, os autores colocaram a seguinte questão: *por que razão uma técnica tão simples e disponível há décadas, não foi alvo de atenção na pesquisa clínica?*, como resposta os autores argumentam que a maioria dos grupos de pesquisa aplicou baixa intensidade de corrente e por tempo insuficiente para produzir alterações na excitabilidade cortical. No estudo realizado por Priori e colaboradores (1998), utilizando uma corrente < 0.5 mA aplicada por 7s, não foi observada alteração na excitabilidade cortical quando aplicadas correntes anódica ou catódica separadamente. A maioria dos estudos clínicos atuais utiliza intensidade de corrente de 1 – 2 mA (BRUNONI et al, 2011) embora nos estudos com animais a intensidade de corrente seja mais variável, o que será descrito posteriormente no tópico **“Evidências sobre ações da ETCC em modelos de experimentação animal: Uma breve revisão da literatura”**

No que diz respeito à duração da estimulação, Bindman e colaboradores (1964) mostraram que a estimulação cortical anódica por períodos de 5 a 30 minutos resultava

em aumento da excitabilidade neuronal que se estendia por até 5 horas após o fim da estimulação. Em humanos, também foi demonstrado que os efeitos a longo prazo são dependentes da duração da estimulação: a mesma intensidade de corrente (1mA) aplicada por intervalos de tempos diferentes (5, 7, 9, 11 e 13 minutos) produziu efeitos que se prolongaram por apenas 5 minutos após o fim das sessões mais curtas de estimulação (5 e 7 minutos); por 30 minutos após 9 minutos de estimulação; e efeitos detectados 90 minutos após o fim da estimulação com duração de 13 minutos (NITSCHKE e PAULUS, 2000).

Por fim, o tamanho dos eletrodos é particularmente importante tanto para os efeitos quanto para a segurança no uso da ETCC. Estudo realizado no sentido de identificar os limites de segurança para o uso da ETCC catódica em ratos (LIEBETANZ et al, 2009) determinou um “limiar de lesão” em função da densidade de carga aplicada (Figura 2). Esta relação resalta a importância da combinação dos parâmetros da ETCC para seu uso, e não a avaliação de um deles isoladamente. A densidade de corrente (i/A) usada nos estudos com modelos animais varia entre: 1.27 a 57.14 A/m² (BRUNONI et al, 2011), consideravelmente superior àquela usada em humanos, cerca de 0,06mA/m² (LIEBETANZ et al, 2009).

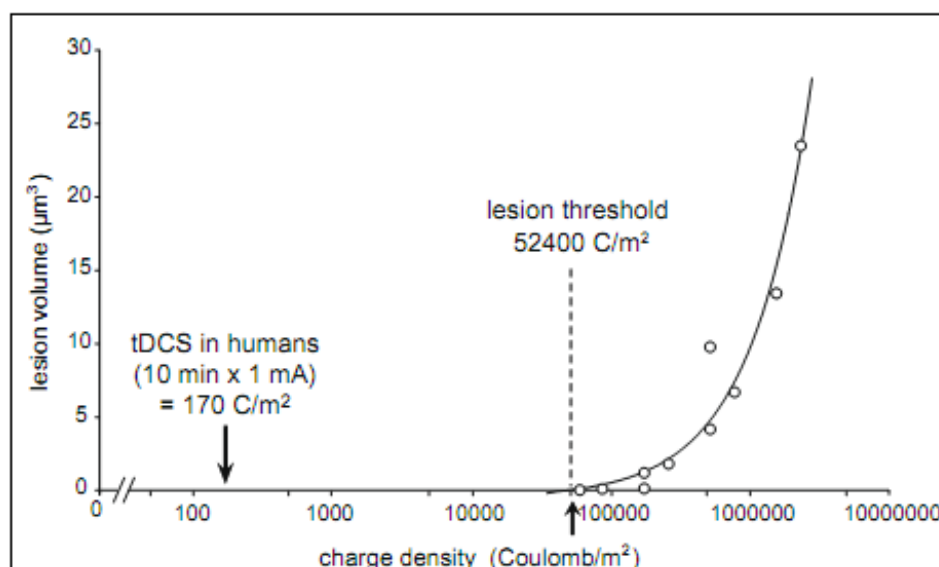


Figura 2: Estimativa do “limiar de lesão” a partir da relação entre densidade de carga aplicada e volume de lesão induzido (figura retirada de LIEBETANZ et al, 2009)

O conhecimento sobre melhores parâmetros para uso da ETCC tornou-a uma técnica que tem se mostrado eficaz no tratamento de diversas desordens neurológicas e

psiquiátricas (WILLIAMS et al., 2009) e desperta interesse crescente da comunidade científica. A figura 3 ilustra claramente esta realidade, enquanto apenas algumas dezenas de artigos científicos sobre a ETCC haviam sido publicadas até 2003, atualmente há centenas de estudos focados nessa técnica, principalmente estudos clínicos que demonstram efeitos sobre condições patológicas. No entanto, apenas um pequeno percentual destes estudos foi realizado em animais com o intuito de investigar alterações celulares e teciduais envolvidas nos efeitos observados.

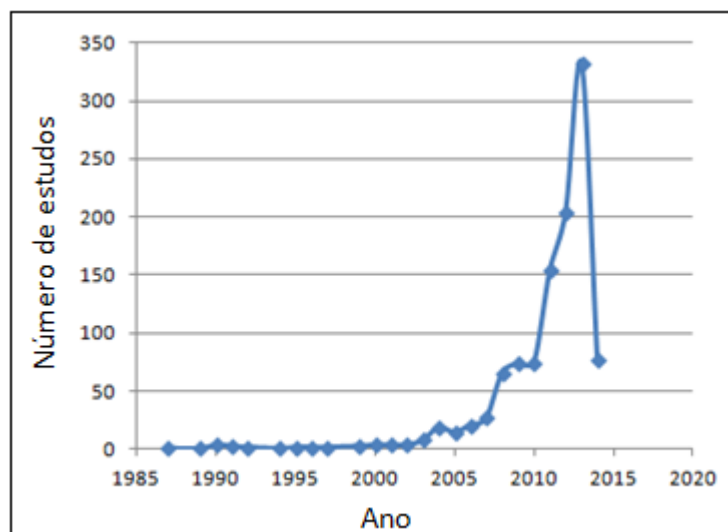


Figura 3: Número de artigos publicados por ano sobre ETCC (dados obtidos a partir do *pubmed* em fevereiro de 2014).

2.2. ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA: ASPECTOS FISIOLÓGICOS

2.2.1. EVIDÊNCIAS FARMACOLÓGICAS DA AÇÃO DA ETCC

Estudos eletrofisiológicos em animais, realizados por Bindman e colaboradores (1962) forneceram as primeiras evidências dos efeitos a longo prazo provocados por aplicação de corrente contínua no córtex cerebral de animais, bem como da natureza polaridade-dependente dos mesmos. Em 1968, Gartside e colaboradores indicaram, pelo uso de bloqueadores de síntese proteica, que o aumento da taxa de disparo após período de estimulação cortical superior a 10 minutos não ocorreria por meio de circuitos reverberantes, mas sim por mudanças na condução sináptica. Mais tarde, Nitsche e Paulus (2000) avaliaram em humanos os efeitos a longo prazo da ETCC na excitabilidade do córtex motor de voluntários saudáveis. Usando a estimulação

magnética transcraniana (EMT) observaram um aumento na amplitude do potencial evocado motor (PEM) de 150% que durou até 90 minutos após o fim de 13 minutos de ETCC. Foi sugerido que tais alterações poderiam se dever a ativação dos canais de Na^+ e Ca^{2+} pela despolarização sublimiar induzida pela corrente anódica.

Tal suposição deu origem a uma série de estudos neurofarmacológicos desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisadores, utilizando diferentes drogas de ação central com o intuito de verificar a ação das mesmas sobre os efeitos da ETCC. Todos os estudos foram realizados em humanos e as medidas de excitabilidade cortical antes e após as intervenções se basearam no PEM obtidos pela EMT e estão listados no Quadro 1.

Quadro 1: Estudos que investigaram mecanismos neurofarmacológicos envolvidos com os efeitos da ETCC

Autores	Drogas utilizadas	Ação das drogas	Impacto da droga nos efeitos da ETCC
Liebetanz, Nitsche et al, 2002	Carbamazepina Dextrometorfano	- bloqueador de canal de Na^+ - Antagonista NMDA	- suprime o aumento da excitabilidade pela ETCC-A -suprime efeitos a longo prazo das ETCC-A/C
Nitsche, Fricke et al, 2003	Carbamazepina (1) Flunazirina (2) Dextrometorfano (3)	1) bloqueador de canal de Na^+ 2) bloqueador de canal de Ca^{2+} 3) Antagonista NMDA	1 e 2) suprimem o aumento da excitabilidade pela ETCC-A 3) suprime os efeitos a longo prazo das ETCC-A/C
Nitsche, Jaussi et al, 2004	D-cicloserina	Agonista parcial de NMDA	Potencializou duração do aumento da excitabilidade induzido por ETCC-A
Nitsche, Liebetanz et al, 2004	Lorazepan	Agonista de receptor GABAérgico	Atraso mas também aumento e prolongação dos efeitos da ETCC-A na excitabilidade
Nitsche, Grundey et al, 2004	Anfetamina (1) Dextrometorfano (2) Propanolol (3)	1) Bloqueador de recaptação catecolaminérgica 2) Antagonista	1) Aumenta e prolonga efeito a longo prazo da ETCC-A 2) Sua aplicação adicional bloqueia o aumento

		NMDA 3) Antagonista β -adrenérgico	conseguido pela anfetamina 3) reduz duração dos efeitos a longo prazo da ETCC
Nitsche, Lampe et al, 2006.	Sulpirida	Bloqueador do receptor dopaminérgico D2	Abolição dos efeitos induzidos pela ETCC
Kuo et al, 2008	L-Dopa	Precursor da dopamina	Potencializou efeitos inibitórios da ETCC-C e converteu efeitos excitatórios da ETCC-A em inibitórios.
Nitsche et al, 2009	Citalopran	Inibidor serotoninérgico	Potencializou efeitos excitatórios da ETCC-A e converteu efeitos inibitórios da catódica em facilitatórios.
MONTE-SILVA et al, 2009	Ropinirol	agonista de receptor dopaminérgico do tipo D2	ativação do receptor D2 afeta a neuroplasticidade dependendo da dose utilizada de forma não linear, mas em forma de U invertido onde doses menores e maiores tem efeitos similares
MONTE-SILVA et al, 2011	Sulpirida	antagonista de receptor dopaminérgico do tipo D2	D2 inibiu os efeitos da estimulação elétrica transcraniana sobre a neuroplasticidade

Esses fatos direcionaram o pensamento dos pesquisadores para mecanismos de plasticidade sináptica, tais como LTP e LTD, como possivelmente envolvidos nos efeitos duradouros das diferentes polaridades desta técnica. Recentemente, foi demonstrado que sessões sucessivas de ETCC dentro de uma janela temporal específica é capaz de induzir plasticidade similar à LTP com duração maior do que 1 hora no córtex motor de humanos (MONTE-SILVA et al., 2013).

2.2.2.EVIDÊNCIAS SOBRE AÇÕES DA ETCC EM MODELOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL: UMA BREVE REVISÃO DA LITERATURA

Foi realizado levantamento dos estudos *in vivo* em ratos que utilizaram a ETCC. A busca foi realizada no pubmed e os termos usados foram *tDCS OR transcranial direct current stimulation AND rats*, inicialmente foram encontrados 40 artigos dos quais 21 foram selecionados para essa breve revisão porque os demais não apresentavam confluência com o tema investigado no presente estudo .

Dentre 21 estudos incluídos, 10 usaram ratos da linhagem *Wistar*, 8 *Sprague-Dawley*, 2 *Long Evans* e 1 usou o modelo genético de epilepsia de ausência (ratos WAG/Rij). Todos utilizaram machos, com exceção de 1 (Li et al, 2011), que usou fêmeas *Sprague-Dawley*.

Quanto ao uso da ETCC a imensa maioria se baseou no protocolo inicialmente descrito por Liebetanz e colaboradores (2006) que consiste em implantação epicraniana de tubo plástico que servirá como eletrodo. Outros estudos optaram por aplicação da corrente direta sobre o escalpe, sob argumentação de preservar maior semelhança com o método usado em humanos, nestes casos, os animais foram anestesiados durante as sessões de ETCC, inclusive utilizando a Ketamina (YOON et al, 2011) que é um bloqueador de receptor NMDA.

Na maioria dos estudos, os efeitos da ETCC foram investigados em modelos animais de patologias como epilepsia (n = 4), isquemia (n=3), dor crônica (n=2), Doença de Parkinson (n=1) e hemicerebelectomia (n=1). Onze estudos foram realizados em animais saudáveis. Uma grande diversidade metodológica foi adotada por esses estudos, incluindo diferentes condições nas quais a ETCC foi aplicada.

O quadro 2 reúne os parâmetros utilizados para aplicação da ETCC e os resultados obtidos nos estudos que utilizaram modelos animais de patologias.

Quadro 2: Quadro esquemático apresentando trabalhos relacionando ETCC e patologias em modelos animais.

ESTUDOS	ANIMAIS	OBJETIVO	PARÂMETROS ESTIMULAÇÃO	PRINCIPAIS RESULTADOS	CONCLUSÃO
Adachi et	Ratos	Investigar se ETCC é capaz de reverter	Anódica	- ETCC foi capaz de reverter os efeitos nocivos do estresse sobre o sistema de dor, e esse	Os resultados deste estudo suportam uma maior

al, 2012	Wistar (n=41) Idade=60 d	a efeitos do estresse crônico induzido por contenção nos mecanismos centrais da dor.	$t_e=20\text{min}$ $d = 8 \text{ dias}$ $i = 500 \mu\text{A}$	efeito se prolongou por 24 h. - Níveis de corticosterona e interleucina-1b não sofreram influência da ETCC ou do estresse por imobilização crônica. - Nível de TNF α no hipocampo diminuiu	exploração de ETCC como terapêutica no início da exposição a situações estressantes que podem levar a dor crônica.
Jiang et al, 2012	Ratos Sprague–Dawley (M) (n = 90) Idade = 4–5 meses	Investigar os efeitos da ETCC na expressão do hemicanal pannexin-1 em neurônios corticais e plasticidade neural nos estágios iniciais de isquemia cerebral. Explorar a janela ótima para terapia por ETCC após infarto cerebral.	ETCC anódica/ ETCC catódica $t = 30\text{minutos}$ $d = 3, 7 \text{ e } 14 \text{ dias}$ após a isquemia de acordo com o grupo $I = 100 \mu\text{A}$	Aplicação de ETCC anódica no hemisfério que sofreu isquemia simultaneamente com catódica no contralesional aumentou a densidade de espinha dendríticas de neurônios corticais. ETCC aplicada por 7 e 14 dias reduziu significativamente o aumento da expressão do hemicanal pannexin-1 provocado pela isquemia.	O aumento na densidade de espinha dendríticas indica que ETCC pode promover plasticidade neural após o acidente vascular cerebral (AVC). ETCC melhorou a função motora e pode diminuir a elevação da expressão de mRNA PX1 após isquemia cerebral.
Kamida et al, 2010.	Ratos Wistar (M) (n=18) Idade = 23	Investigar os efeitos da ETCC catódica na perda neuronal e brotamento de fibras musgosas no hipocampo, e memória espacial de ratos imaturos	ETCC catódica $t = 30\text{minutos}$ $d = 14 \text{ dias}$	O uso da corrente direta aproximou o desempenho cognitivo dos animais aos do grupo controle, que não sofreu SE. ETCC catódica reduziu a perda neuronal induzida no hipocampo por SE e a	ETCC catódica pode ter um efeito neuroprotetor no hipocampo de ratos imaturos após <i>status</i>

	dias	após <i>status epilepticus</i> (SE).	$i = 200 \mu A$	densidade de brotamento das fibras musgosas em relação ao grupo sem tratamento.	<i>epilepticus</i> induzido por polocarpina com potenciais efeitos anti-epilépticos.
Kamida et al, 2013	Ratos Wistar (M) (n=18) Peso corporal = 200 - 260 g	Avaliar os efeitos cognitivos e anticonvulsivantes da ETCC catódica em ratos com modelo de convulsão por estimulação da amígdala (<i>amygdala-Kindled</i>).	ETCC catódica $t = 30$ minutos $d = 7$ dias $i = 200 \mu A$	ETCC catódica melhorou o desempenho cognitivo dos animais no <i>Water Maze test</i> . A estimulação reduziu a severidade e a duração das crises. E aumentou o limiar para indução da convulsão.	ETCC catódica apresenta efeito anticonvulsivo no modelo utilizado e efeitos cognitivos positivos.
Kim et al, 2010	Ratos Sprague–Dawley (M) (n = 61) Idade = 5 semanas	Revelar as mudanças histológicas e da função motora após sessões de ETCC catódica ou anódica em um modelo de isquemia cerebral.	ETCC catódica ou ETCC anódica $t = 30$ minutos $d = 14$ dias $I = 100 \mu A$	ETCC não provocou alteração no volume de infarto. ETCC anódica induziu melhora da função motora verificada pelo teste de comportamento motor de Garcia e <i>foot fault</i> modificado. Foi observada maior preservação axonal na cápsula interna nos animais que receberam ETCC anódica.	ETCC anódica proporciona melhora funcional além de contribuir para a preservação de axônios em modelo de AVC
Laste et al, 2012	Ratos Wistar (M) (n = 18) Peso corporal= 250-300 g	Investigar os efeitos imediatos e tardios de sessões consecutivas de ETCC em modelo de dor crônica induzido periféricamente.	ETCC Anódica $t = 20$ minutos $d = 8$ dias $i = 500 \mu A$	ETCC anódica apresentou papel analgésico, verificado pelo <i>hot plate test</i> e efeito anti-alodínico, observado por meio do <i>Von Frey test</i> . Tais efeitos duraram até 24h após a última sessão.	ETCC anódica apresenta efeitos antinociceptivos imediatos e tardios em modelo de dor crônica secundária à inflamação periférica.
Li et al, 2011	Ratos Sprague-Dawley (F)	Os objetivos deste estudo foram: 1. Testar novo	ETCC anódica $t_e = 30$ minutos	ETCC anódica reduziu a tendência unilateral dos animais.	Estimulação anódica pode melhorar a função motora

	(n = 23)	protocolo para aplicação da ETCC 2.Observar redução na tendência unilateral desses animais por uso da estimulação anódica. 3.Verificar segurança dos parâmetros de estimulação usados.	d = 1, 3, 5, 7, 9 dias i=40 μA e 80 μA	Animais que receberam intensidade de 80 μA exibiram alterações mais significantes que os tratados com 40 μA. Análise histológica por HE não mostrou neurotrauma induzido pela estimulação.	de pacientes com doença de Parkinson e modelos animais desta doença.
Liebetanz et al, 2006b	Ratos Wistar (M) (n = 65) Peso corporal = 277 $\pm$ 32 g	Avaliar o potencial anticonvulsivante da ETCC em modelo de epilepsia focal (<i>modified cortical ramp-stimulation model</i>)	ETCC anódica/ ETCC catódica t_e = 15min a 60min d = 4 sessões intercaladas por 1 semana i = 100 μA ou 200 μA	ETCC catódica aplicada durante 30 min com intensidade de 200 μA, ou por 60 min a uma intensidade de 100 μA, aumentou significativamente o limiar para desencadear atividade convulsiva localizada. O uso dos primeiros parâmetro de estimulação produziu efeitos a longo-prazo por até 90 min após o fim ETCC.	Supõe-se que a ETCC catódica pode servir como futura opção terapêutica refratária a tratamento de medicamento.
Yoon et al, 2012	Ratos Sprague–Dawley (M) (n = 30) Idade = 6 semanas Peso corporal = 220 -280 g	Observar os efeitos plásticos da ETCC anódica após isquemia cerebral e determinar a janela de tempo ideal para início do tratamento por meio dessa ferramenta.	Anódica t_e=20min/dia d = 5 dias (a partir do 1° ou 7° dia pós-isquemia) I=200 μA	Animais tratados com ETCC apresentaram melhor performance motora nos testes utilizados, no entanto apenas o grupo que iniciou o tratamento por ETCC 7 dias após a isquemia exibiu melhora no <i>beam balance test</i>. Notável aumento na expressão de MAP-2 nos animais que iniciaram terapia por ETCC no dia seguinte à isquemia, já no grupo que inicio o tratamento tardiamente foi marcante o aumento da expressão de GAP-43 Tanto na zona de penumbra quanto no corte contralateral.	ETCC anódica exerceu um benefício terapêutico após isquemia cerebral, apresentando melhora funcional, modulando plasticidade dendrítica e axonal na zona de penumbra, sem agravar o volume de infarto nem provocar alteração metabólica.

Zobeiri E Van Luijtelaar, 2013	Ratos WAG/Rij (M) (n = 26) Idade = 6 meses Peso corporal = 343±21 g	Investigar os efeitos de diferentes parâmetros da ETCC na em um modelo genético de epilepsia de ausência	ETCC anódica/ ETCC catódica ou apenas ETCC catódica t = 15min d = 4 sessões em 1 dia i = 100 μ A ou 150 μ A	Não foram observadas alterações histológicas, verificadas por coloração com HE, indicativas de lesão. ETCC catódica reduz o número de espículas ondas-lentas durante a estimulação e afeta sua duração após a estimulação de maneira intensidade dependente. Os animais que receberam maior intensidade de corrente (150 μ A) catódica apresentaram alteração comportamental, aumento de atividade, e aumento de frequência delta e subdelta.	ETCC catódica pode ser uma efetiva ferramenta não invasiva para reduzir a excitabilidade na zona focal presumida de início da epilepsia de ausência no modelo adotado.
---------------------------------------	--	--	--	---	--

Como pode ser observado neste quadro, na maioria destes estudos foram avaliados parâmetros eletrofisiológicos e de melhora comportamental sugestivos de uma ação moduladora e protetora da ETCC sobre as modificações induzidas pelos diferentes insultos.

Nos modelos de isquemia cerebral, por exemplo, a despeito das diferentes metodologias utilizadas, observou-se, de maneira geral, que a ETCC anódica (Kim et al., 2010 e Yoon et al, 2012) aplicada sobre o hemisfério lesionado, ou simultaneamente com ETCC catódica no hemisfério contra-lesional (Jiang et al., 2012) tem efeito positivo na recuperação da função motora após o insulto isquêmico. Vale salientar que alterações histológicas observadas nestes modelos de isquemia apontam para influência da ETCC anódica em aspectos da arquitetura neural, tais como: maior preservação axonal na cápsula interna, analisado pelo método de impregnação pela prata (Kim et al, 2010); aumento na densidade de espinhas dendríticas, evidenciado pela marcação por MAP-2 (Jiang et al, 2012 e Yoon et al, 2012); redução significativa na expressão do RNAm para o *hemicanal pannexin-1* (Jiang et al, 2012). Um aumento na imunorreatividade à proteína GAP-43 na zona penumbra e córtex contralesional, foi observado, apenas quando a ETCC foi aplicada 7 dias após o insulto isquêmico (Yoon et al, 2012), sugerindo que a mesma potencializa a formação de novas sinapses induzidas pelo insulto.

Estudos realizados em animais saudáveis observaram os efeitos da ETCC no fenômeno de depressão alastrante cortical (DAC) seja aplicada sozinha (Liebetanz et al, 2006a), seja associada à estimulação cortical repetitiva (ECr) (Fregni et al, 2007). Tais estudos mostraram que a estimulação anódica (ETCC-A) provoca aumento na velocidade de propagação da DAC, sendo tais resultados discutidos como mais uma evidência do efeito excitatório da ETCC-A, uma vez que a aumentos na velocidade da DAC são decorrentes de aumento na excitabilidade cortical (Fregni et al, 2005). Já a corrente catódica (ETCC-C) não apresentou influência significativa na DAC em relação ao grupo controle (Liebetanz et al, 2006), no entanto foi capaz de reduzir significativamente o efeito da ECr na redução da velocidade de propagação da DAC.

Liebetanz e colaboradores (2009) estabeleceram critérios de segurança e viabilidade para um dos modelos mais usados para aplicação de ETCC em ratos, em que o eletrodo é implantado cirurgicamente sobre o crânio e a estimulação transcraniana é feita posteriormente com o animal acordado. Utilizando ETCC-C estabeleceram o limiar de lesão e chamaram atenção para um componente temporal no potencial lesionador da corrente direta: determinada quantidade de carga tem maior potencial lesivo se aplicada com alta intensidade em curto intervalo de tempo. Embora o modelo de estimulação proposto por este grupo de pesquisadores seja o mais adotado, sofre a crítica de não simular o uso da estimulação em humanos uma vez que esta é feita pelo posicionamento dos eletrodos sobre o couro cabeludo e não diretamente sobre o crânio (Kim et al, 2010; Takano et al, 2011, e Laste et al, 2012).

Estudos com ratos saudáveis também foram realizados para investigar efeitos comportamentais (Dockery *et al*, 2011) e novas metodologias relacionadas a esta forma de estimulação. Na tentativa de esclarecer os efeitos da ETCC, Takano e colaboradores (2011) desenvolveram um modelo de estimulação com os eletrodos colocados sobre o escalpe do animal e avaliação, por ressonância magnética funcional, das alterações induzidas a partir de uma sessão de ETCC-A. Este estudo observou aumento da intensidade de sinal no córtex cerebral e núcleo accumbens logo após a aplicação da corrente direta, com estes resultados sugeriram que a ETCC aplicada sobre o córtex frontal induz ativação neuronal no córtex motor e regiões subcorticais associadas. Efeitos da ETCC anódica e catódica sobre o fluxo sanguíneo cortical vêm sendo descritas como potenciais mecanismos envolvidos nas alterações de excitabilidade induzidas por estes tipos de estimulação (WACHTER et al., 2011; MIELKE et al.,

2013). Rueger et al, 2012 avaliaram os efeitos da ETCC anódica e catódica sobre respostas imunes locais e capacidade de recrutamento de células progenitoras neurais para o córtex cerebral de ratos. Utilizando animais anestesiados e aplicando a ETCC por 15 min com intensidade de corrente de 500 μ A, estes autores demonstraram que apenas a ETCC catódica foi capaz de induzir proliferação celular, mas que tanto a catódica como a anódica aumentaram o número de células da microglia e a expressão da proteína ICAM, envolvida na mobilização leucocitária em vasos no córtex ipsilateral à estimulação. Recentemente, foi também demonstrado que a ETCC utilizando correntes fracas e oscilatórias similares às produzidas endogenamente pelo hipocampo, quando aplicada durante o sono não-REM é capaz de melhorar a consolidação da memória de trabalho (BINDER et al., 2014).

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

Considerando todos os estudos previamente publicados, evidenciamos que pouco se sabe sobre a reatividade molecular do córtex cerebral diante da ETCC, principalmente em condições basais, na ausência de patologias. Com o intuito de contribuir para entendimento de potenciais mecanismos envolvidos com este tipo de neuromodulação, testamos a hipótese de que a ETCC anódica per si (quando aplicada com corrente de 400 μ A) é capaz de induzir, em curto prazo, um aumento na expressão de proteínas envolvidas com a extensão axonal e plasticidade sináptica e uma ativação microglial benéfica em regiões corticais mais amplas do que o ponto de estimulação.

4. OBJETIVOS

4.1.OBJETIVO GERAL

Verificar se sucessivas sessões de ETCC anódica no córtex parietal é capaz de induzir aumento na expressão de proteínas envolvidas com a extensão axonal e plasticidade sináptica, bem como investigar seu efeito na ativação microglial e astrocitária em camadas superficiais e profundas subjacentes ao ponto de estimulação e em outras regiões corticais.

4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar presença de injúria tecidual, induzida pela corrente ou procedimento cirúrgico, através de análise histológica com coloração por hematoxilina e eosina (HE) e marcação por fluoro-jade C;
- Avaliar imunoreatividade tecidual ao marcador microglial Iba1;
- Avaliar imunoreatividade tecidual ao marcador astrocitário GFAP;
- Quantificar expressão cortical da proteína GAP-43.

5. MÉTODOS

5.1.ANIMAIS E PLANO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 20 ratos machos albinos da linhagem *Wistar* da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os ratos foram mantidos sob condição padrão do biotério, em sala à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o claro iniciando às 7 horas da manhã), com livre acesso à água e à comida. Os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (CEEACCB-UFPE), protocolo nº: 23076017070/2012-61. Aos 90 - 95 dias, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais:

1. Grupo Experimental (E)- ratos submetidos à ETCC;
2. Grupo *Sham* (S)- ratos submetidos a sessões fictícias de ETCC.

A figura 4 ilustra as etapas da pesquisa que serão cuidadosamente detalhadas adiante.

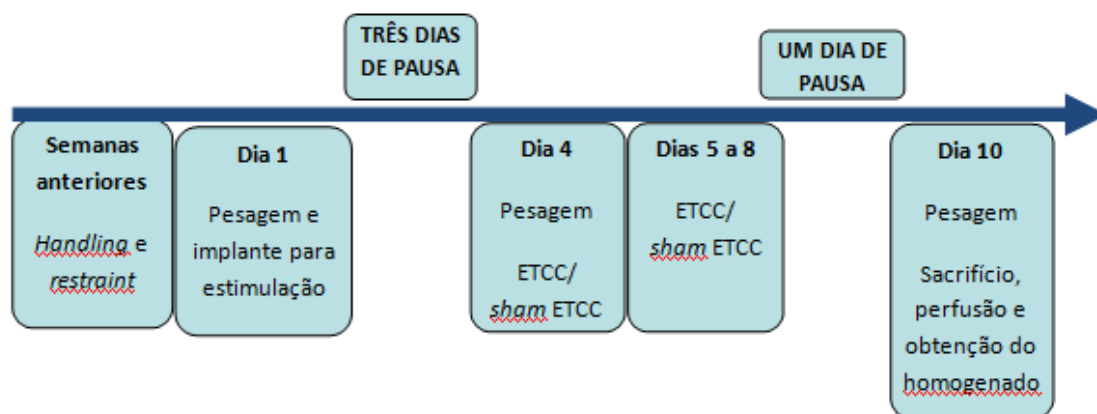


Figura 4. Esquema demonstrativo dos procedimentos experimentais do estudo.

Os dois grupos foram analisados por Wertern Blot (homogenados do córtex) e imunohistoquímica (cortes parasagittais) (figura 5).

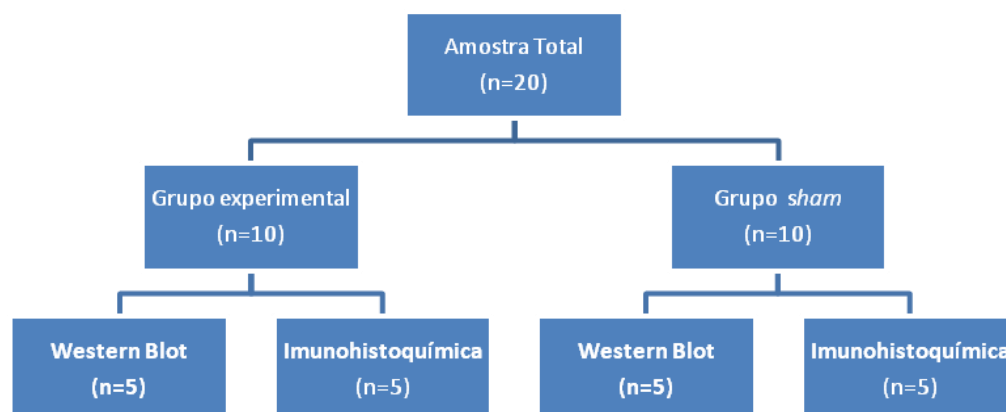


Figura 5. Esquema demonstrativo dos grupos experimentais.

5.2.HANDLING E RESTRAINT

Embora ratos *Wistar* apresentem tolerância ao manuseio, qualquer forma de manipulação prolongada pode ser estressante para o animal. O grau de estresse é reduzido quando o animal é submetido ao procedimento em questão repetidamente até tornar-se habituado com a situação e não percebê-la mais como ameaça (KEMP, 2000).

Dois termos são bastante usuais para denominar esses procedimentos: *handling*, refere-se ao manuseio do animal com o objetivo de transportá-lo de um lugar para outro; e *restraint*, consiste na imobilização do animal acordado para manter seu corpo ou parte dele fixa por um período de tempo significativamente mais longo que no *handling*, visando a realização de exames ou procedimentos (Figura 6).

No presente estudo os animais foram submetidos a *handling* a partir de 60 dias de idade (três vezes/semana) e a *restraint*, a partir de 2 semanas antes do início dos procedimentos experimentais (quatro vezes/semana), ambos foram realizados até o dia anterior à cirurgia para implante do eletrodo.

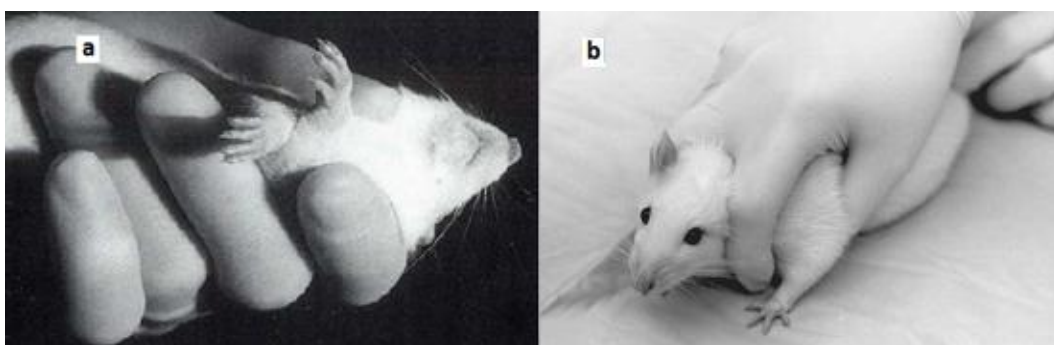


Figura 6: a) *Handling* e b) *Restraint* (imagens obtidas em KEMP (2000) e SHARP E LA REGINA (1998))

5.3.PESAGEM DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados imediatamente antes da cirurgia, no dia de início da estimulação e imediatamente antes do sacrifício.

5.4.PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No modelo de ETCC utilizado neste estudo o implante do artefato usado para estimulação foi cirurgicamente fixado sobre o crânio, e não sobre a pele como ocorre na pesquisa e prática clínica, de forma a manter constante a área estimulada (LIBETANZ et al, 2006). O artefato implantado foi bastante simples, consistindo em um tubo plástico circular com 9mm de altura, cuja luz possui 2,1mm de diâmetro, este tubo é fixado ao crânio por uso de cimento de ionômero de vidro (Vitro Cem A3, DFL) (Figura 7).

Após pesagem, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Foi realizada anestesia com aplicação intraperitoneal de Ketamina: (90mg/Kg de peso) associada a Xilazina: (10mg/Kg de peso), com dose complementar quando necessário. A temperatura retal do rato foi monitorada durante todo o procedimento cirúrgico e mantida, por meio de placa térmica ou uso de lâmpada incandescente, em $37,5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para implante do tubo plástico, a cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotáxico (*Insight* equipamentos científicos, Ribeirão Preto, SP), de modo a permitir a incisão da pele e a remoção do periósteo para exposição do crânio. A luz do tubo foi posicionada 1,0mm anterior à fissura coronal e 1,0mm à direita da sutura sagital e realizada a fixação ao crânio (figura 7). O implante será referido como eletrodo anódico da estimulação. Cantrimol® (composto terapêutico que contem os antibióticos penicilina e estreptomicina, e o corticoide triancinolona) foi administrado via intramuscular (0,1ml) para prevenir infecções. A partir do procedimento cirúrgico os animais foram alocados individualmente nas gaiolas.

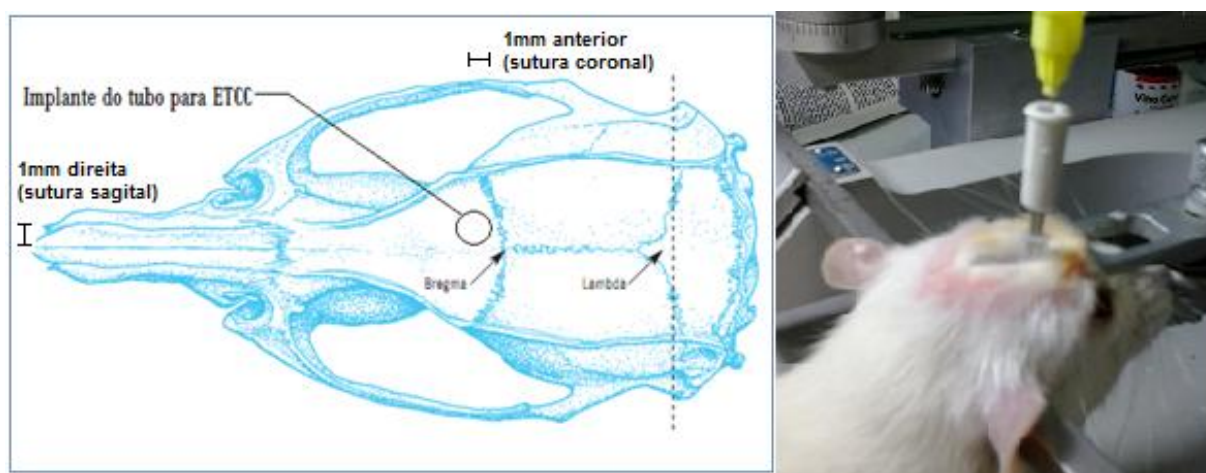


Figura 7: Ilustração indicando o local de implante do eletrodo (esquerda) e fotografia mostrando o momento do implante nas coordenadas indicadas com uso do aparelho estereotáxico.

5.5. ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC)

Durante as sessões de ETCC a luz do tubo foi preenchida com solução de NaCl 0,9% e o eletrodo anódico conectada ao implante sem, no entanto, tocar o crânio. ETCC

anódica foi aplicada por meio de um estimulador elétrico de corrente contínua (EL0502 da marca *Insight*, Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brasil) setenta e duas horas após o procedimento cirúrgico e imediatamente após a segunda pesagem.

Para evitar os possíveis efeitos das drogas anestésicas os animais foram mantidos acordados durante a estimulação, em contenção manual (Figura 8). A corrente direta foi aplicada por cinco dias consecutivos durante 10 minutos/dia, com intensidade de 400 μ A. A área de estimulação foi de 3,5 mm² sobre o córtex frontal. O cátodo foi posicionado na região ventral do tórax do animal e consistiu em um eletrodo de borracha (próprio para estimulação elétrica) com área de 10,5 cm². Os parâmetros de estimulação foram baseados no estudo de Liebetanz e colaboradores (2009) onde foram investigados os limites de segurança para o uso desse modelo de estimulação em animais.

Os animais que formavam o grupo *sham* foram expostos a todos os procedimentos realizados no grupo experimental, mas não receberam aplicação da corrente elétrica, o aparelho permaneceu desligado durante as sessões de estimulação elétrica.



Figura 8: Contenção do animal durante sessão de estimulação transcraniana por corrente contínua, à esquerda o amperímetro indicando a corrente aplicada de 400 μ A.

5.6.OBTENÇÃO DE HOMOGENADO, PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E WESTERN BLOT

Os animais, profundamente anestesiados com enflurano volátil, foram decapitados e os cérebros foram removidos e resfriados com auxílio de solução salina (0,9% NaCl) gelada. O córtices cerebrais foram isolados, seus hemisférios separados, e

homogeneizados isoladamente em 1,5mL de um coquetel anti-protease contendo: Tris-Base – 20 mM; $MgCl_2$ - 10 mM; $CaCl_2$ - 0.6 mM; EGTA- 0.5 mM; DTT - 1 mM; PMSF -1 mM; Aprotinina - 5%g/mL; Leupeptina - 2%g/mL; Triton x-100 - 0.05%. Durante todo o procedimento as amostras foram mantidas refrigeradas. Os tubos com o homogenado foram centrifugados por 30 minutos (12.000 r.p.m.) em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi recolhido e aliquotado em *eppendorfs*.

A dosagem de proteína total das amostras foi feita pelo método do ácido bicintronínico (kit BCA, Pierce) com a albumina (BSA) como padrão. As amostras foram diluídas (2,0mg/mL) em tampão de amostra contendo: Tris – HCl pH 6.8 com uma concentração de 0,5 M, glicerol, SDS (Dodecil sulfato sódio) 10% (peso/volume), 2 – mercaptoetanol e 0,4 ml de azul de Bromofenol, e foram desnaturadas em banho-maria à temperatura de 90°C durante 5 minutos.

A separação das proteínas das amostras foi feita através de eletroforese em gel de poli-acrilamida e SDS preparado com 8% de acrilamida (tabela 3). Foi utilizada concentração de 20µg de proteína das amostras por poço do gel. A eletroforese foi realizada a uma voltagem 40V. Após a separação, as bandas de proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose, com corrente de 200mA e 200V. A membrana foi lavada em solução tampão fosfato-salina e tween (TBS-T) e posteriormente bloqueada por 2 horas em solução de 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T.

Tabela 1: Composição do gel 8% de acrilamida usado para a eletroforese no Western blot.

	<i>STACKING GEL</i> (3mL)	<i>Resolving GEL</i> (10ML)
H ₂ O Mili-Q	2,1	4,6
Acrilamida (30%)	0,5	2,7
Tris-Base 1M (pH=6,8)	0,38	-----
Tris-Base 1,5M (pH=8,8)	-----	2,5
SDS (10%)	0,03	0,1
Persulfato de Amônia	0,03	0,1

(10%)		
TEMED	0,003	0,006

Após bloqueio, a membrana foi incubada com anti-corpo primário (Quadro 3) (*overnight*) a 4°C e então lavada 4 vezes de 10 minutos em TBS-T, logo após incubada com anticorpo secundário por 1h à temperatura ambiente. Após mais 4 lavagens de 10 minutos com TBS-T as membranas foram reveladas em câmara escura utilizando ECL (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent). A normalização dos dados é feita em relação à marcação da ERK-total.

Quadro 3: Identificação dos anticorpos utilizados nos procedimentos do imunoblot.

Anticorpo	Fabricante	Concentração	Produzido em:
ANTI-GAP-43 TOTAL	SantaCruz Biotechnology	1:1000	Camundongo
ANTI-ERK TOTAL	Bio Rad	1:1000	Coelho
ANTI- CAMUNDONGO- HRP	Milipore	1:5000	Rato
ANTI-COELHO- HRP	Bio Rad	1:5000	Rato

5.7.PERFUSÃO DE ANIMAIS E MICROTOMIA

Vinte e quatro horas após o fim da quinta sessão de ETCC os animais foram pesados, profundamente anestesiados com enflurano volátil e perfundidos com 50 ml de solução salina (NaCl a 0,9%) e 300ml de paraformaldeído 4% por meio de uma bomba infusora (*harvard apparatus*) a uma velocidade de 7,64ml/min.

Os encéfalos foram retirados e sequencialmente desidratados em soluções de sacarose a 10%, 20% e 30%. Secções para-sagittais de 40µm foram obtidas com

criostato e armazenadas em solução crioprotetora a -20°C para posterior procedimento imunohistoquímico.

5.8. HEMATOXILINA E EOSINA

As lâminas contendo os cortes já montados foram sequencialmente imersas em xilol (duas vezes por 5 minutos), mistura de na proporção de 1:1 de xilol e álcool absoluto (por 5 minutos), álcool absoluto (duas vezes por 5 minutos), água da torneira (5 minutos), quando então foram colocadas em hematoxilina de Harris (por 3 minutos), lavados em água da torneira (5 minutos) e então imersos em eosina alcoólica (3 minutos). As lâminas passaram então pelo caminho inverso da bateria inicial: álcool absoluto (duas vezes por 5 minutos), mistura de na proporção de 1:1 de xilol e álcool absoluto (por 5 minutos), xilol (duas vezes por 5 minutos). Ao final da bateria foi feita montagem com as lamínulas usando entelan.

5.9. IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes foram lavados com tampão fosfato salina (TBS) e a peroxidase endógena tissular bloqueada com H₂O₂ (2%) e metanol (70%) por 10 minutos. O tecido foi lavado em TBS + Triton (0,3%), 3 vezes com 5 minutos cada lavagem, e o bloqueio feito em solução tampão contendo tampão-fosfato (TBS) + triton (0,3%) + soro fetal bovino (FBS) + albumina de soro bovino (BSA) por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados durante a noite a 4°C com anticorpo primário (Anti-Iba1, feito em coelho (Wako), diluição de 1:3000; ou Anti-GFAP feito em camundongo (Sigma), diluição de 1:1000), diluídos no tampão de bloqueio. Foram realizadas 3 lavagens com TBS + Triton (0,3%), 3 vezes de 5 minutos. Os cortes foram então incubados por 1,5 hora à temperatura ambiente com os anticorpos secundários biotinilados específicos (anti-coelho (Jackson), diluição 1:1000; anti-camundongo (Jackson), diluição 1:1000) diluídos em tampão de bloqueio. Os cortes foram novamente lavados em TBS + Triton (0,3%), 3 vezes de 5 minutos e incubados com avidina-biotina-HRP [diluição 1:200 (Kit ABC da Vector Labs)] por 1 hora à temperatura ambiente. Novas lavagens foram realizadas com TBS e os cortes foram incubados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a 0,025% dissolvido em TBS por 20 minutos, sendo posteriormente adicionado peróxido de hidrogênio (1%). Os cortes

foram lavados e montados em lâminas gelatinizadas, sendo estas desidratadas posteriormente em bateria de álcool.

5.10.FLUORO-JADE C

Para visualizar a degeneração neuronal foi utilizado o protocolo descrito em Ehara & Ueda (2009) com algumas modificações. As secções cerebrais foram montadas em lâminas gelatinizadas e secadas ao ar livre durante 72h, logo após, colocadas em estufa 50°C por 20 min. Após sair da estufa, as lâminas foram imersas em etanol 100% por 3 min, depois em solução contendo 1% de NaOH em etanol 80% por 5 min. Em seguida, lavadas por 2 min em etanol 70% e água destilada por 1 min; após isso as lâminas foram incubadas em 0,06% de permanganato de potássio (KMnO₄) por 5 min e então lavados com água destilada por 2 min. Após essas etapas foi feita a transferência das lâminas para uma solução FJC (Millipore) a 0.001% onde ficaram imersas por 30 min. A solução inicial de FJC é estocada a 0,01% e protegida da luz. A solução final é obtida pela diluição desta solução estoque em ácido acético a 0,1%. Em seguida as lâminas foram lavadas 3 vezes por 1 minuto em água destilada e postas para secar em estufa a 50°C por 30 min. Logo após os cortes foram diafanizados em xilol por 1 min e as lamínulas foram fixadas com Entellan. Foram utilizados como controles positivos cortes de animais submetidos à microinjeção intracerebral de pilocarpina.

Os cortes foram examinados em microscópio de fluorescência (Leica) utilizando um filtro FITC.

6. RESULTADOS

6.1.ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO CÓRTEX CEREBRAL

Análise da integridade do córtex cerebral após os 5 dias de ETCC-A, realizada pela técnica de coloração com Hematoxilina-Eosina, evidenciou a inexistência de alterações sugestivas de lesão ou desorganização celular, confirmando que tanto o procedimento cirúrgico como a ETCC foram inócuos ao tecido cortical. A figura 9 ilustra fotomicrografias em pequeno e maior aumento de secções sagitais do córtex cerebral direito de um animal do grupo *sham* (A) e do grupo estimulado (B) em uma região central e imediatamente abaixo ao ponto de implantação do tubo para estimulação.

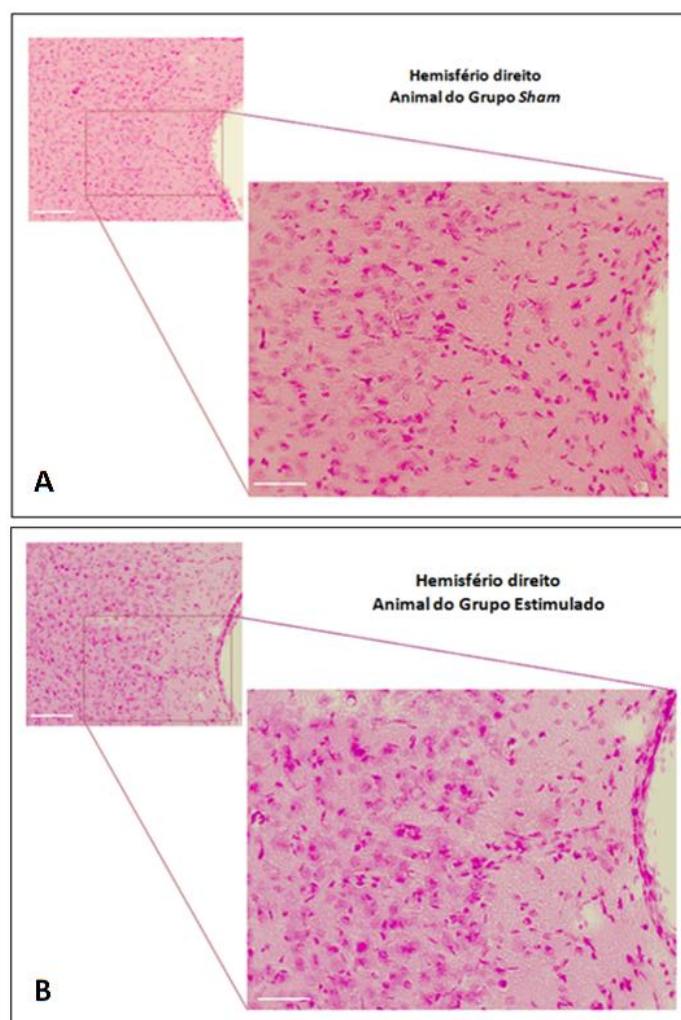


Figura 9: Fotomicrografias de secções sagitais do córtex parietal direito coradas com Hematoxilina-eosina em região imediatamente abaixo ao ponto de implantação do tubo para estimulação, em um animal do grupo *sham* (A) e do grupo submetido à ETCC-A (B). Barras de calibração equivalentes a 100 e 50 μm nas imagens de menor e maior aumento, respectivamente.

Utilizando a histoquímica de fluorescência para o Fluoro Jade C também não foram visualizados sinais de sofrimento neuronal, indicativos de degeneração. A figura 10 ilustra secções sagitais do córtex cerebral de animais representativos do grupo *sham* (A) e do grupo submetido à ETCC-A (B), em regiões subjacentes ao ponto de estimulação.

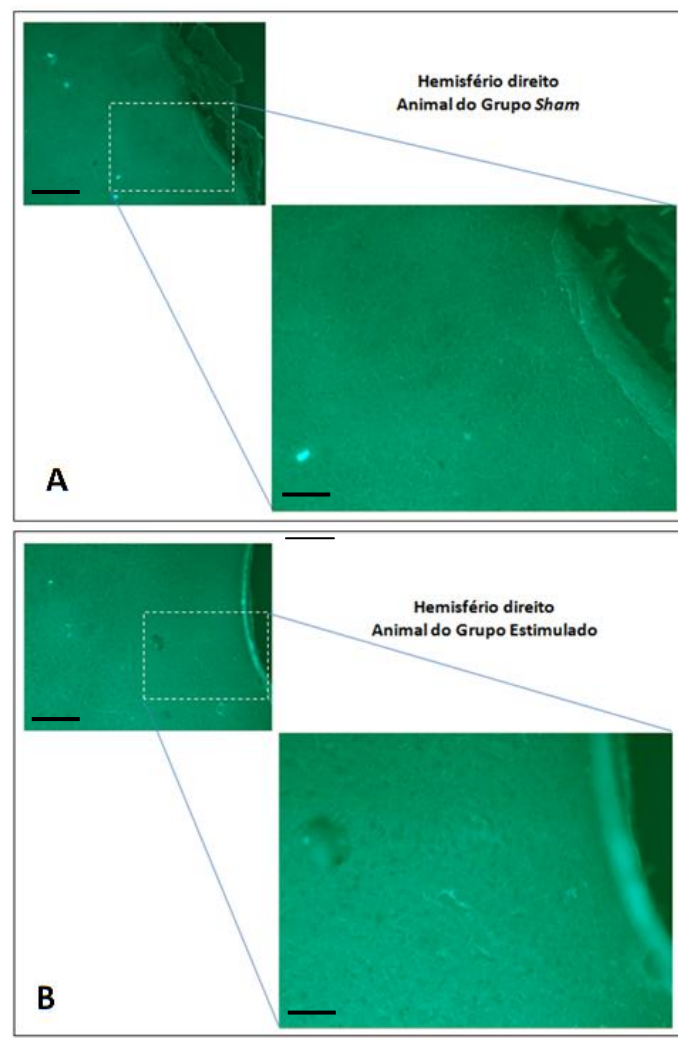


Figura 10: Fotomicrografias de secções sagitais do córtex parietal direito processadas pela técnica do fluoro-jade C evidenciando ausência de degeneração neuronal, em um animal do grupo *sham* (A) e um submetido à ETCC (B). Barras de calibração equivalentes a 100 e 50 μm nas imagens de menor e maior aumento, respectivamente.

6.2. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DA MICROGLIA E DE ASTRÓCITOS

Análise imunohistoquímica da distribuição de células da microglia no córtex parietal de animais do grupo *sham* ou do grupo submetido à ETCC evidenciou um maior percentual de área imunorreativa à proteína IBA-1 nas camadas corticais mais superficiais em região subjacente ao ponto de estimulação. No entanto o fenótipo das células microgliais não foi alterado no grupo *sham*. Nos animais estimulados, um maior percentual de área imunorreativa foi também observado, estendendo-se a camadas mais profundas do córtex cerebral até aproximadamente 700 μm da superfície cortical. A figura 11 ilustra uma reconstrução panorâmica de parte de um corte sagital do córtex

cerebral de um animal submetido à ETCC, onde um aumento na imunorreatividade à proteína IBA-1 foi observada por uma extensão de aproximadamente 7 mm no sentido Antero-posterior.

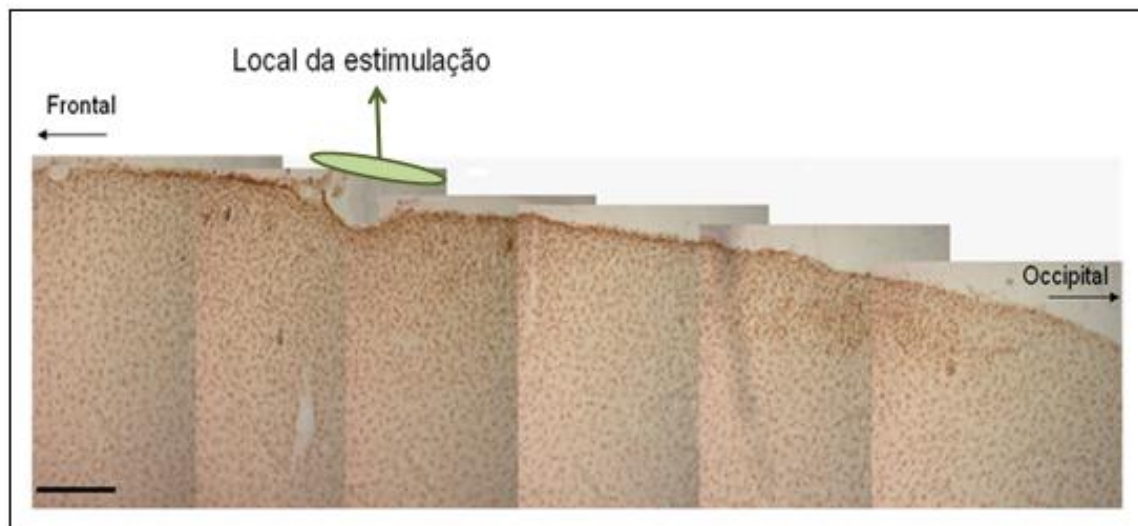


Figura 11: Reconstrução panorâmica de um corte sagital do córtex parietal direito imunorreagido para IBA-1, de um animal submetido à ETCC-A por 5 dias. Observar a intensa marcação de microglia estendendo-se às camadas mais profundas, principalmente na região subjacente ao local de estimulação. Barra = 0,5 mm.

A figura 12 ilustra fotomicrografias em maior aumento, de células da microglia localizadas em camadas superficiais e profundas do córtex parietal, em região subjacente ao ponto de estimulação, em um animal do grupo estimulado (A e B) e do grupo *sham* (C e D). Como pode ser observado, um maior número de células ocorre nas camadas corticais superficiais tanto no animal estimulado (A) como no *sham* (C) em relação às camadas mais profundas. No entanto, alterações fenotípicas da microglia, caracterizadas por uma maior intensidade de marcação e maior espessamento e extensão de seus prolongamentos foi observado apenas no grupo estimulado.

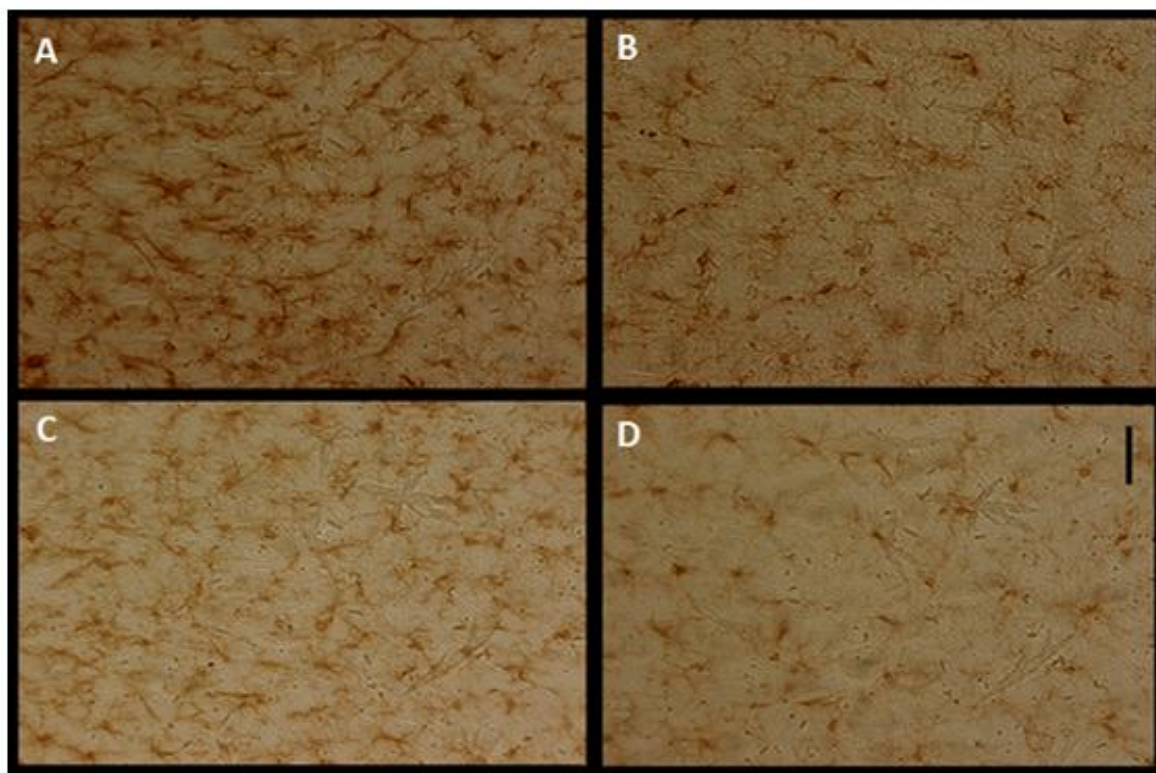


Figura 12: Fotomicrografias de secções sagitais do córtex parietal direito evidenciando a distribuição da microglia imunorreativa à proteína IBA-1. A e B ilustram regiões de camadas corticais superficiais e profundas, respectivamente, de um animal do grupo submetido à ETCC. C e D ilustram camadas superficiais e profundas de um animal do grupo *sham*. Barra= 50 μm .

Análise quantitativa do percentual de área imunorreativa à proteína IBA-1 foi realizada em 4 cortes sequenciais, separados a uma distância de 240 μm ao longo da extensão látero-medial do córtex parietal. Tal análise foi realizada em pelo menos 7 campos de amostragem (dimensão = $(450 \times 350) \mu\text{m}^2$) ao longo da extensão rostro-caudal do hemisfério direito e esquerdo, em camada celular localizada a 350 μm da superfície do córtex e em camada adjacente mais profunda localizada a 700 μm da mesma superfície. As figuras 13 e 14 ilustram os resultados obtidos em 4 animais representativos do grupo estimulado e em 2 animais representativos do grupo *sham*. Como pode ser observado, o procedimento cirúrgico e a manutenção do tubo de estimulação per si foram capazes de induzir um pequeno aumento no percentual de área imunorreativa à IBA-1 nas camadas mais superficiais em relação às camadas mais profundas do hemisfério Direito e em relação às camadas corticais do hemisfério contralateral ao procedimento. Nos 3 animais analisados, este aumento não ocorreu em todos os cortes sequenciais analisados.

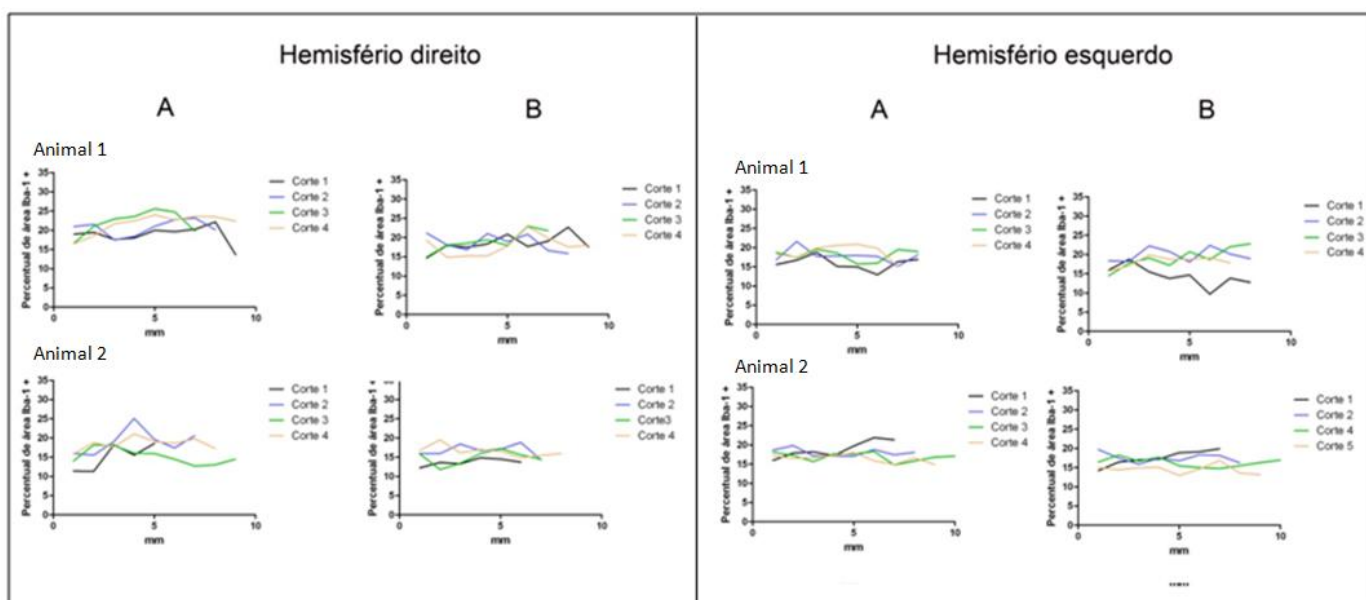


Figura 13: Comparação do percentual de área imunorreativa à proteína IBA-1 ao longo da extensão rostro-caudal do córtex parietal, entre os hemisférios direito e esquerdo de 2 animais representativos do grupo *sham*. **A** corresponde à camada mais superficial e **B** à camada adjacente e mais profunda do córtex parietal.

No grupo submetido à ETCC, um aumento na área imunorreativa à IBA-1 nas camadas mais superficiais em relação às profundas ocorreu na maioria dos cortes sequenciais do hemisfério ipsilateral à estimulação. Os efeitos sobre a microglia foram observados até cerca de 1050 μm da superfície cortical, correspondente aproximadamente à localização da camada 5 que dá origem ao trato corticoespinhal. No hemisfério contralateral, as curvas de distribuição da área imunorreativa à IBA-1 são similares entre as camadas corticais analisadas.

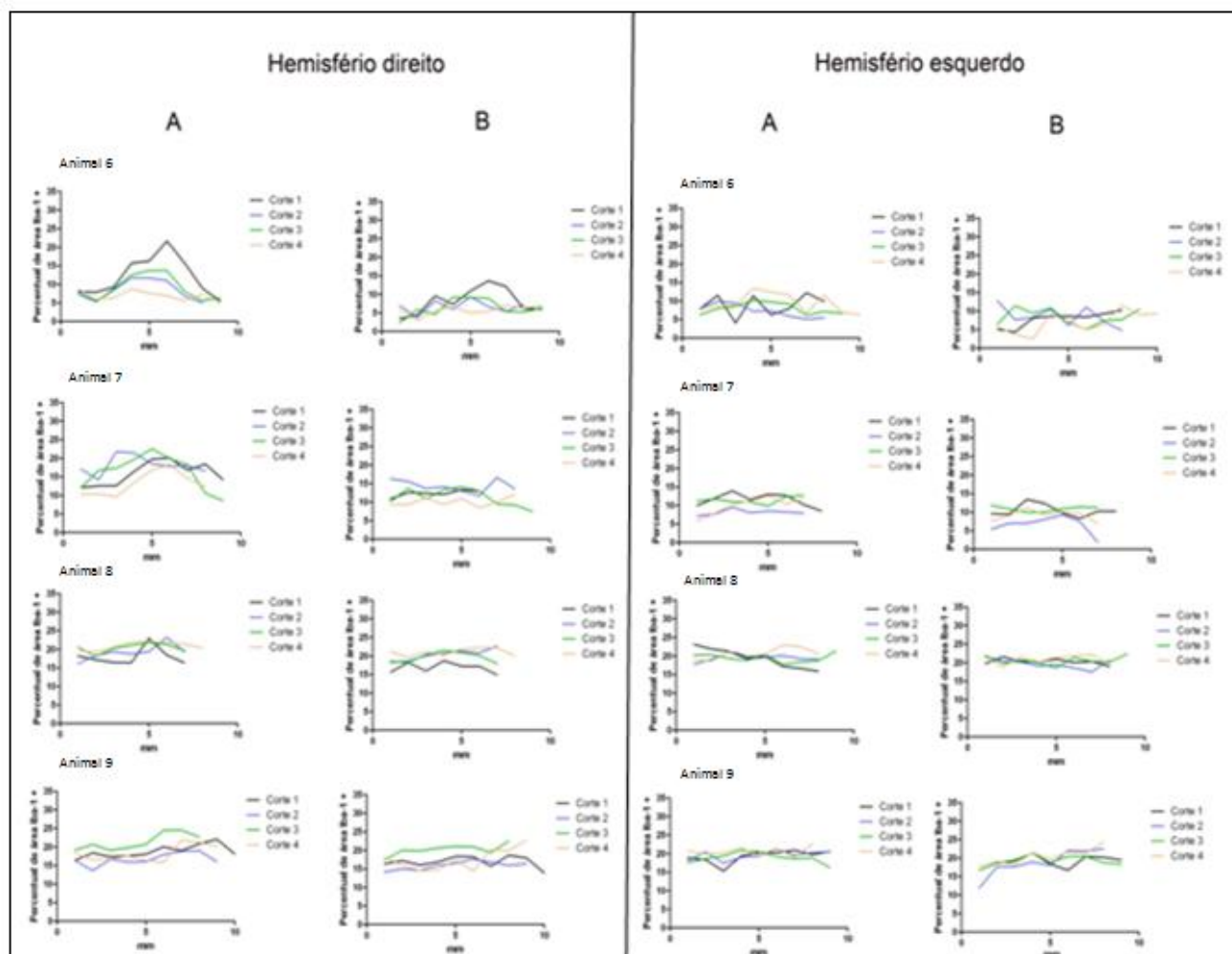


Figura 14: Comparação do percentual de área imunorreativa à proteína IBA-1 ao longo da extensão rostro-caudal do córtex parietal, entre os hemisférios direito e esquerdo de 4 animais do grupo estimulado. **A** corresponde à camada mais superficial e **B** a camada adjacente e mais profunda do córtex parietal.

Diferentemente do observado em relação à microglia, nenhuma alteração sugestiva de astrogliose foi observada nos animais do grupo Sham ou submetidos à ETCC. A figura 15 ilustra cortes sagitais do córtex parietal de animais representativos do grupo Sham e estimulado, em região subjacente ao local de estimulação. Como pode ser observado, o fenótipo dos astrócitos também não foi alterado pela ETCC.

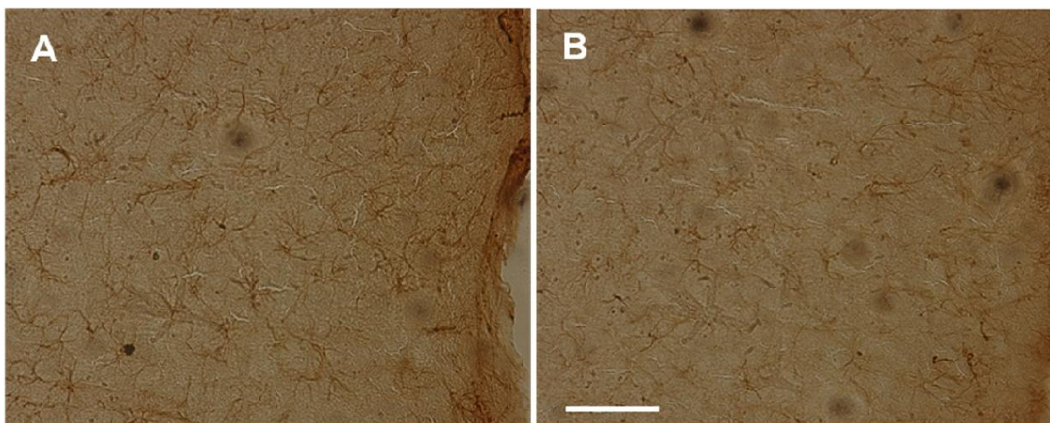


Figura 15: Fotomicrografias de secções sagitais do córtex parietal direito evidenciando a distribuição de astrócitos imunorreativos à proteína GFAP, em um animal submetido à ETCC (A) e um animal do grupo *sham* (B). Barra= 100 μ m

6.3.EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GAP-43 EM HOMOGENADOS DO CÓRTEX CEREBRAL

A análise por Western blot da proteína GAP-43, realizada em 5 animais por grupo, demonstrou um aumento significativo na expressão da proteína GAP-43 total nos hemisférios direitos dos animais que receberam ETCC quando comparados àqueles que não receberam ($p = 0,032705$; teste T de Student). A figura 16 A ilustra as bandas imunorreativas à GAP-43 total em um dos animais representativos do grupo Sham e do grupo estimulado. A expressão da proteína ERK total foi usada como controle endógeno para normalização dos dados. A figura 16 B ilustra a diferença quantitativa observada entre os grupos na razão GAP-43 total /ERK total.

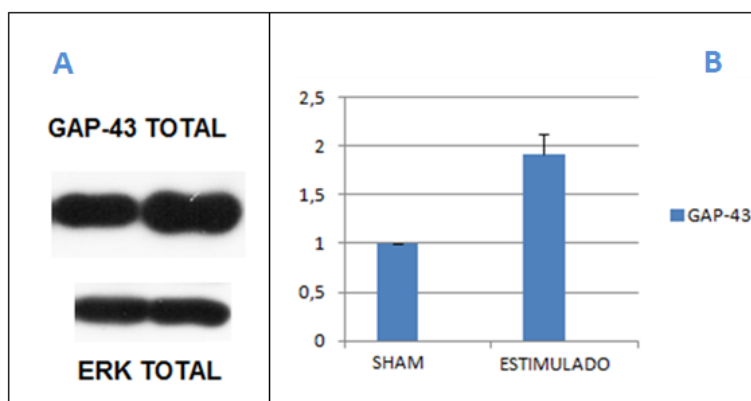


Figura 16: Aumento na expressão da proteína GAP-43 Total nos animais estimulados (bandas da direita) em relação aos não estimulados (bandas da esquerda). Os valores obtidos foram normalizados pela expressão da ERK TOTAL. O gráfico mostra o aumento significativo

observado no hemisfério direito do grupo estimulado em relação ao mesmo hemisfério do grupo *sham* ($p = 0,0327$).

7. DISCUSSÃO

O crescente número de artigos científicos publicados sobre os efeitos eletrofisiológicos e comportamentais benéficos da ETCC em humanos tem estimulado vários autores a investigar potenciais mecanismos envolvidos com tais efeitos em animais experimentais. Um argumento importante para estes estudos é o de que insultos neurológicos induzidos por isquemia, traumas mecânicos ou epilepsia, induzem por si mesmos, alterações plásticas no tecido nervoso (GONZALEZ E KOLB, 2003). Algumas evidências obtidas em ratos indicam um efeito modulatório da ETCC sobre estes mecanismos plásticos ativados pela injúria. Yoon e colaboradores (2012), utilizando imunohistoquímica para a proteína GAP-43 mostraram que um aumento na imunorreatividade a esta molécula ocorre na zona de penumbra após um insulto isquêmico, podendo este efeito ser intensificado pela ETCC-A apenas quando a mesma é aplicada 7 dias após este insulto. No presente estudo, hipotetizamos que na ausência de qualquer insulto neurológico ou lesão induzida pela intensidade de corrente, um dos mecanismos envolvidos com os efeitos da aplicação repetitiva de ETCC-A seria um aumento na expressão de proteínas envolvidas com a ativação sináptica e para isto, avaliamos a expressão da GAP-43 total no hemisfério estimulado. GAP-43 é uma proteína ligada à membrana plasmática e encontrada em cones de crescimento axonal, sendo sintetizada durante o processo de estabelecimento das sinapses ou de regeneração neuronal (STROEMER et al., 1995). Aumentos na expressão desta proteína ou em moléculas como a sinaptofisina, por exemplo, vêm sendo apontados como uma evidência de ativação neuroplástica (EVANS & COUSIN, 2005). Os resultados aqui obtidos, utilizando análise por Western blot, corroboraram a nossa hipótese, evidenciando um aumento de aproximadamente 90% nos níveis da GAP-43 total no córtex cerebral ipsilateral à estimulação, comparado ao observado no grupo Sham. Considerando que a estimulação foi realizada por apenas 5 dias, tais achados sugerem que sob condições fisiológicas normais, alterações na expansão axonal de neurônios corticais podem ser um dos efeitos primários induzidos pela ETCC-A e não apenas um efeito modulatório sobre mecanismos de plasticidade induzida por insultos. Relação entre níveis de GAP-43 e indução de potenciação a longo prazo (LTP) vem sendo

descrita por alguns autores. Nangung e colaboradores (1997) mostraram que no hipocampo, a indução de LTP ativa o promotor do gene para GAP-43 em células do hilo, podendo esta proteína estar envolvida na duração desta potenciação. Hulo e colaboradores (2002) complementaram esta análise, mostrando que mesmo que a GAP-43 não seja necessária para a indução de LTP, a sua fosforilação pode regular as propriedades pré-sinápticas afetando assim a plasticidade e a indução da LTP. Evidências farmacológicas mais recentes têm ampliado o conhecimento sobre a atuação da GAP-43, indicando a sua participação em vários fenômenos que contribuem para alterações na membrana sináptica de animais adultos, participando da liberação de neurotransmissores, endocitose, reciclagem das vesículas sinápticas, e formação de memórias (DENNY, 2006). Assim, levando em consideração as evidências eletrofisiológicas obtidas em animais saudáveis de que a ETCC-A pode induzir LTP ou mesmo aumentar a excitabilidade do córtex cerebral (FREGNI et al., 2007), um aumento na expressão da proteína GAP-43 total, observado no presente estudo, pode representar um dos potenciais mecanismos envolvidos com tais alterações. Para reforçar esta hipótese, futuros experimentos serão realizados no sentido de analisar se a ETCC-A é capaz de aumentar a expressão da forma fosforilada da GAP-43, envolvida na estabilização sináptica e na modulação da LTP.

Análise da imunorreatividade à proteína GFAP realizada em 5 animais do grupo submetido à ETCC-A não evidenciou alterações fenotípicas ou um aparente aumento na densidade de astrócitos no córtex parietal subjacente ou lateral ao ponto de estimulação. Tais resultados são similares aos obtidos recentemente por Rueger e colaboradores (2012) que realizaram o tratamento com a ETCC-A e estimulação transcraniana por corrente contínua catódica (ETCC-C) por 5 dias consecutivos e analisou o cérebro 3 dias após a estimulação. A ausência de uma astrogliose induzida pela ETCC-A é coerente com as evidências aqui obtidas por hematoxilina-eosina ou Fluoro Jade C de que o protocolo adotado não induz lesão tecidual. Por outro lado, sugere que potenciais alterações na remodelagem sináptica ou mesmo na liberação de alguns neurotransmissores, potencialmente induzidos pela ETCC-A, não envolve a participação de um maior número de astrócitos corticais. No entanto, não podemos descartar a potencial ação dos astrócitos nos efeitos induzidos pela ETCC-A. Utilizando ratos Sprague-Dowley, Wachter e colaboradores (2011) demonstraram que este tipo de estimulação é capaz de aumentar o fluxo sanguíneo cerebral, o qual envolve uma

intensa participação astrocitária na modulação fina do acoplamento da unidade neuro-vascular formada pelos microvasos, glia e neurônios. Uma modulação indireta do fluxo sanguíneo cerebral via acoplamento desta unidade tem sido apontada recentemente por Mielke e colaboradores (2013) como um possível mecanismo envolvido nos efeitos da ETCC- A ou ETCC-C. Estes autores mostraram que a ETCC-C, utilizando uma corrente de elevada intensidade (600 μ A), induz redução a longo prazo no fluxo sanguíneo cerebral, mas, tal efeito, apesar de envolver lesão tecidual e necrose em astrócitos da região limitante à lesão histológica, não induz astrogliose nesta região.

A participação ativa da microglia em fenômenos que alteram a excitabilidade cortical e especialmente na modelagem sináptica que ocorre em condições fisiológicas ou patológicas (KETTENMANN et al, 2011) motivou a investigação das repercussões da ETCC-A sobre a reatividade destas células. Rueger e colaboradores, (2012), utilizando ratos anestesiados, descreveram que tanto a ETCC-A como a ETCC-C com intensidade de 500 μ A são capazes de aumentar o número de células da microglia no córtex ipsilateral à estimulação, em relação ao hemisfério contralateral. No entanto, estes autores não investigaram o efeito do procedimento cirúrgico per si nem descreveram a extensão deste efeito ao longo das camadas corticais e dos planos antero-posterior ou latero medial passando pelo ponto de estimulação. Neste estudo, verificamos que o procedimento cirúrgico associado à manutenção do tubo, na ausência de estimulação, foi capaz de aumentar a área imunorreativa à proteína IBA-1, sem alterar o fenótipo ou a intensidade de marcação da microglia do córtex ipsilateral à presença do tubo de estimulação. Tal efeito ocorreu apenas nas camadas mais superficiais do córtex, localizadas entre 350 e 700 μ m de profundidade e foi mais restrito no plano latero-medial do que o observado nos animais estimulados. Nestes últimos, a análise das alterações no padrão de imunorreatividade à proteína IBA-1 revelou um aumento na expressão desta proteína até camadas mais profundas do córtex (de 700 a 1050 μ m de profundidade), principalmente na região subjacente ao ponto de estimulação. Embora a extensão da reatividade microglial não tenha sido uniforme entre os animais estimulados, alterações fenotípicas nestas células, caracterizadas por espessamento de seus corpos celulares e extensão de seus prolongamentos foram observadas em todos eles, sugerindo um processo de reatividade microglial.

Efeitos de ativação microglial podem ser variáveis e dependem da natureza do estímulo desencadeador, da heterogeneidade da microglia e de outros aspectos, podendo

estar envolvidos com crescimento neurítico, remodelagem sináptica e excitabilidade (KETTENMANN et al., 2013). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a ativação da microglia induz um rápido aumento nas correntes pos-sinápticas excitatórias espontâneas e que estes efeitos dependem da liberação de pequenas quantidades de ATP, o qual estimula os astrócitos na amplificação destes efeitos (PASCUAL et al., 2011). Como membros da sinapse quadripartite, a microglia participa ativamente no processo de eliminação e estabilização das sinapses em condições fisiológicas normais (SCHAFER et al., 2013). Enquanto os astrócitos são componentes estáveis das sinapses, prolongamentos da microglia podem exibir movimentos dinâmicos os quais podem estabelecer contatos transitórios e frequentes com neurônios e astrócitos na unidade quadripartite (KETTENMANN et al., 2013).

Assim, na ausência de lesões detectáveis e na presença de elevados níveis da proteína GAP-43, é possível que o aumento na expressão da proteína IBA-1 associado a uma alteração fenotípica da microglia seja mais um dos mecanismos através dos quais a ETTC-A exerça seus efeitos sobre a excitabilidade e plasticidade sináptica do córtex cerebral de ratos. No entanto, considerando que Rueger e colaboradores (2012) também observaram um maior número de células da microglia após a ETCC-C, é possível que esta reação microglial não dependente de polaridade exerça efeitos modulatórios diversos sobre o córtex estimulado. No sentido de corroborar esta hipótese, tornam-se necessários experimentos futuros que investiguem marcadores moleculares de atividade microglial benéfica após estes tipos de estimulação.

8. CONCLUSÃO

Os achados deste estudo permitem a conclusão de que a ETCC anódica é capaz de induzir modificações na organização celular e molecular do córtex cerebral no seu estado basal, sem a presença de patologias associadas. Tais alterações ocorrem ainda na ausência de possíveis lesões provocadas pelo uso da corrente direta ou procedimento cirúrgico necessário ao implante do eletrodo.

Todos em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a ETTC-A em animais saudáveis é capaz de induzir efeitos moleculares e celulares os quais em concerto podem favorecer alterações neuroplásticas capazes de modificar a excitabilidade do córtex cerebral.

9. PERSPECTIVAS

Como experimentos futuros a serem realizados para corroborar as hipóteses levantadas diante dos resultados obtidos, pretendemos:

- 1) Quantificar os níveis de GAP-43 fosforilada no córtex cerebral submetido à ETCC-A com intensidade igual à utilizada no presente estudo.
- 2) Analisar o fenótipo da microglia reativa nos grupos Sham e estimulado pela ETCC utilizando marcadores para IGF-1 e complexo MHC
- 3) Analisar pela técnica de Western blot os níveis de subunidades de receptores AMPA e NMDA no córtex cerebral submetido à ETTC-A
- 4) Analisar os efeitos da ETCC catódica sobre os níveis da GAP-43 total e fosforilada.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, L.N.; CAUMO, W.; LASTE, G.; FERNANDES MEDEIROS, L.; RIPOLL ROZISKY, J., DE SOUZA, A.; FREGNI, F.; TORRES, I.L. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. **Brain Res.**, 13, 1489, 17-26, Dec, 2012.
- AGARWAL, S.M.; SHIVAKUMAR, V.; BOSE, A.; SUBRAMANIAM, A.; NAWANI, H.; CHHABRA, H.; KALMADY, S.V.; NARAYANASWAMY, J.C.; VENKATASUBRAMANIAN, G. Transcranial Direct Current Stimulation in Schizophrenia. **Clin Psychopharmacol Neurosci.**, 11, 3, 118-125. Dec, 2013.
- ANTAL A, PAULUS W. Transcranial magnetic and direct current stimulation in the therapy of pain. **Schmerz.**, 24, 2, 161-6. Apr, 2010.
- BARGIOTAS, P.; MONYER, H.; SCHWANINGER, M. Hemichannels in cerebral ischemia. **Curr Mol Med.**, 9, 2, 186-94, Mar, 2009.
- BEN TAIB N.O.; MANTO, M. Trains of transcranial direct current stimulation antagonize motor cortex hypoexcitability induced by acute hemispherectomy. **J Neurosurg.**, 111, 4, 796-806, Oct, 2009.
- BERLIM, M.T.; VAN DEN EYNDE, F.; DASKALAKIS, Z.J. Clinical utility of transcranial direct current stimulation (tDCS) for treating major depression: a systematic review and meta-analysis of randomized, double-blind and sham-controlled trials. **J Psychiatr Res.**, 47, 1, Jan, 2013.
- BINDER, S.; RAWOHL, J.; BORN, J.; MARSHALL, L. Transcranial slow oscillation stimulation during nrem sleep enhances acquisition of the radial maze task and modulates cortical network activity in rats. **FRONT BEHAV NEUROSCI.**, 8, 7, 220, JAN, 2014.
- BINDMAN, L.J.; LIPPOLD, O.C.; REDFEARN, J.W. Long-lasting changes in the level of the electrical activity of the cerebral cortex produced by polarizing currents. **Nature.** 196, 584-5, Nov 10, 1962.
- BINDMAN LJ, LIPPOLD OC, REDFEARN JW. The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. **J Physiol.**, 172, 369-82, Aug, 1964.
- BOGGIO, P.S.; RIGONATTI, S.P.; RIBEIRO, R.B.; MYCZKOWSKI, M.L.; NITSCHKE, M.A.; PASCUAL-LEONE, A.; FREGNI, F. A randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression. **Int J Neuropsychopharmacol.**, 11, 2, 249-54, Mar, 2008.

- BRUNONI, A.R.; FREGNI, F.; PAGANO, R.L. Translational research in transcranial direct current stimulation (tDCS): a systematic review of studies in animals. **Rev Neurosci.**, 22, 4, 471-81, 2011.
- CREUTZFELDT, O.; STRUCK, G. Neurophysiology and morphology of the chronically isolated cortical islet in the cat: brain potentials and neuron activity of an isolated nerve cell population without afferent fibers. **Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr.**, 203, 708-31, 1962.
- DENNY, J.B. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. **Curr Neuropharmacol.**, 4, 4, 293-304, Oct, 2006.
- DOCKERY, C.A.; LIEBETANZ, D.; BIRBAUMER, N.; MALINOWSKA, M.; WESIERSKA, M.J. Cumulative benefits of frontal transcranial direct current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats. **Neurobiol Learn Mem.** 96, 3, 452-460, Oct., 2011.
- ELSNER, B.; KUGLER, J.; POHL, M.; MEHRHOLZ, J. Transcranial direct current stimulation (tDCS) for improving function and activities of daily living in patients after stroke. **Cochrane Database Syst Rev.** 15, 11, Nov , 2013.
- EVANS, G.J.; COUSIN, M.A. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. **Biochem Soc Trans.**, 33 (Pt 6), 1350-3, Dec, 2005.
- FREGNI, F.; LIEBETANZ, D.; MONTE-SILVA, K.K.; OLIVEIRA, M.B.; SANTOS, A.A.; NITSCHKE, M.A.; PASCUAL-LEONE, A.; GUEDES, R.C. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. **Exp Neurol.** 204, 1, 462-466, Mar, 2007.
- GARTSIDE, I.B. Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurones in the rat cerebral cortex after polarization: role of protein synthesis. **Nature**, 220, 383-384, 1968.
- GOLDENSOHN, E.S.; PORTER, R.J.; SCHWARTZKROIN, P.A. The American Epilepsy Society: an historic perspective on 50 years of advances in research. **Epilepsia.**, 38, 1, 124-50, Jan, 1997.
- GONZALEZ, C.L.; KOLB, B. A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. **Eur J Neurosci.**, 18, 7, 1950-62, Oct, 2003.
- HULO, S.; ALBERI, S.; LAUX, T.; MULLER, D.; CARONI, P. A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity. **Eur J Neurosci.**, 16, 7, 1406, Oct, 2002.
- JIANG, T.; XU, R.X.; ZHANG, A.W.; DI, W.; XIAO, Z.J.; MIAO, J.Y.; LUO, N.; FANG, Y.N. Effects of transcranial direct current stimulation on

- hemichannel pannexin-1 and neural plasticity in rat model of cerebral infarction. **Neuroscience.**, 13, 226, 421-6, Dec, 2012.
- KAMIDA, T.; KONG, S.; ESHIMA, N.; ABE, T.; FUJIKI, M.; KOBAYASHI, H. Transcranial direct current stimulation decreases convulsions and spatial memory deficits following pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats. **Behav Brain Res.**, 217, 1, 99-103, Feb 2, 2011.
- KAMIDA, T.; KONG, S.; ESHIMA, N.; FUJIKI, M. Cathodal transcranial direct current stimulation affects seizures and cognition in fully amygdala-kindled rats. **Neurol Res.**, 35, 6, 602-607, Jul, 2013.
- KEMP, R.W. Handling and restraint. In: The laboratory rat. **editora Elsevier Ltd**, 31-43, 2000.
- KENNEDY R, MITTAL D, O'JILE J. Electroconvulsive therapy in movement disorders: an update. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.** 15, 4, 407-421, 2003.
- KETTENMANN, H.; HANISCH, U.K.; NODA, M.; VERKHRATSKY, A. Physiology of microglia. **Physiol Rev.**, 91, 2, 461-553, Apr, 2011.
- KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. **Neuron.**, 77, 1, 10-8, Jan, 2013.
- KIM, S.J.; KIM, B.K.; KO, Y.J.; BANG, M.S.; KIM, M.H.; HAN, T.R. Functional and histologic changes after repeated transcranial direct current stimulation in rat stroke model. **J Korean Med Sci.**, 25,10,1499-1505, Oct, 2010.
- KOCH G. Do Studies on Cortical Plasticity Provide a Rationale for Using Non-Invasive Brain Stimulation as a Treatment for Parkinson's Disease Patients? **Front Neurol**, 6, 4, 180, Nov, 2013.
- LASTE, G.; CAUMO, W.; ADACHI, L.N.; ROZISKY, J.R.; DE MACEDO, I.C.; FILHO P.R.; PARTATA, W.A.; FREGNI,F.; TORRES, I.L. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Exp Brain Res.**, 221,1, 75-83, Aug, 2012.
- LI, Y.; TIAN, X.; QIAN, L.; YU, X.; JIANG, W. Anodal transcranial direct current stimulation relieves the unilateral bias of rat model of Parkinson's disease. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.**, 765-8, 2011.
- LIEBETANZ, D.; NITSCHKE, M.A.; TERGAU, F.; PAULUS. W. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. **Brain.**, 125(Pt 10), 2238-2247, Oct, 2002.

- LIEBETANZ, D.; FREGNI, F.; MONTE-SILVA, K.K.; OLIVEIRA, M.B.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; NITSCHKE, M.A.; GUEDES, R.C. After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. **Neurosci Lett.**, 398, (1-2), 85-90, May, 2006a.
- LIEBETANZ, D.; KLINKER, F.; HERING, D.; KOCH, R.; NITSCHKE, M.A.; POTSCHKA, H.; LÖSCHER, W.; PAULUS, W.; TERGAU, F. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focalepilepsy. **Epilepsia**, 47, 7, 1216-1224, Jul, 2006b.
- LIEBETANZ, D.; KOCH, R.; MAYENFELS, S.; KÖNIG, F.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M.A. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. **Clin Neurophysiol.**, 120, 6, 1161-1167, Jun, 2009.
- LIEBETANZ, D.; KOCH, R.; MAYENFELS, S.; KÖNIG, F.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M.A. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. **Clin Neurophysiol.**, 120, 6, 1161-7, Jun, 2009.
- MAGIS D, JENSEN R, SCHOENEN J. Neurostimulation therapies for primary headache disorders: present and future. **Curr Opin Neurol.**, 25, 3, 269-276, Jun , 2012.
- MIELKE, D.; WREDE, A.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; TAGHIZADEH-WAGHEFI, A.; NITSCHKE M.A.; ROHDE, V.; LIEBETANZ, D. Cathodal transcranial direct current stimulation induces regional, long-lasting reductions of cortical blood flow in rats. **Neurol Res.**, 35, 10, 1029-37 , Dec, 2013.
- MONTE-SILVA K., RUGE D, TEO JT, PAULUS W, ROTHWELL JC, NITSCHKE MA. d2 receptor block abolishes θ burst stimulation-induced neuroplasticity in the human motor cortex. **neuropsychopharmacology.**, 36, 10, 2097-102, SEP 2011.
- MONTE-SILVA, K.; KUO, M.F.; HESSENTHALER, S.; FRESNOZA, S.; LIEBETANZ, D.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M.A. Induction of late ltp-like plasticity in the human motor cortex by repeated non-invasive brain stimulation. **BRAIN STIMUL.**, 6, 3, 424-32, MAY, 2013.
- MONTE-SILVA, K.; KUO, M.F.; THIRUGNANASAMBANDAM, N.; LIEBETANZ, D.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M.A. Dose-dependent inverted u-shaped effect of dopamine (d2-like) receptor activation on focal and nonfocal plasticity in humans. **J NEUROSCI.**, 29, 19, 6124-31, MAY, 2009.
- NAMGUNG, U.; MATSUYAMA, S.; ROUTTENBERG, A. Long-term potentiation activates the GAP-43 promoter: selective participation of hippocampal mossy cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 94, 21, 11675-80, Oct, 1997.

- NITSCHKE, M. A.; PAULUS, W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. **J Physiol**, 527 Pt 3, 633-639, Sep 15, 2000.
- NITSCHKE, M.A.; FRICKE, K.; HENSCHKE, U.; SCHLITTERLAU, A.; LIEBETANZ, D.; LANG, N.; HENNING, S.; TERGAU, F.; PAULUS, W. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. **J Physiol.**, 553, 293-301, Nov, 2003.
- NITSCHKE, M.A.; LIEBETANZ, D.; LANG, N.; ANTAL, A.; TERGAU, F.; PAULUS, W. Safety criteria for transcranial direct current stimulation (tDCS) in humans. **Clin Neurophysiol.**, 114, 11, 2220-2, Nov, 2003.
- NITSCHKE, M.A.; JAUSSE, W.; LIEBETANZ, D.; LANG, N.; TERGAU, F.; PAULUS, W. Consolidation of human motor cortical neuroplasticity by D-cycloserine. **Neuropsychopharmacology.**, 29, 8, 1573-8, Aug, 2004.
- NITSCHKE, M.A.; LIEBETANZ, D.; SCHLITTERLAU, A.; HENSCHKE, U.; FRICKE, K.; FROMMANN, K.; LANG, N.; HENNING, S.; PAULUS, W.; TERGAU, F. GABAergic modulation of DC stimulation-induced motor cortex excitability shifts in humans. **Eur J Neurosci.**, 19, 10, 2720-6, May, 2004.
- NITSCHKE, M.A.; GRUNDEY, J.; LIEBETANZ, D.; LANG, N.; TERGAU, F.; PAULUS, W. Catecholaminergic consolidation of motor cortical neuroplasticity in humans. **Cereb Cortex.**, 14, 11, 1240-5, Nov, 2004.
- NITSCHKE, M.A.; LAMPE, C.; ANTAL, A.; LIEBETANZ, D.; LANG, N.; TERGAU, F.; PAULUS, W. Dopaminergic modulation of long-lasting direct current-induced cortical excitability changes in the human motor cortex. **Eur J Neurosci.**, 23, 6, 1651-7, Mar, 2006.
- NITSCHKE, M.A.; DOEMKES, S.; KARAKÖSE, T.; ANTAL, A.; LIEBETANZ, D.; LANG, N.; TERGAU, F.; PAULUS, W. Shaping the effects of transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. **J Neurophysiol.**, 97, 4, 3109-17, Apr, 2007.
- NITSCHKE, M. A.; COHEN, L. G.; WASSERMANN, E. M.; PRIORI, A.; LANG, N.; ANTAL, A.; PAULUS, W.; HUMMEL, F.; BOGGIO, P. S.; FREGNI, F.; PASCUAL-LEONE, A. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. **Brain Stimul.**, 1, 3, 206-223, Jul, 2008.
- NITSCHKE, M.A.; PAULUS, W. Noninvasive brain stimulation protocols in the treatment of epilepsy: current state and perspectives. **Neurotherapeutics**, 6, 2, 244-250, Apr, 2009.
- NITSCHKE, M.A.; KUO, M.F.; KARRASCH, R.; WÄCHTER, B.; LIEBETANZ, D.; PAULUS, W. Serotonin affects transcranial direct current-induced neuroplasticity in humans. **Biol Psychiatry.**, 66, 5, 503-8, Sep 1, 2009.

- PASCUAL, O.; BEN ACHOUR, S.; ROSTAING, P.; TRILLER, A.; BESSIS, A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 109, 4, E197-205, Jan, 2012.
- PAULUS, W. Transcranial direct current stimulation (tDCS). **Suppl Clin Neurophysiol.**, 56, 249-54, 2003.
- PAULUS, W. Transcranial electrical stimulation (tES - tDCS; tRNS, tACS) methods. **Neuropsychol Rehabil.**, 21, 5, 602-17, Oct, 2011.
- PICCOLINO, M. Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani. **Brain Res Bull.** 46, 5, 381-407, Jul 15, 1998.
- PRIORI, A.; BERARDELLI, A.; RONA, S.; ACCORNERO, N.; MANFREDI, M. Polarization of the human motor cortex through the scalp. **Neuroreport.**, 9, 10, 2257-60, Jul, 1998.
- PURPURA, D.P.; MCMURTRY J.G. Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. **J Neurophysiol.**, 28, 166-85, Jan, 1965.
- RUEGER, M.A.; KEUTERS, M.H.; WALBERER, M.; BRAUN, R.; KLEIN, R.; SPARING, R.; FINK, G.R.; GRAF, R.; SCHROETER, M. Multi-session transcranial direct current stimulation (tDCS) elicits inflammatory and regenerative processes in the rat brain. **PLoS One.**, 7, 8, 2012.
- SCHAFER, D.P.; LEHRMAN, E.K.; STEVENS, B. The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia.**, 61, 1, 24-36, Jan, 2013.
- STROEMER, R.P.; KENT, T.A.; HULSEBOSCH, C.E. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. **Stroke.**, 26, 11 2135-44, Nov, 1995.
- TAKANO, Y.; YOKAWA, T.; MASUDA, A.; NIIMI, J.; TANAKA, S.; HIRONAKA, N. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. **Neurosci Lett.**, 491, 1, 40-3, Mar, 2011.
- TALELLI, P.; ROTHWELL, J. Does brain stimulation after stroke have a future? **Curr Opin Neurol.**, 19, 6, 543-50, Dec, 2006.
- UTZ, K. S.; DIMOVA, V.; OPPENLÄNDER, K.; KERKHOFF, G. Electrified minds: transcranial direct current stimulation (tDCS) and galvanic vestibular stimulation (GVS) as methods of non-invasive brain stimulation in neuropsychology—a review of current data and future implications. **Neuropsychologia**, 48, 10, 2789-2810, 2010.

WACHTER, D.; WREDE, A.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; TAGHIZADEH-WAGHEFI, A.; NITSCHKE, M.A.; KUTSCHENKO, A.; ROHDE, V.; LIEBETANZ, D. Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. **Exp Neurol.**, 227,2, 322-7, Feb, 2011.

WILLIAMS, J.A.; IMAMURA, M.; FREGNI, F. Updates on the use of non-invasive brain stimulation in physical and rehabilitation medicine. **J Rehabil Med.** 41, 5, 305-311, Apr, 2009.

YOON,K.J.; OH,B.M.; KIM,D.Y.Functional improvement and neuroplastic effects of a nodal transcranial direct current stimulation (tDCS) delivered 1 day vs. 1 week after cerebral ischemia in rats. **Brain Res.**, 3, 1452, 61-72, May, 2012.

ZOBEIRI, M.; VAN LUIJTELAAR, G. Noninvasive transcranial direct current stimulation in a genetic absence model. **Epilepsy Behav.**, 26, 1, 42-50, Jan, 2013.