



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE
CONTÍNUA CEREBELAR SOBRE O APRENDIZADO MOTOR DE
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Marina Almeida de Mello

RECIFE | 2016

Marina Almeida de Mello

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE
CONTÍNUA CEREBELAR SOBRE O APRENDIZADO MOTOR DE
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós Graduação em Neuropsiquiatria e
Ciências do Comportamento como requisito
parcial para obtenção do título de mestre da
aluna Marina Almeida de Mello

Orientadora: Prof^a Kátia Karina Monte-Silva

RECIFE | 2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M527e Mello, Marina Almeida de.
Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar sobre o aprendizado motor de indivíduos saudáveis / Marina Almeida de Mello. – 2016.
91 f.: il.; 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. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Cerebelo. 2. Aprendizagem seriada. 3. Estimulação elétrica. 4. Estimulação transcraniana por corrente contínua. I. Monte-Silva, Kátia Karina do (Orientadora). II. Título.

612.665 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2016-237)

MARINA ALMEIDA DE MELLO

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA
CEREBELAR SOBRE O APRENDIZADO MOTOR DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Aprovado em: 01/04/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Drº. Marcelo Cairrão Araujo Rodrigues

(Presidente da Banca)

Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Drª. Karla Mônica Ferraz Lambertz

Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Drª Silvia Gomes Laurentino

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maria do Socorro de Mello e João Vicente de Mello, por todo suporte e incentivo e por sempre acreditarem em mim. Obrigada pelos conselhos e pelas vibrações a cada conquista. Obrigada também por aceitarem, neste momento conturbado, a minha necessidade de voar pelas minhas próprias asas e por estarem sempre a postos caso eu precise de ajuda.

Ao meu namorado, Alexandre Agra, por todo apoio nessa nossa vida juntos. Por todas as vezes que você me ouviu e me aconselhou. Obrigada, sobretudo, por todas as alegrias partilhadas nessa nossa aventura juntos.

À minha prima e irmã, Renata Almeida, minha melhor amiga desde que eu nem sabia falar e que me apoia em todas as minhas escolhas. À minha irmã, Marisa Mello, que, apesar das brigas, sempre esteve do meu lado.

À Mayara Câmpelo, que dividiu os primeiros meses de independência comigo. Apesar de nossas personalidades tão diferentes, foi um prazer ser sua colega de apartamento e dividir tantos momentos bons e ruins com você. À Thyciane Mendonça e Plínio Luna, que também me ajudaram nessa transição.

Aos participantes do LANA, que me ajudaram em todas as etapas deste trabalho. Lorena Melo, que dividiu comigo os desafios e descobertas do cerebelo. Sérgio Rocha, que me ajudou a decifrar a estatística. Adriana Baltar, que sempre estendeu sua mão amiga para me salvar em qualquer dificuldade encontrada nesse trajeto no mestrado. Todos os outros que ajudaram na coleta, revisaram a escrita, assistiram prévias e dividiram seus dias comigo.

À minha orientadora, Kátia Karina Monte-Silva, por me dar a oportunidade de trabalhar no LANA e me dedicar à neurociência com um grupo tão competente. Pelo apoio

em todas as fases desse trabalho e pela dedicação e esforço para a conclusão dessa dissertação.

A todos os voluntários que participaram das pesquisas apresentadas nessa dissertação. Também à todos os funcionários da posneuro e do departamento de fisioterapia pelo suporte e pela competência no trabalho.

RESUMO

Vários estudos têm sugerido que o cerebelo tem um papel crucial no aprendizado motor. Pesquisas sobre o efeito da estimulação cerebelar na excitabilidade cortical vêm sendo desenvolvidas, porém, a influência da polaridade da estimulação, assim como a lateralidade dos efeitos não são bem esclarecidos. Outra lacuna é o efeito da estimulação sobre funções motoras não específicas, como o aprendizado motor medido através do tempo de reação serial (TRS), e tarefas motoras complexas, como o teste de escrita, podendo ter estes teste resultados divergentes devido a diferentes mecanismos responsáveis por sua execução. Portanto, a presente dissertação é composta de dois estudos. O primeiro estudo teve como objetivo investigar os efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar (ETCCc) sobre a excitabilidade do córtex motor primário ipsilateral e o aprendizado motor realizado com o membro superior contralateral em indivíduos saudáveis. Nele foram analisados os efeitos polaridade-dependente da ETCCc sobre o aprendizado e sobre a excitabilidade cortical de 15 indivíduos saudáveis. Para isso, um estudo crossover, controlado, pseudo-randomizado e triplo cego foi realizado. Os resultados deste estudo são apresentados no artigo original intitulado "Effect of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on ipsilateral primary motor cortex excitability and on motor learning in the contralateral upper limb." e sugerem que a ETCCc independente da polaridade não foi capaz de modular a excitabilidade do córtex motor primário ipsilateral à estimulação, mas atrapalhou o aprendizado motor implícito do membro superior contralateral. O segundo estudo teve como objetivo investigar os efeitos dependente da polaridade da modulação cerebelar induzida pela ETCCc sobre duas formas de aprendizado, um implícito e não específico, medido através do TRS, e um complexo, observado no teste de escrita de indivíduos saudáveis. Tratou-se de um estudo crossover, controlado, pseudo-randomizado e triplo cego, no qual 12 voluntários saudáveis foram submetidos a três sessões de ETCCc (anódica, catódica e sham) e avaliados através de parâmetros da escrita e do TRS. Os resultados deste estudo são apresentados no artigo original "Effect of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on procedural learning and handwriting" e apontam para uma piora no aprendizado motor medido pelo tempo de reação serial e melhora no teste de escrita após de estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar catódica, e uma piora no teste de escrita após estimulação anódica. Os resultados apresentados nesta dissertação confirmam a influência do cerebelo tanto no membro contralateral como no ipsilateral, sendo o último com o qual tem ligações diretas. Também foi possível confirmar que tarefas com diferentes complexidades podem apresentar desempenhos divergentes após ETCCc. Esses achados contribuem para compreensão das funções cerebelares e podem, futuramente, guiar o desenvolvimento de protocolos ideias para o uso da ETCCc como ferramenta de reabilitação de pacientes com desordens cerebelares.

Palavras-chave: Cerebelo. Aprendizagem seriada. Estimulação elétrica. Estimulação transcraniana por corrente contínua.

ABSTRACT

Several studies have suggested that the cerebellum plays a crucial role on motor learning. Research about the effect of cerebellar stimulation on cortical excitability have been developed, however, the influence of the stimulation polarity, and the laterality of the effects are not fully understood. Another gap is the effect of stimulation on non-specific motor functions, such as the motor learning measured by serial reaction time (SRT), and complex motor tasks such as handwriting test. Those tests might have divergent results due to different mechanisms responsible for their implementation. Thus, the present thesis is composed of studies. The first one aimed to investigate the effects of transcranial stimulation current cerebellar continuous (ctDCS) on the cortical excitability of contralateral M1 and motor learning on contralateral limb in healthy subjects. For this, the effects of ctDCS on motor learning and cortical excitability were assessed in 15 health subjects in a crossover and sham controlled design. The results for this study are presented on the original research paper "Effect of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on ipsilateral primary motor cortex excitability and on motor learning in the contralateral upper limb" and suggest that ctDCS, regardless polarity, was not able to modulate ipsilateral M1 cortical excitability while both anodal and cathodal ctDCS over the cerebellar cortex have disrupted motor learning with contralateral limb. The second study aimed to investigate the effects of cerebellar modulation induced by ctDCS on two forms of learning, the first implicit and non-specific, measured by the serial reaction time task (SRTT), and the second a complex, assessed by handwriting test in healthy subjects. For this, it was adopted a crossover and sham controlled design, in which 12 healthy volunteers underwent three tDCS sessions (anodal, cathodal and sham stimulation) and assessed by SRTT and handwriting test. Results for this study are presented on the original research paper "Effect of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on procedural learning and handwriting" and show that both anodal and cathodal ctDCS impaired the procedural learning assessed by SRTT. For the handwrite teste, cathodal cerebellar tDCS enhanced motor learning while anodal stimulation impaired it. The results shown in this thesis confirm the cerebellar influence in both ipsi and contralateral limbs, the latter being the one it has direct connections. It was also possible to confirm that tasks with different complexities can have divergent performances after ctDCS. This findings contribute to an understanding of cerebellar functions and could, in the future, guide the development of optimal protocols for ctDCS in patients with cerebellar disorders.

Key words: Cerebellum. Serial learning. Electric stimulation. Transcranial direct current stimulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	<i>2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl) propanoic acid</i>
CBI	<i>cerebellar brain inhibition</i>
CENTRAL	<i>cochrane central register of controlled trials</i>
CINAHL	<i>cumulative index to nursing and allied health literature</i>
cNIBS	<i>cerebellar non invasive brain stimulation</i>
crTMS	<i>cerebellar repetitive transcranial magnetic stimulation</i>
ctDCS	<i>cerebelar transcranial direct current stimulation</i>
cm ²	centímetros quadrados
ECT	eletroconvulsoterapia
EMT	estimulação magnética transcraniana
EMTr	estimulação magnética transcraniana repetitiva
ETCC	estimulação transcraniana por corrente contínua
ETCCc	estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
HADS	<i>hospital anxiety and depression scale</i>
LANA	Laboratório de Neurociência Aplicada
LILACS	literatura latino-americana e do caribe em ciências da saúde
LTD	<i>long term depression</i>
LTP	<i>long term potentiaton</i>
mA	miliampére
M1	córtex motor primário
NIBS	<i>non invasive brain stimulation</i>
NMDA	n-metil d-aspartato
SNC	sistema nervoso central
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TRS	tempo de reação serial
UFPE	universidade federal de Pernambuco
WHO	<i>world health organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Esquema das três principais divisões funcionais do cerebelo.....	16
Principais circuitos corticais cerebelares.....	17
Procedimentos metodológicos do estudo 1.....	31
Procedimentos metodológicos do estudo 2.....	37

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	12
2	INTRODUÇÃO	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	CEREBELO.....	15
	<i>Anatomia</i>	<i>15</i>
	<i>Conexões</i>	<i>17</i>
	<i>Lateralidade</i>	<i>18</i>
3.2	APRENDIZADO MOTOR	19
3.3	FUNÇÕES COGNITIVAS	20
3.4	ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENE CONTÍNUA (ETCC)	21
	<i>Histórico.....</i>	<i>21</i>
	<i>Conceito</i>	<i>22</i>
	<i>Parâmetros de estimulação.....</i>	<i>23</i>
	<i>Mecanismos da ETCC</i>	<i>24</i>
	<i>Critérios de segurança</i>	<i>25</i>
3.5	USO DA ETCC NO CEREBELO	26
4	ESTUDO 1 – ENSAIO CLÍNICO 1	29
4.1	HIPÓTESE.....	29
4.2	OBJETIVOS.....	29
	<i>Objetivo geral.....</i>	<i>29</i>
	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>29</i>
4.4	MÉTODOS.....	29
	<i>Desenho, local e período do estudo</i>	<i>29</i>
	<i>Aspectos éticos</i>	<i>30</i>
	<i>População, amostra e critérios de elegibilidade.....</i>	<i>30</i>
	<i>Procedimentos experimentais.....</i>	<i>30</i>
	<i>Sessões de estimulação por corrente contínua</i>	<i>31</i>
	<i>Medidas de avaliação.....</i>	<i>32</i>
	• Tempo de reação serial (TRS).....	32
	• Avaliação da excitabilidade cortical	33
4.4	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	33
5	ESTUDO 2 – ENSAIO CLÍNICO 2	34
5.1	HIPÓTESE.....	34
5.2	OBJETIVO	34
5.3	MÉTODOS.....	35
	<i>Desenho, local e período do estudo</i>	<i>35</i>
	<i>Aspectos éticos</i>	<i>35</i>
	<i>População, amostra e critérios de elegibilidade.....</i>	<i>35</i>
	<i>Procedimentos experimentais.....</i>	<i>36</i>
	<i>Sessões de estimulação por corrente contínua</i>	<i>37</i>
	<i>Triagem clínica</i>	<i>38</i>
	• Inventário de Dominância Lateral de Edinburgh	38
	<i>Medidas de avaliação.....</i>	<i>38</i>
	• Avaliação dos níveis de fadiga e atenção	38

•	<i>Tempo de reação serial (TRS)</i>	38
•	<i>Teste de escrita</i>	39
5.4	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	39
	<i>Processamento dos dados</i>	39
	<i>Análise dos dados</i>	40
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	40
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE I – ARTIGO ORIGINAL (ESTUDO 1)	48
	APÊNDICE II – ARTIGO ORIGINAL (ESTUDO 2)	62
	APÊNDICE III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (ESTUDO 1)	78
	APÊNDICE IV – TRIAGEM CLÍNICA (ESTUDO 1 E 2)	82
	APÊNDICE V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (ESTUDO 2)	84
	ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (ESTUDO 1)	88
	ANEXO II – QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS DA APLICAÇÃO DA ETCC.....	89
	ANEXO III – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (ESTUDO 2)	90

1 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação faz parte da linha de pesquisa “Estimulações cerebrais não invasivas” do Laboratório de Neurociência Aplicada – LANA do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco. Os estudos realizados nesta linha de pesquisa têm direcionado a atenção para: (i) entender como as técnicas de estimulação transcraniana interferem no controle motor de sujeitos saudáveis, (ii) verificar as repercussões terapêuticas da aplicação das estimulações transcranianas na recuperação e/ou reabilitação de pacientes neurológicos (iii) associar o uso das estimulações transcranianas com técnicas tradicionais da fisioterapia e (iv) avaliar as condições fisiológicas e fisiopatológicas da excitabilidade cortical. A presente dissertação enquadra-se no primeiro tópico, já que se propôs a verificar os efeitos decorrentes da estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar no aprendizado motor de indivíduos saudáveis. A proposta surgiu após verificada a escassez de investigações envolvendo este tipo de estimulação e seu potencial reabilitador. A pesquisa foi realizada em dois estudos. O estudo 1 visava compreender a lateralidade da influência da estimulação do cerebelo, avaliando seu efeito no córtex motor ipsilateral e no membro contralateral. O estudo 2 investigou da estimulação do cerebelo sobre o aprendizado motor.

Os dados obtidos com este estudo resultaram em contribuições científicas, como: (i) apresentação em forma de pôster e publicação de resumo nos anais do IV simpósio internacional de neuromodulação, 2012, v1, p23. ISBN: 978-85-65408-01-1; (ii) publicação de resumo nos anais do II congresso Brasileiro de Fisioterapia Neurofuncional, 20012, v16 (2). ISSN:1413-355. O estudo 1 resultou no artigo original intitulado “Effect of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on ipsilateral primary motor cortex excitability and on motor learning in the contralateral upper limb” (**APÊNDICE I**) e o estudo 2 no original intitulado “Effect of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on procedural learning and handwriting” (**APÊNDICE II**).

2 INTRODUÇÃO

O cerebelo é uma estrutura multifuncional complexa, que possui ligações diretas e indiretas com quase todo o sistema nervoso central (SNC), estabelecendo importantes circuitos de controle através de conexões aferentes e eferentes (1). Suas funções primordiais são planejamento, iniciação, organização, estabilidade e memória de longo prazo dos movimentos (2). Sendo assim, o cerebelo é essencial para mudanças adaptativas no comportamento reflexo e é ativado durante o aprendizado motor (3-6), definido como uma mudança na direção e na precisão dos movimentos que persiste ao longo do tempo (7). As alterações necessárias para o aprendizado ocorrem através de conexões entre o cerebelo e o córtex motor primário (M1), estabelecidas por meio da via dentado-tálamo-cortical. Através dessa via, o cerebelo desempenha um papel importante na realização de movimentos especializados (8) além de modular a excitabilidade do córtex motor baseado em informações sensoriais aferentes (9).

Lesões no cerebelo ou em suas vias podem resultar em inúmeros sintomas motores e cognitivos, que dependem de qual área foi afetada (10-12). Os déficits motores, classicamente, estão relacionados com a patologia da ataxia cerebelar, que pode ser tanto hereditária como adquirida (13). Os pacientes atáxicos podem apresentar um grupo global de sintomas, que incluem hipotonia, assinergia, dismetria e discronometria. Outros sintomas específicos podem também aparecer dependendo da área afetada (11). No geral, existem três grupos de sintomas motores, divididos em relação à anatomia da lesão. Déficits no vestibulocerebelo resultam mais especificamente em comprometimento do equilíbrio corporal e os do espinocerebelo em comprometimento da marcha. Já as lesões no cerebrocerebelo resultam em dificuldade em planejar e realizar movimentos voluntários, tremor de intenção, anormalidade na escrita e desatritia (11, 14).

Devido ao quadro incapacitante apresentado pelos indivíduos cerebelopatas e às dificuldades em desenvolver um tratamento efetivo para a heterogeneidade de sintomas dessa população, é de extrema relevância o desenvolvimento de técnicas de potencializem o efeito reabilitador daquelas já empregadas para o tratamento de pacientes com lesões cerebelares. A modulação da atividade do cerebelo pode ser, portanto, uma estratégia de reabilitação em potencial para este objetivo (1).

Uma forma de modular a excitabilidade de áreas cerebrais, incluindo o cerebelo, é através das estimulações cerebrais transcranianas, que têm sido bem estabelecidas nos últimos anos, como ferramentas de modulação cortical não invasiva. Dentre as estimulações cerebrais não invasivas, destaca-se a estimulação transcraniana por corrente contínua

(ETCC). Através da aplicação de corrente direta de baixa intensidade, sobre o crânio, a ETCC atua no tecido cerebral de forma a modificar o potencial de repouso da membrana celular (15). As vantagens do uso da ETCC consistem em ser uma técnica barata, indolor e fácil aplicação. Soma-se a estas vantagens o fato de poder ser utilizada de forma placebo, permitindo estudos experimentais, controlados e randomizados (16).

Estudos sobre o efeito da estimulação cerebelar (ETCCc) no aprendizado motor vêm sendo desenvolvidos, porém, seu mecanismo exato permanece desconhecido. Uma das formas de elucidar algumas questões sobre esta influência é a observação de alterações de desempenho em tarefas motoras e sua correlação com alterações eletrofisiológicas resultantes de estimulação do cerebelo. Estudo recente de Ferrucci e colaboradores (2013) investigou o efeito da estimulação anódica do cerebelo sobre o aprendizado motor bilateral, medido pelo tempo de reação serial (3). Porém, não foram desenvolvidos estudos que preencham a lacuna da literatura no que diz respeito à lateralidade dos efeitos desta modulação e da polaridade da estimulação.

Outro fator que merece investigação é a alteração de funções cognitivas que influenciam o desempenho motor. Tarefas complexas, como a escrita, além de envolverem processos motores, envolvem processos cognitivos ligados ao cerebelo (17). Estudos de neuroimagem comprovam que, durante a escrita, o cerebelo está ativado tanto quando predominam elementos cognitivos (linguísticos), como quando há predominância de elementos motores (18).

Sendo assim, os dois estudos da presente dissertação tiveram como objetivo preencher estas lacunas, auxiliando a compreensão das diversas funções do cerebelo e, futuramente, guiando possíveis protocolos de estimulação direcionados à pacientes com alterações cerebelares. O primeiro estudo investiga a influência da ETCC aplicada sobre um dos hemisférios cerebelares no aprendizado motor implícito, avaliado pelo tempo de reação serial, o realizado com o membro contralateral e as repercussões na excitabilidade cortical de M1 ipsilateral. O segundo investiga a influência da ETCCc sobre o aprendizado motor implícito e sobre uma tarefa que envolve processos cognitivos e motores, o teste de escrita, ambos realizados com o membro ipsilateral ao córtex cerebelar estimulado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CEREBELO

Anatomia

O cerebelo é uma estrutura com um grande poder de processamento e larga conectividade. Essas características fazem com que ele funcione como um dispositivo de processamento suplementar, que melhora o poder computacional do cérebro, podendo ser usado essencialmente para qualquer função, sendo ela motora ou cognitiva (19).

Quando olhado de cima, o cerebelo é como uma “borboleta”. A parte medial, localizada no eixo antero-posterior é chamado vermis e dele partem os hemisférios, que se expandem lateralmente. Estas divisões podem ser seccionadas novamente em lóbulos, cada um contendo pregas rasas, as folias (20).

Existem duas formas principais para subdivisão do cerebelo, primeiramente ele pode ser dividido longitudinalmente em zonas. A segunda forma é dividindo-o transversalmente em lóbulos (divisão abordada nesta sessão e representada na figura 1). Ambos os tipos de divisão são significantes do ponto de vista funcional (19). Os três lóbulos do cerebelo são os seguintes:

Vestibulocerebelo: também conhecido como lóbulo floclunodular não possui um núcleo cerebelar profundo correspondente. Ele recebe conexões diretamente do núcleo vestibular e as células de Purkinje do seu córtex cerebelar projetam novamente para o núcleo vestibular. Ele é responsável pelo controle da musculatura axial e os movimentos oculares em relação à posição corporal (reflexos vestibulares) (21).

Espinocerebelo: compreende o vermis e as partes intermediárias dos hemisférios cerebelares. Ele recebe informações sensoriais das partes distais e proximais do corpo, do córtex motor primário e do córtex somatosensorial. As células de Purkinje do vermis projetam para o núcleo fastigial e as da zona intermediária para o núcleo interposto. O primeiro controla a musculatura axial e proximal, enquanto o segundo os componentes laterais das vias motoras descendentes (musculatura distal) (21).

Cerebrocerebelo: corresponde as partes laterais ao vermis. A informação aferente para esta estrutura é proveniente do núcleo pontino e suas células de Purkinje projetam para o núcleo denteado que, via tálamo, conecta-se com o córtex motor e pré-motor (21).

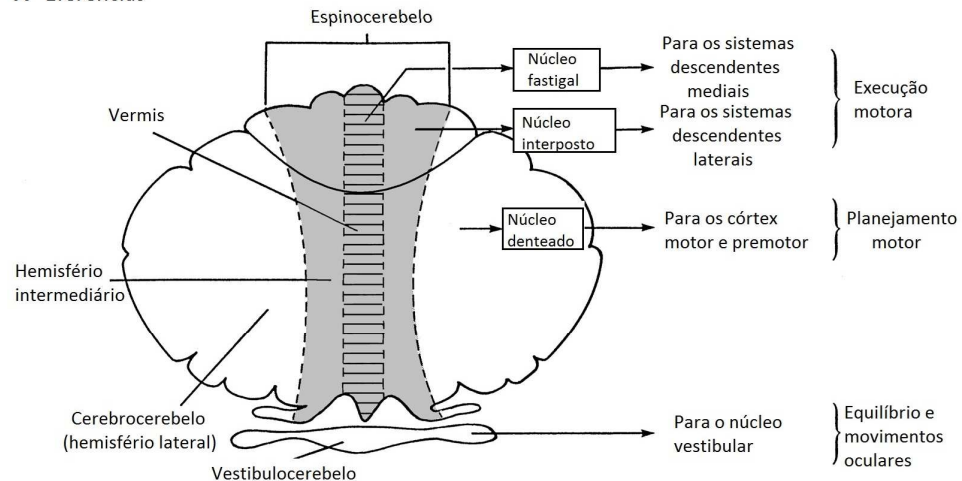
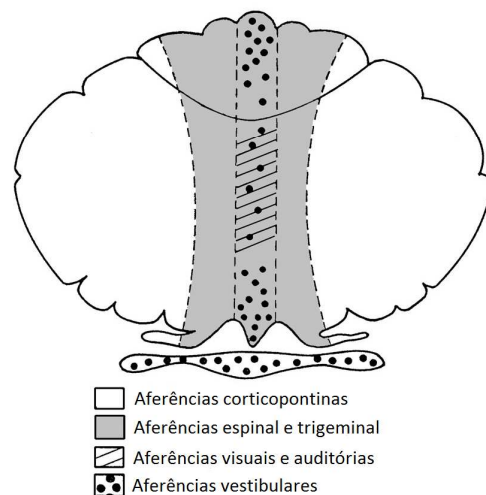
A Eferências**B Aferências**

Figura 1. Esquema das três principais divisões funcionais do cerebelo (vestibulocerebelo, espinocerebelo, cerebrocerebelo) e seus aferentes (A) e eferentes (B). Adaptado de (21).

Diferente do córtex cerebral, o cerebelo possui uma citoarquitetura bastante estereotipada (Figura 1), presente em todas as suas subdivisões (19).

A grande maioria da informação eferente no córtex cerebelar chega por meio das fibras musgosas, tendo origem em locais como os núcleos pontinhos, medula e outros. Estas fibras enviam conexões excitatórias para as células granulosas, que por sua vez têm conexões também excitatórias (glutamatérgicas) com as células de Purkinje. O corpo celular das células granulosas fica na camada granular do cerebelo, mas seus axônios projetam-se para a camada molecular, onde se bifurcam formando as fibras paralelas (22).

Como já citado acima, a maior parte do fluxo de informação para o cerebelo é proveniente das fibras musgosas. Porém, existe uma outra forma de fluxo proveniente das

fibras trepadeira, que são responsáveis pela transmissão de informações do núcleo olivar inferior para as células de Purkinje. Estas informações são sinais de erros de desempenho no movimento e são codificadas através de uma potente atividade excitatória. (22).

As células de Purkinje são os neurônios de saída do cerebelo e sua atividade pode ser modificada através do mecanismo de depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*). Este mecanismo é causado pela diminuição da eficácia das sinapses entre as fibras paralelas e a célula de Purkinje e é causado pela repetida ativação do núcleo olivar inferior e uma célula granulada (23). Por fim, os axônios das células de Purkinje conectam-se com núcleos vestibulares ou cerebelares através da secreção do neurotransmissor GABA, portanto, inibindo-os (22).

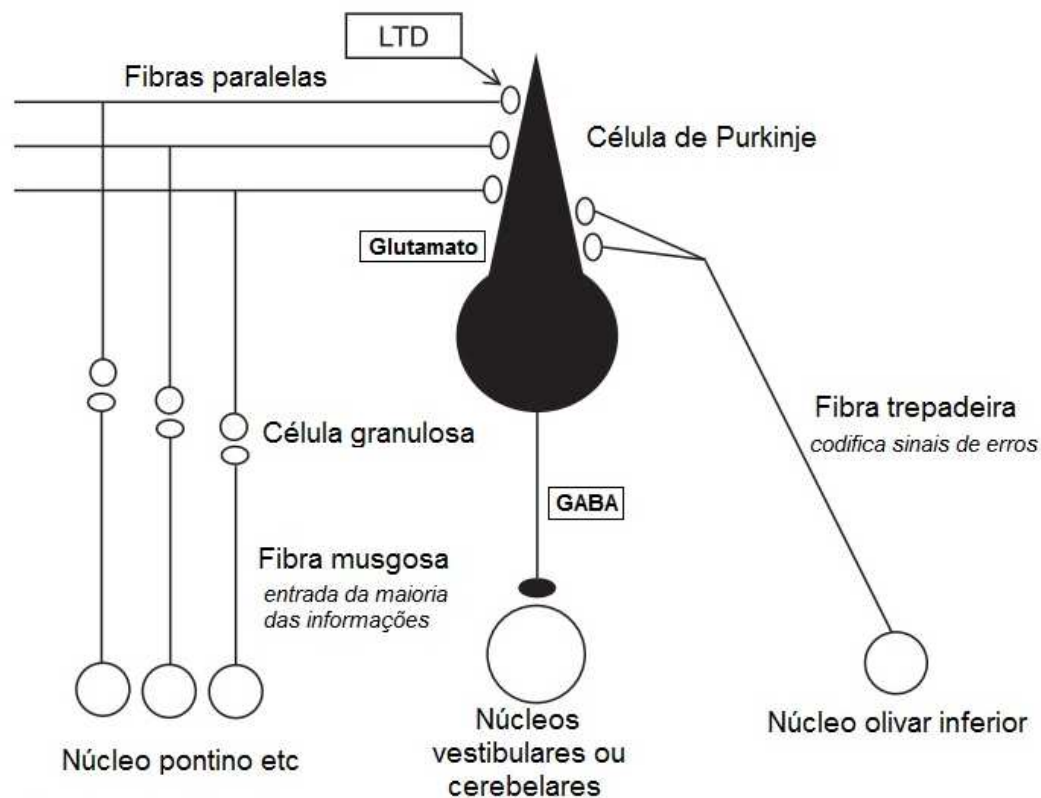


Figura 2. Principais circuitos corticais. Adaptado de (22).

Conexões

Através do mecanismo apresentado acima, o cerebelo influencia várias áreas do sistema nervoso central. Uma importante conexão é a estabelecida com o córtex motor primário e acontece porque as células de Purkinje têm conexões do tipo inibitórias com o núcleo denteado cerebelar, que por sua vez tem uma conexão sináptica excitatória, através do tálamo, com M1 contralateral. Desse modo, a atividade destas células exerce um efeito

inibitório sobre M1, esta denominada inibição cerebello-cérebro (CBI, do inglês *ceberellar brain inhibition*) (1, 2, 24-27).

Estudos já demonstram que existe uma relação entre a CBI e melhora no desempenho de diversas tarefas comportamentais, entre elas o aprendizado motor (28). Uma maior força de interação entre o cerebello e M1 leva à melhora no aprendizado motor. Porém, uma vez o comportamento aprendido, é observado uma liberação dessa inibição sobre o córtex motor (28-31).

Existem ainda estudos que mostram a influência da modulação do cerebello sobre a excitabilidade do córtex motor, porém com resultados controversos. Ao utilizar estimulação magnética transcraniana de pulso único (EMT-p), alguns autores observaram aumento no potencial evocado motor em M1 contralateral (32, 33), enquanto outros observaram uma diminuição no mesmo (34, 35). Apesar da falta de consenso, sabe-se que modificações da excitabilidade do córtex motor podem estar relacionadas com alterações no desempenho de tarefas motoras (36-43).

Lateralidade

De uma forma direta, pelo próprio trajeto da via denteado-tálamo- cortical que cruza na altura do tálamo, o cerebello influencia o córtex motor contralateral e, pelo trajeto do trato córtico espinal, que cruza na altura da ponte, o membro ipsilateral. Desta forma, os estudos que investigam a lateralidade do cerebello, em sua grande maioria, estão limitados a investigar os efeitos sobre estas estruturas (córtex motor contralateral e membro ipsilateral).

Uma relação cerebelocortical ipsilateral direta pode ser descartada, já que nenhuma conexão ipsilateral entre cerebello e o córtex motor foi descrita após décadas de estudos (44). Porém, Lehericy e colaboradores (2005) demonstraram através de estudo de neuroimagem que existe uma ativação cerebello-cortical bilateral e ativação transitória do núcleo denteado contralateral ao membro que está realizando a função estudada, sugerindo uma transferência de informações dentro do córtex cerebelar e entre este e o núcleo denteado (45).

Partindo do ponto que o cerebello contralateral ao membro treinado também é ativado durante o aprendizado, é possível que sua modulação leve a consequências neste membro. No entanto, as vias responsáveis por esta relação ainda não são totalmente identificadas.

Estudos já mostram que a ativação do cerebello lateral gera mudanças na excitabilidade do córtex motor contralateral (33, 34, 46). Adicionalmente, existem evidências

que mostram que o córtex motor de um hemisfério pode alterar a excitabilidade do seu correspondente no hemisfério contralateral através do mecanismo de inibição interhemisférica (47, 48). Através destas conexões interhemisféricas, é possível que a ativação unilateral do cerebelo possa levar a alterações na excitabilidade do córtex motor em ambos os hemisférios, contra- e ipsilateral ao lado do cerebelo estimulado/ativado. .

A partir da modificação da excitabilidade cortical, duas possibilidades na qual o desempenho motor do membro contralateral à estimulação cerebelar pode ser afetada. A primeira é que modificando a excitabilidade cortical de M1 ipsilateral, são induzidas alterações no aprendizado no membro correspondente. Estudos prévios já demonstram um aumento no desempenho motor do membro contralateral após aumentar a excitabilidade cortical em M1 (36-43). Uma outra possibilidade é que a modificação da excitabilidade do córtex motor ipsilateral pode levar a mudanças na força da conexão entre este córtex motor com o cerebelo não estimulado, já que o reforço da via depende tanto da informação que sai do cerebelo como da que chega a ele oriunda de M1 (30).

Por fim, outra evidência que sustenta as hipóteses apresentadas é de que a forma associativa da potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) do córtex motor é gerada pela coativação das projeções cortico-corticais e tálamo-corticais (49). Alterações na força das sinapses através da depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*) estão associadas com armazenamento de informações no cérebro. No cerebelo, a LTD que ocorre nas sinapses entre as fibras paralelas e as células de Purkinje promove adaptações no reflexo vestibulo ocular e no condicionamento do piscar de olhos (50). Já a LTP nesta mesma conexão causa a extinção de associações aprendidas. Sugere-se que essa mudança reversível na eficácia das sinapses seja o mecanismo responsável pelo aprendizado motor (50).

No entanto, as hipóteses apresentadas são especulativas e mais estudos são necessários para investigar essas possíveis interações entre cerebelo e córtex motor primário.

3.2 APRENDIZADO MOTOR

O aprendizado motor é um processo prático-dependente (51), caracterizado pela modificação na habilidade de executar uma tarefa motora, sendo inferido pela melhora do desempenho (52, 53). Este processo envolve formação e consolidação de novas memórias, através de alterações nos padrões de ativação de redes neurais, decorrentes de modificações sinápticas, primariamente transitórias que, através do aprendizado proveniente da repetição, se tornam permanentes (54).

A aquisição de tarefas motoras pode envolver as duas formas de aprendizado, o implícito e explícito (38). O aprendizado motor implícito é caracterizado pela melhora no desempenho de uma ação sem o conhecimento consciente dos elementos da mesma e a melhora ocorre de forma involuntária. O aprendizado motor explícito, por outro lado, é acompanhado pela recordação consciente de cada elemento da ação desempenhada e uma percepção da melhora na execução da ação (55, 56).

Apesar das evidentes semelhanças, existem diversas diferenças entre as duas formas de aprendizado e se dão principalmente pelos substratos neurais responsáveis por cada sistema, que envolvem intrincadas redes neurais que competem entre si para mediar as melhoras no desempenho (38). De uma forma geral, existem tarefas que exigem mais de um ou de outro sistema, porém o aprendizado de uma tarefa complexa necessita das duas formas, podendo ter componentes declarativos que requerem aprendizado motor explícito, e componentes processuais que requerem aprendizado motor implícito (57).

Estudos mostram que o cerebelo está relacionado com o aprendizado motor (58, 59). A influência desta estrutura no aprendizado se dá pelo sistema de detecção de erros no movimento mediada pelas fibras trepadeiras. Essas informações quando ao erro servem, então, de instrução para a LTD que ocorre entre as fibras paralelas e a células de Purkinje. Este processo leva a alterações graduais no desempenho motor observadas no aprendizado (60)

O processo pelo qual o cerebelo está envolvido no aprendizado o torna um excelente candidato para a sua modulação através da ETCC. Por este motivo, as estimulações transcranianas vêm sendo usadas para entender o papel do cerebelo no aprendizado motor (29). Esta técnica consiste na aplicação de corrente direta sobre o córtex cerebelar pode alterar os mecanismos de ação dos circuitos desta estrutura, influenciando as áreas cerebrais as quais ele está conectado e gerando mudanças comportamentais (29).

3.3 FUNÇÕES COGNITIVAS

O cerebelo é uma estrutura tradicionalmente reconhecida por sua participação em funções motoras (11). No entanto, devido ao grande número de estruturas com as quais ele se conecta, estudos têm investigado a participação do cerebelo na cognição e emoções (61, 62). As conexões do cerebelo relacionadas com essas funções ocorrem entre esta estrutura e o córtex pré-frontal e parietal posterior (63, 64). Dentre estas, destaca-se a conexão do cerebelo e o córtex pré-frontal dorsolateral, sendo essa relacionada à cognição (65) e memória de trabalho (66).

Pacientes com lesões focais no cerebelo demonstraram alterações cognitivo afetivas semelhantes às que ocorrem em pacientes com lesões em áreas corticais de associação (especialmente o córtex pré-frontal) e áreas paralímbicas (11, 67). A partir destas alterações, surge o conceito de “dismetria do pensamento” (68) e sua relação com a síndrome cognitivo afetiva cerebelar. Essa síndrome está presente tanto em alterações no cerebelo como na via que conecta, indiretamente, o cerebelo ao córtex pré-frontal, passando pelo tálamo (11). Os sintomas observados são: prejuízo nas funções executivas, como planejamento, pensamento abstrato, memória de trabalho e fluência verbal; dificuldades na cognição espacial; mudanças na personalidade, com embotamento afetivo e/ou comportamento inapropriados; déficits de linguagem (11).

Sabe-se que, apesar do tratamento farmacológico aquedo, pacientes com alterações cognitivas podem ainda apresentar sequelas. Portanto, a compreensão das funções cognitivas influenciadas pelo cerebelo e como estas podem ser moduladas pode ser extremamente benéfico para o tratamento de pacientes com diversas doenças, não só as diretamente ligadas à danos no cerebelo (69).

Portanto, estimulações transcranianas nessa região poderiam beneficiar tanto pacientes com lesões cerebelares como os que apresentam outras doenças, como epilepsia, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, depressão e esquizofrenia (69).

3.4 ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC)

Histórico

Apesar da estimulação transcraniana por corrente contínua da forma como aplicada nas pesquisas atuais seja relativamente recente, o uso de correntes elétricas para fins terapêuticos é uma estratégia bastante antiga e usada de diversas formas ao longo da história.

O primeiro registro do uso de correntes elétricas sobre o escalpo data de 43-48 AC e foi iniciado por Scribonius Largus. O método consistia em posicionar um peixe elétrico no escalpo do paciente para, através de uma forte descarga elétrica, proporcionar alívio dos seus sintomas devido a um torpor transitório (70). Seus experimentos foram repetidos por diversos pesquisadores no período de 131 a 401 DC, entre eles Claudius Galen, que relatou que o alívio da dor era devido à dormência, torpor e o efeito narcótico induzido pela corrente liberada pelo peixe (71).

O estudo sistemático com o peixe elétrico estimulou o trabalho dos italianos Galvani e Volta. O trabalho desses dois pesquisadores iniciou a “era da eletricidade”. Nos anos

seguintes, as correntes galvânicas foram aplicadas na medicina, especialmente no tratamento de doenças mentais, tendo como pioneiro nesses experimentos Giovanni Aldini em 1804 (72).

Os resultados divergentes e desanimadores encontrados nos anos posteriores fizeram que os estudos na área fossem abandonados, sendo retomados quando Bini e Cerletti descobriram a eletroconvulsoterapia (ETC) em 1940 (72). Apesar da ECT preceder os estudos neuromodulatórios atuais, existem diferenças importantes entre esta técnica e as aplicadas atualmente. Enquanto a ECT induz convulsão, a polarização cerebral resultante da aplicação da ETCC, modula a função cerebral influenciando a atividade neuronal espontânea (73). Portanto, a ETCC possui várias vantagens em relação a ECT, pois não induz convulsão, não acarreta distúrbios de memória ou perda de consciência, além de não requerer que o paciente seja sedado ou faça uso de relaxantes musculares.

Os estudos na área da neuromodulação avançaram novamente com o trabalho de Bindman e colaboradores (1964), que descobriram que o gradiente de potenciais elétricos produzidos por corrente contínua de baixa intensidade era capaz de alterar a excitabilidade cortical de ratos e que esses efeitos duravam por horas após o fim da estimulação (74). Outra contribuição importante foi o estudo de Purpura e McMurtry (1965) que observaram um efeito polaridade dependente após aplicação de corrente contínua sobre o trato piramidal de gatos (75).

Pesquisa em seres humanos avaliando mudanças comportamentais após o uso de corrente contínua começaram a ser desenvolvidas, porém sem avaliar diretamente a excitabilidade cortical. O primeiro estudo a utilizar esse tipo de avaliação foi feito por Priori e colaboradores (1998). Eles observaram uma supressão da excitabilidade do córtex humano, avaliada através de medida do potencial evocado motor após aplicação de uma estimulação anódica alternada com catódica (76).

A ETCC, como aplicada atualmente, foi introduzida por Nitsche e Paulus em 2000. Os autores demonstraram em um estudo pioneiro, o efeito dependente da polaridade da ETCC sobre a excitabilidade cortical no córtex de indivíduos saudáveis (77).

Conceito

A ETCC é uma técnica neuromodulatória não invasiva que consiste na aplicação de uma corrente direta de baixa intensidade em áreas corticais com a finalidade de facilitar ou inibir a atividade neuronal espontânea (78).

A aplicação da ETCC é feita com eletrodos de superfície, de tamanho definido pelo pesquisador, compostos por borracha condutora de eletricidade e envoltos por uma esponja embebida em solução salina.

Parâmetros de estimulação

Os efeitos da estimulação dependem de certos parâmetros que podem ser alterados de acordo com seu objetivo neuromodulatório, A seguir serão listados os principais.

- Polaridade da corrente

Quanto à polaridade aplicada, a ETCC tem um efeito polaridade dependente na excitabilidade cortical. Convencionalmente, a ETCC anódica ou catódica referem-se à polaridade do eletrodo posicionado sobre a área de interesse, ou seja, a área a qual se deseja modular. De uma forma geral, a estimulação anódica aumenta a excitabilidade cortical tanto durante quanto depois da estimulação, enquanto a catódica tem efeito contrário (15).

- Área cortical estimulada

Os efeitos comportamentais resultantes da ETCC, tanto motores quanto cognitivos, dependem da área estimulada. Um método de posicionamento considerado confiável é o sistema 10-20 (39, 79). Outro método é a localização da área de interesse por meio da estimulação magnética transcraniana de pulso simples, com a qual é possível identificar a área de representação cortical de músculos alvo (80).

- Duração da estimulação e frequência das sessões

Aplicações de ETCC com duração de apenas alguns segundos a poucos minutos levam a alterações da excitabilidade cortical durante a estimulação, mas não a efeitos duradouros, cruciais para fins terapêuticos (78). Nas aplicações que duram cerca de 10 minutos ou mais, esse efeito duradouro pode estender-se por mais de uma hora (77, 81).

Doses únicas de intervenção com ETCC têm efeitos pós-estimulação relativamente curtos. Para que sejam obtidos efeitos significativos na eficiência sináptica, múltiplas sessões são necessárias (82, 83). Boggio e colaboradores (2007) observaram que a ETCC aplicada durante cinco dias consecutivos resultou em uma melhora da função motora que durou até duas semanas após o fim da estimulação e que este efeito não se repetiu quando as sessões de ETCC foram realizadas semanalmente (84). Posteriormente, Monte-Silva e colaboradores (2010 e 2013) demonstraram que intervalos curtos entre duas estimulações

(20 minutos) podem prologar a duração dos efeitos pós-estimulação, enquanto intervalos longos (3 a 24 horas) podem diminuir ou abolir seus efeitos (82, 83).

Apesar das evidências na literatura, devido às variações como as relatadas acima, um protocolo ótimo de duração e repetição da estimulação ainda não foi estabelecido.

- Densidade da corrente

A densidade de corrente é a relação entre intensidade da corrente e o tamanho dos eletrodos utilizados, sendo esta relação mais importante que os dois fatores isolados quanto à sua influência nos efeitos da ETCC (85). A fim de verificar os efeitos de diferentes densidades de corrente na excitabilidade cortical, Bastani e Jaberzadeh (2013) aplicaram quatro intensidades de corrente (0,3; 0,7; 1,4 e 2 mA) em um eletrodo de 24cm², resultando em quatro densidades de corrente (0,013; 0,029; 0,058 e 0,083 mA/cm²). Os resultados mostram uma relação direta entre o aumento da densidade de corrente e da excitabilidade cortical entre as três maiores densidades. Porém, não houve diferença significativa entre as densidades de 0,013 e 0,083 MA/cm², sugerindo que a primeira gera um aumento na excitabilidade comparável à densidade de 0,083 MA/cm², porém com menos reações adversas. As implicações desse estudo podem evitar, ao criar o um protocolo de estimulação, a aplicação de uma quantidade desnecessária de corrente elétrica.

- Diferenças interindividuais

Apesar dos parâmetros listados poderem ser manipulados, as respostas observadas variam devido às diferenças interindividuais. Em uma revisão sistemática recente, Li e colaboradores (2015) demonstraram que os principais fatores reportados como fatores relacionados à variabilidade nas respostas foram: anatomia cranial e do cérebro, organização funcional dos circuitos locais, nível basal das funções motoras e cognitivas, resposta neurofisiológica nas tarefas, status psicológico, neuroquímica (níveis de neurotransmissores e sensibilidade aos mesmos), nível neurofisiológico basal, genética, desenvolvimento e envelhecimento e presença de lesões cerebrais (86).

Mecanismos da ETCC

A ETCC, por meio de uma corrente direta de baixa intensidade que atinge o cérebro, modula a atividade de células neuronais isoladas, modificando os potenciais neuronais da membrana (87). Apesar das correntes polarizadas dificilmente conseguirem excitar uma célula em repouso, elas são muito eficientes em modular o disparo espontâneo das células (73).

Resultados de estudos em humanos sugerem que o efeito da ETCC durante a estimulação seja devido unicamente a mudanças no potencial de membrana (88). Nitsche e colaboradores (2003) demonstraram que, bloqueando os canais de sódio voltagem dependentes, o aumento na excitabilidade cortical observado após a ETCC anódica foi abolido, enquanto que bloqueando os canais de cálcio o efeito foi diminuído (89). Além disso, em outro estudo realizado por Nitsche e colaboradores (2005), foi demonstrado que nem um antagonista do receptor NMDA ou agonista do receptor GABA tiveram um efeito modulatório durante a aplicação da ETCC (90).

No entanto, os mecanismos relacionados aos efeitos duradouros da ETCC são mais complexos e ainda não totalmente elucidados. Acredita-se que sejam similares aos de plasticidade neuronal, essa caracterizada pelos mecanismos de LTP e depressão de longa duração (LTD) (91).

Com base nos princípios neurofisiológicos, a ETCC anódica gera um aumento da excitabilidade cortical por promover hipopolarização da membrana neuronal por mecanismos semelhantes à LTP. A estimulação catódica, por outro lado, diminui a excitabilidade cortical por meio de hiperpolarização da membrana neuronal por mecanismo semelhante à LTD (77). A LTD e LTP são dependentes dos receptores glutamatérgicos (91), portanto o efeito modulatório da ETCC sobre os receptores AMPA (do inglês *2-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl propanoic acid*) e NMDA (do inglês, *N-metil D-Aspartato*) é supostamente o responsável pela organização do disparo neuronal causado pela ETCC.

Critérios de segurança

A ETCC é uma terapia considerada segura para aplicação em humanos devido aos poucos relatos na literatura de efeitos adversos (92). Além disso, estudo em animais mostraram que densidades de correntes de 25mA/cm^2 aplicadas por horas não foram capazes de induzir danos no tecido nervoso (93). Em seres humanos, os valores de densidade de corrente ficam bem abaixo dos valores considerados de risco, geralmente não ultrapassando $0,06\text{mA/cm}^2$ (94).

Por fim, os prováveis efeitos adversos decorrentes da aplicação da ETCC são coceira, queimação formigamento, desconforto e dores de cabeça (92). Como já citado, esses efeitos são pouco comuns e possuem intensidade leves, além de serem transitórios. Para que seja mantido um controle desses efeitos, um questionário de efeitos adversos sugerido por Brunoni e colaboradores pode ser aplicado após cada sessão de ETCC, onde o paciente ou voluntário é questionado sobre quais efeitos experimentou, a intensidade dos mesmos e se eles acreditam ter uma relação direta com a estimulação (92).

3.5 USO DA ETCC NO CEREBELO

Apesar do uso predominante no córtex cerebral, alguns estudos vêm também empregando a ETCC para modular a atividade do cerebelo. A estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar (ETCCc) se baseia nos mesmos princípios da ETCC (72). Acredita-se que ela tenha uma ação no cerebelo alterando o sistema de ajuste fino do potencial de membrana das células de Purkinje, necessário para a LTD (95, 96). A modulação da atividade destas células depende de processos sinápticos envolvendo canais de cálcio e sódio, assim como modulação dos receptores GABA, AMPA e NMDA (22), porém seu mecanismo exato de ação ainda não foi Identificado. As mudanças funcionais cerebelares, através das suas vias eferentes, irão agir nas estruturas corticais primariamente envolvidas no processamento motor e, portanto, podem alterar a excitabilidade de M1 e influenciar o aprendizado motor (97).

Diversos estudos tiveram como objetivo investigar a via cerebelo-tálamo-cortical, através da mensuração da CBI, por esta ser a via mais envolvida na execução de movimentos voluntários e com o aprendizado motor. A ETCC sobre o cerebelo foi provada ser uma ferramenta que altera a excitabilidade cerebelar de forma polaridade dependente, com efeitos sobre a CBI, com a anódica aumento desta inibição sobre o córtex e a catódica diminuindo (2, 29). Esses resultados mostram que existe modulação da via que conecta o cerebelo com o córtex motor, indicando possíveis mudanças no desempenho motor.

Para investigar estas mudanças funcionais, estudos que as relacionam estimulação do cerebelo vêm sendo desenvolvidos, tanto no domínio cognitivo (10, 61) como no motor (29). Dentre estes, aqueles que investigaram o efeito da ETCC no aprendizado motor em tarefas realizadas com o membro superior, mostram resultados promissores, com aumento na eficiência da execução de tarefas que avaliam o aprendizado.

Galea e colaboradores (2011) solicitaram que voluntários saudáveis executassem a tarefa de seguir com uma caneta um alvo em oito possíveis posições, a partir de um ponto central, apresentados tela de um *tablet* com ou sem perturbação visual. Os autores observaram que a ETCCc anódica, comparada a *sham* e a ETCC anódica sobre M1, foi capaz de diminuir o número de erros na realização da sequência realizada com o membro ipsilateral ao cerebelo estimulado, evidenciando melhor desempenho (98). Utilizando o mesmo modelo de teste, Block e Celnik (2013) compararam o efeito da ETCCc anódica e ETCC anódica em M1 do lado ipsi- ou contralateral à mão treinada. Em um terceiro experimento, foi testado se a modulação do cerebelo ipsilateral ou M1 contralateral à mão treinada foram capazes de gerar transferência desse aprendizado para a mão não treinada.

Os autores demonstraram que os sujeitos estimulados com ETCCc anódica ipsilateral ao lado treinado tiveram um aprendizado mais rápido na fase de adaptação quando comparados com o grupo *sham* e ETCC anódica em M1 de ambos os lados. Além disso, eles confirmaram a transferência intermanual do aprendizado, observada em todos os grupos, mas esta não foi influenciada pela ETCCc ou ETCC em M1. (99).

O modelo adotado acima foi replicado por Hardiwick e colaboradores (2014), porém utilizando um exoesqueleto que permitia movimento do membro em duas dimensões no plano horizontal. Neste estudo um grupo de indivíduos saudáveis com média de idade de 56,8 anos e que recebeu ETCCc anódica ipsilateral ao membro avaliado foi comparado com dois grupos que receberam estimulação fictícia, um deles com idade média semelhante (59,6 anos) e outro grupo mais novo (média de idade de 20,7 anos). Nesse estudo foi observado que os indivíduos que receberam ETCCc anódica, além de reduzirem mais rápido a taxa de erros na fase de adaptação quando comparados ao grupo *sham* com mesma faixa etária, se igualaram ao grupo mais novo também submetido à estimulação *sham*.

Herzfeld e colaboradores (2014) recorreram a um teste semelhante ao citado acima, porém usando uma alavanca que era direcionada para duas posições possíveis apresentadas. Em alguns blocos essa alavanca possuía uma resistência adicional ao movimento para observar a capacidade de adaptação a novos estímulos. Esse estudo evidenciou que o aumento da excitabilidade do cerebelo, através da ETCCc anódica, resultou em melhor taxa de aprendizado, enquanto a ETCCc catódica teve efeito inverso (100). Um modelo de teste semelhante foi utilizado novamente por Cantarero e colaboradores (2015). Nesse experimento, a alavanca deveria ser direcionada para 5 alvos, a partir do centro, usando o indicador e o polegar. Os autores observaram um melhor aprendizado no grupo ETCCc anódica quando comparado à catódica e ao grupo *sham*. Adicionalmente foi observado que os efeitos da estimulação anódica aconteceram no mesmo dia e não entre os dias. Por fim, eles concluíram a melhora aconteceu, principalmente, na redução da taxa de erros (101).

Outra forma de medir o aprendizado motor implícito são testes como o tempo de reação serial e o *finger tapping task*. O primeiro foi realizado por Ferrucci e colaboradores (2013) e consistiu de 12 blocos com 24 tentativas, sendo o décimo bloco com uma sequência randomizada, enquanto os outros continham uma sequência que se repetia. A estimulação anódica foi realizada no cerebelo medial e o teste realizado bimanualmente. Neste estudo, foi observado que a diferença entre o tempo de reação dos blocos sequenciados e randomizados foi significativamente maior para o grupo de ETCCc anódica

quando comparado ao *sham*, mostrando melhora no aprendizado (3). Já a segunda modalidade de teste, o *finger tapping task*, foi realizado por Wessel e colaboradores (2015). Neste experimento, os voluntários eram solicitados a clicar com o dedo indicador em um *mouse* para formar uma sequência. O bloco foi dividido em uma fase na qual os cliques da sequência são precedidos por uma pista auditiva (fase de sincronização) e uma fase sem pistas (fase de continuação). A estimulação anódica foi realizada no cerebelo direito e teste com o membro direito. Porém não foi observado diferenças entre de ganho *online* entre os grupos, apenas no desempenho *off-line*, sendo o grupo de ETCCc anódica com melhor resultado quando comparado ao *sham*.

Apesar das diferenças metodológicas nos estudos, foi observado que a ETCCc é capaz de aumentar o desempenho motor de indivíduos saudáveis. Além disso, alguns deles evidenciaram que este aumento está relacionado à diminuição dos erros e melhora na acurácia, função classicamente relacionada ao cerebelo.

Estes resultados reforçam que a ETCCc pode ser uma ferramenta valiosa para reabilitação quando combinada ao treino motor. No entanto, a influência da ETCC no cerebelo sobre o membro contralateral ao lado estimulado não foi investigada, existindo apenas um estudo que investiga a influência da EMTr sobre esse membro contralateral ao cerebelo estimulado (TORRIERO et al., 2004). Fica evidente, então, a lacuna nestes estudos quanto à investigação da lateralidade dos efeitos da ETCC e se os mesmos são polaridade dependentes.

Outro ponto não esclarecido são os resultados divergentes tanto em tarefas semelhantes às investigadas quanto em tarefas que envolvem componentes cognitivos além dos motores. A maior parte das evidências apresentadas neste tópico da revisão sugerem que existe uma potencialização do aprendizado motor quando esta tarefa é realizada após ou simultaneamente com ETCCc anódica. Porém este efeito não foi observado por Ferrucci e colaboradores (2008) quando observado o efeito da ETCCc sobre a memória de trabalho, medido através do teste de Stenberg, onde foi relatado uma piora após estimulação anódica e catódica (102). Outro estudo com resultado divergente foi o realizado por Foerster e colaboradores (2013) onde a ETCCc anódica combinada com a prática mental piorou o desempenho dos voluntários no teste de escrita (103). Portanto, evidenciamos outra lacuna na literatura, onde seria de grande relevância investigar se os efeitos em tarefas de diferentes complexidades são semelhantes.

Assim, de modo a contribuir para o avanço do conhecimento nesta área, a presente dissertação foi composta por dois estudos com objetivos e metodologias distintas, portanto

apresentados em tópicos separados. O estudo 1 procurou responder à perguntas relacionadas com a lateralidade da influência do cerebelo sobre o aprendizado motor contralateral e a excitabilidade do córtex motor primário ipsilateral. O Estudo 2 buscou estudar o uso da ETCC no aprendizado motor, explorando os efeitos polaridade dependente da ETCCc em tarefas de complexidade distintas, a primeira inespecífica e predominantemente motora e a segunda com componentes motores e cognitivos.

4 ESTUDO 1 – Ensaio clínico 1

4.1 HIPÓTESE

A estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar é capaz de induzir mudanças na excitabilidade do córtex motor ipsilateral à estimulação e, portanto, influenciar o aprendizado motor no membro superior contralateral.

4.2 OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo se propõe a avaliar os efeitos da ETCCc sobre a excitabilidade do córtex motor primário ipsilateral à estimulação e sobre o aprendizado motor no membro superior contralateral em indivíduos saudáveis.

Objetivos específicos

- Analisar o impacto da ETCC anódica, catódica e *sham* aplicada sobre o cerebelo direito na excitabilidade do córtex motor primário direito;
- Analisar o impacto da ETCC anódica, catódica e *sham* aplicada sobre o cerebelo direito no aprendizado motor implícito, avaliado pelo tempo de reação serial, com o membro esquerdo em indivíduos saudáveis.

4.4 MÉTODOS

Desenho, local e período do estudo

Trata-se de um estudo do tipo *crossover*, controlado, pseudo-randomizado (ordem das sessões contrabalanceadas) e triplo cego realizado com indivíduos saudáveis no Laboratório de Neurociência Aplicada (LANA), situado no Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais do estudo foram elaborados e desenvolvidos respeitando as diretrizes da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinki de 1964. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAAE 0432.0.172.000-11) (**ANEXO I**)

População, amostra e critérios de elegibilidade

A amostra foi composta por voluntários saudáveis que foram recrutados no Departamento de Fisioterapia da UFPE, onde o estudo foi realizado.

Os critérios de inclusão foram (i) indivíduos destros, (ii) ambos os sexos, (iii) idade entre 18 e 30 anos. Foram estabelecidos como critérios de exclusão (i) evidência clínica de desordem neuromuscular ou ortopédica no punho ou dedos, (ii) contraindicações para aplicação da ETCC, como implantes metálicos cranianos ou marcapasso e histórico de crise convulsiva ou epilepsia (104).

Para determinação da preferência manual, foi utilizado o inventário de dominância lateral de Edimburgo. O inventário é constituído por 10 questões sobre preferência lateral na realização de 10 atividades motoras executadas normalmente pela maioria das pessoas. O inventário apresenta escore de 100 pontos positivos ou negativos. Consideram-se valores positivos para a mão direita e negativos para a mão esquerda. Foi atribuída a pontuação de +10 pontos, caso o voluntário realize atividade exclusivamente com a mão direita e de -10 pontos caso seja realizada exclusivamente com a esquerda. Para atividades realizadas com as duas mãos, foram atribuídos +5 pontos para direita e -5 para esquerda. O somatório é representado pelo índice de preferência manual, que deverá ser > 70 se a dominância for à direita e ≤ -70 se a dominância manual for à esquerda (105, 106).

Procedimentos experimentais

A figura 3 resume os procedimentos metodológicos aplicados no estudo 1. Os sujeitos incluídos no estudo, após assinarem o TCLE (**APÊNDICE III**), foram submetidos a três sessões experimentais:

- (i) Sessão 1 (ETCCc catódica): nesta sessão os voluntários foram submetidos à ETCC cerebelar catódica;
- (ii) Sessão 2 (ETCCc anódica): nesta sessão os voluntários foram submetidos à ETCC cerebelar anódica;

- (iii) Sessão 3 (ETCCc *sham*): nesta sessão os sujeitos foram submetidos à ETCCc cerebelar fictícia.

Para cada dia de sessão experimental, somente uma única sessão de ETCCc foi realizada. Um intervalo mínimo de 48 horas foi dado entre as sessões. A ordem das sessões foi contrabalanceada (pseudo-randomizada) entre os indivíduos através do site *www.randomization.com*. Durante todo o período do estudo, os voluntários e os pesquisadores responsáveis pela aplicação dos métodos de avaliação permaneceram cegos a respeito do tipo de ETCCc que era aplicado a cada sessão.

Antes das sessões experimentais (S0) foi realizada um triagem clínica (**APÊNDICE IV**) para verificar os critérios de inclusão e exclusão, assim como o inventário de dominância lateral de Edimburgo. Em cada sessão experimental (S1-S3) os voluntários tinham sua amplitude de potencial evocado motor (PEM) avaliada antes e depois das estimulações (anódica, catódica e sham). O tempo de reação serial (TRS) foi realizado após cada sessão.

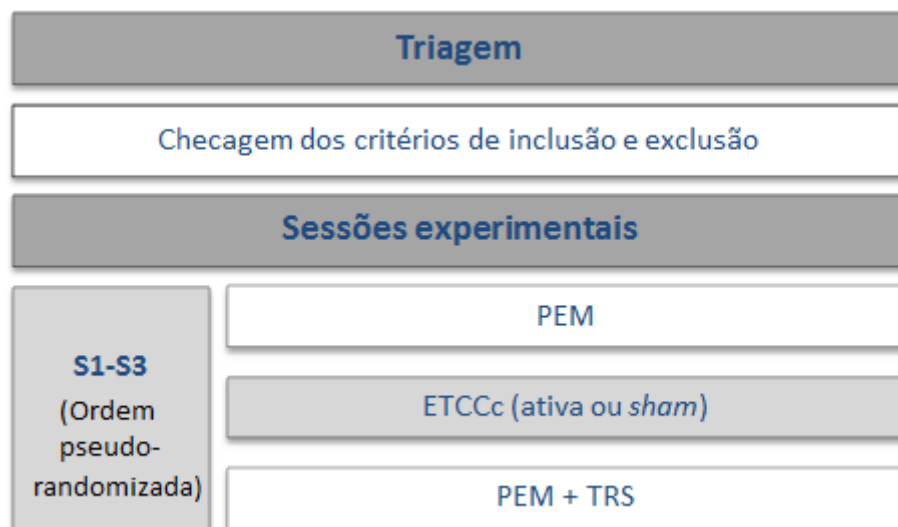


Figura 3. Procedimentos metodológicos. S1 - S3: sessões 1 a 3; PEM: potencial evocado motor; TRS: tempo de reação serial.

Sessões de estimulação por corrente contínua

Durante as sessões experimentais, os voluntários foram submetidos à ETCCc ativa ou fictícia. A ETCCc ativa consistiu na aplicação de microcorrentes elétricas de forma contínua sobre o couro cabeludo através de um estimulador de corrente direta (Soterix, EUA). Os eletrodos utilizados tinham dimensões de 5x5cm (25cm²), compostos por borracha condutora de eletricidade e envoltos por esponjas umedecidas em solução salina. Para a aplicação da ETCCc, o eletrodo correspondente à estimulação selecionada para a sessão

foi posicionado sobre o hemisfério cerebelar direito, 3 cm lateral ao ínion (27) e o outro sobre o músculo deltoide do membro direito (102).

A intensidade de corrente utilizada foi de 1 mA e a duração da estimulação foi de 13 minutos para ETCC anódica e 9 minutos para a catódica, parâmetros já demonstrados que são capazes de interferir na excitabilidade cortical (81). Na estimulação fictícia (sham), a ETCCc com a mesma montagem da anódica foi aplicada por 30 segundos, tempo insuficiente para modular o córtex cerebelar (37). Logo depois, o aparelho foi desligado, porém o sujeito permaneceu com a montagem dos eletrodos por 13 minutos.

Ao final de cada estimulação, os voluntários responderam a um questionário sobre os possíveis efeitos adversos (**ANEXO II**), o qual inclui dor de cabeça, sonolência, formigamento, entre outros (78).

Medidas de avaliação

Em todas as sessões, os voluntários foram submetidos às seguintes medidas antes (apenas a medida da excitabilidade cortical) e após as sessões de estimulação:

- ***Tempo de reação serial (TRS)***

Para investigar o aprendizado motor uma variante do modelo de teste de reação serial (TRS) que avalia o aprendizado motor implícito foi aplicada (107, 108). Estudos prévios evidenciaram que este teste é sensível o suficiente para identificar alterações cerebrais induzidas por uma única sessão de ETCC (109). O TRS foi aplicado após as estimulações cerebelares.

O tempo de reação foi avaliado através de um software com estímulos visuais apresentados no monitor do computador em quatro diferentes posições, para cada posição apresentada o voluntário deveria pressionar, o mais rapidamente possível, uma tecla correspondente com um dedo pré-determinado. O tempo de reação (TR) foi medido desde o aparecimento do sinal até o momento que a tecla correta foi pressionada pelo voluntário. Para cada bloco de estímulos, a média do TR para cada sujeito foi calculada separadamente. Também foram computados os números de erros em cada bloco.

O teste foi composto por oito blocos, cada um com 120 sequências (total de 960 sequências). Os blocos um e seis possuem uma sequência aleatória, enquanto os demais possuem uma sequência de 10 estímulos que se repetiu 12 vezes em cada bloco. Apesar de imperceptível ao voluntário, na execução da sequência ao longo dos blocos, espera-se

que o tempo necessário para finalizar o bloco diminui-se, evidenciando o aprendizado motor implícito.

No teste, o aprendizado motor é medido através da mudança no desempenho entre o bloco aleatório seis e o bloco sete, também sequenciado. Como a tarefa solicitada é a mesma e considerando que a melhora no desempenho no decorrer dos blocos sequenciados dois ao cinco é devido à aprendizagem implícita da sequência, é esperado que ocorra um aumento no tempo de reação ao executar o bloco aleatório 6 e que esse tempo diminua novamente ao executar o bloco sete, o qual contém a sequência já aprendida (109).

- ***Avaliação da excitabilidade cortical***

A avaliação da atividade cerebral foi realizada pela EMT-p antes e depois de cada sessão. Através da medição da amplitude do PEM, a excitabilidade do hemisfério cerebral direito foi analisada. A EMT-p foi aplicada através de um estimulador magnético (Neurosoft, Russia) com uma bobina plana e em forma de 8. A bobina de estimulação foi segurada manualmente, encostada no escalpe, em um ângulo de 45 graus da linha média e apontada para a região anterior do crânio. Inicialmente, estímulos de EMT foram administrados sobre o córtex motor para determinar a área de representação cortical do músculo primeiro interósseo dorsal (PID), considerada a área com maior amplitude do PEM (*hotspot*) medida através de eletromiógrafo. Para a determinação da amplitude do PEM, a intensidade do estimulador magnético foi ajustada para produzir uma média de amplitude (pico a pico) de 1mV em 20 pulsos aplicado.

4.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Processamento dos dados

Os dados foram tabulados no Microsoft Office Excel por códigos (A, B e C) para garantir o cegamento dos avaliadores e do estatístico quanto ao tipo de estimulação (anódica, catódica e *sham*). Os códigos foram criados por uma pesquisadora não envolvida em nenhuma etapa do estudo e só foi quebrado após a conclusão da análise de todas as variáveis do estudo.

Para o tempo de reação serial, o tempo de reação (TR) foi medido a partir do aparecimento do sinal até o primeiro botão correto ser pressionado pelo sujeito. Para cada bloco a média do TR foi calculada para cada indivíduo separadamente. Como a mudança do desempenho do bloco randomizado 6 para o 7 evidenciam o aprendizado motor, esses

blocos foram os analisados para medir as mudanças. A taxa de erro dos TRs para cada sujeito, em cada bloco, também foi calculada.

Análise dos dados

Após testar a normalidade dos dados (teste de *Shapiro-Wilk*), a análise entre as sessões (A, B e C) foi conduzida pela ANOVA de medidas repetidas (3x2) seguida de um *post hoc test* (t pareado) para a análise do aprendizado motor implícito através do TRS. Os seguintes fatores foram considerados em ambas as análises: “ETCC” – A, B e C e “bloco” – 6, 7 além da interação entre eles (bloco*ETCC).

As médias de amplitude do PEM foram calculadas antes e depois da intervenção e foram normalizadas pelo antes para todos os sujeitos. Para a análise foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas (3x2) seguida de um *post hoc test* (t pareado). Os fatores considerados foram “ETCC” – A, B, C e “tempo” – antes e depois, além da interação entre eles (ETCC*tempo).

A esfericidade foi verificada pelo teste de *Mauchly* e corrigida por *Greenhouse-Geisser* quando necessário. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$ para todos os testes estatísticos. A análise dos dados foi realizada através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago - Estados Unidos).

5 ESTUDO 2 – Ensaio clínico 2

5.1 HIPÓTESE

Em indivíduos saudáveis, a estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar é capaz de influenciar o aprendizado motor e que este efeito é dependente da polaridade e da complexidade da tarefa envolvida no aprendizado motor.

5.2 OBJETIVO

Objetivo geral

Analisar o impacto da ETCC anódica, catódica e *sham* aplicada sobre o cerebelo em duas tarefas de complexidades distintas em indivíduos saudáveis.

Objetivos específicos

- Analisar o impacto da ETCC anódica, catódica e *sham* aplicada sobre o cerebelo esquerdo no aprendizado motor medido pelo TRS no membro ipsilateral em indivíduos saudáveis;
- Analisar o impacto da ETCC anódica, catódica e *sham* aplicada sobre o cerebelo esquerdo no aprendizado avaliado pelo teste de escrita no membro opsilateral em indivíduos saudáveis.

5.3 MÉTODOS

Desenho, local e período do estudo

Trata-se de um estudo do tipo *crossover*, controlado, pseudo-randomizado e triplo cego (voluntário, avaliador e estatístico foram cegos quanto ao tipo de estimulação) o qual foi realizado com indivíduos saudáveis no Laboratório de Neurociência Aplicada (LANA), situado no Departamento de Fisioterapia da UFPE.

Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais do estudo foram elaborados e desenvolvidos respeitando as diretrizes da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinki de 1964. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAAE 44049715.7.0000.5208) (**ANEXO III**).

População, amostra e critérios de elegibilidade

O estudo foi realizado com indivíduos recrutados por meio de anúncios eletrônicos em redes sociais e através de cartazes autorizados para divulgação em centros da UFPE. Uma triagem foi realizada a fim de selecionar os voluntários de acordo com os critérios de elegibilidade. Os critérios de inclusão nesta pesquisa foram: (i) indivíduos que se auto relataram como saudáveis e sem histórico de doenças neurológicas e psiquiátricas; (ii) indivíduos destros, avaliados através do inventário de dominância de *Edinburgh* (105); (iii) idade entre 18 e 40 anos; (iv) indivíduos que não apresentaram histórico de lesões osteomioarticulares severas nos punhos e dedos; (v) ausência de uso de medicamentos ou substâncias neuroativas regularmente e (vi) ausência de agravos a saúde que poderiam influenciar na realização do estudo.

Foram excluídos do estudo indivíduos que apresentaram qualquer contraindicação para a aplicação da técnica de estimulação cerebral não invasiva, como gestação, presença de implante metálico na face ou região do crânio, utilização de marcapasso cardíaco e

histórico de epilepsia e/ou crise convulsiva (104). Também foram excluídos aqueles voluntários que apresentaram seis ou mais respostas do tipo frequentemente e muito frequentemente na escala *Adult Self-Report Scal*, escala que avalia indícios do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH).

Procedimentos experimentais

Uma vez concedida autorização através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**APÊNDICE V**) para participação no estudo e após se enquadrarem aos critérios de elegibilidade, os voluntários foram submetidos a uma triagem clínica (**APÊNDICE IV**) seguida de três sessões experimentais, com ordem pseudo-randomizada entre os participantes da pesquisa:

- (i) Sessão 1: ETCC anódica sobre o cerebelo;
- (ii) Sessão 2: ETCC catódica sobre o cerebelo;
- (iii) Sessão 3: ETCC *sham* sobre o cerebelo.

As sessões experimentais foram realizadas respeitando um intervalo mínimo de 48 horas (período de *washout*). A ordem das sessões foi contrabalanceada (pseudo-randomizada) e realizada através do site www.randomization.com por um pesquisador não envolvido na pesquisa a fim de manter o sigilo de alocação. Durante todo o período do estudo, os voluntários e os pesquisadores responsáveis pela aplicação dos métodos de avaliação permaneceram cegos a respeito do tipo de ETCC que foi aplicado a cada sessão com o intuito de garantir o mascaramento do estudo.

A figura 4 apresenta o desenho do presente estudo.

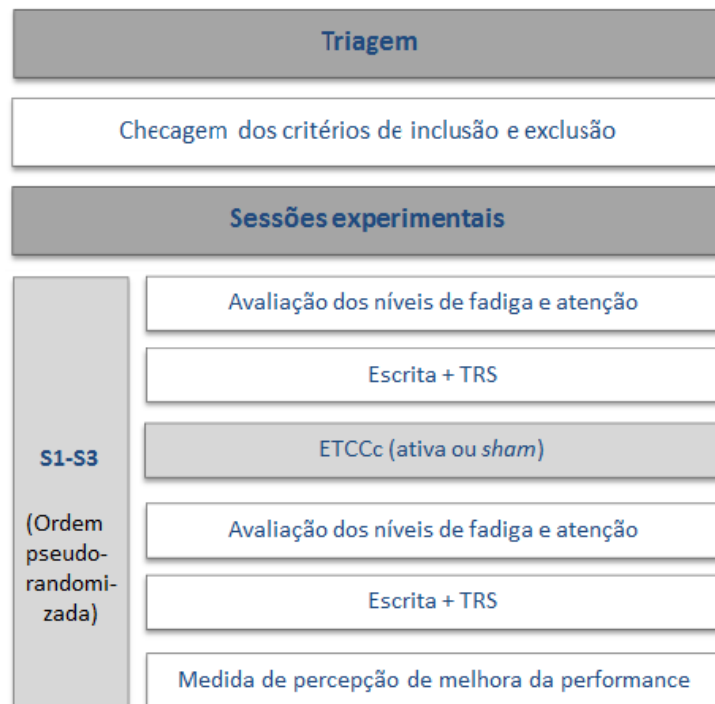


Figura 4. Procedimentos metodológicos do estudo. S1-S3: sessões 1 a 3; TRS: tempo de reação serial; ETCCc: estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar.

Sessões de estimulação por corrente contínua

Durante as sessões experimentais, os voluntários foram submetidos à ETCC cerebelar ativa ou fictícia (*sham*). A ETCC cerebelar ativa (catódica e anódica) consistiram na aplicação de microcorrente elétrica de forma contínua sobre o couro cabeludo através de um estimulador de corrente direta (NeuroConn, Alemanha) e um par de eletrodos. Os eletrodos utilizados tinham dimensões de 5x7cm (35cm²), compostos por borracha condutora de eletricidade e envoltos por esponjas umedecidas em solução salina.

Para a aplicação da ETCC cerebelar ativa, um eletrodo foi posicionado na região alvo ou de interesse a ser estimulada, correspondente ao hemisfério cerebelar esquerdo, localizado na linha média entre o ínion e o meato auditivo externo (27) e o outro eletrodo foi colocado sobre o músculo deltoide do membro direito (102). Para a ETCC cerebelar catódica ou inibitória, o cátodo foi posicionado na região alvo, enquanto que para a ETCC anódica ou excitatória, o anodo era o eletrodo localizado na região de interesse. Em ambas as polaridades, a intensidade de corrente utilizada foi de 2 mA, com rampa de subida e descida de 10 segundos e duração da estimulação de 20 minutos (densidade de corrente: 0,057 mA/cm²) (3).

Na estimulação fictícia (*sham*), a intensidade de corrente também foi de 2 mA, no entanto, a estimulação teve duração de 30 segundos, tempo insuficiente para modular o córtex cerebelar (37), porém, capaz de mimetizar as sensações iniciais da estimulação ativa. Ao completar 30 segundos de estimulação, o aparelho foi desligado automaticamente, porém o indivíduo permaneceu com a montagem dos eletrodos por 20 minutos.

Ao término de cada estimulação, os voluntários responderam a um questionário sobre efeitos adversos da aplicação da ETCCc (**ANEXO II**), no qual inclui dor de cabeça, sonolência, formigamento, entre outros (78).

Triagem clínica

A triagem clínica (**APÊNDICE IV**) foi realizada presencialmente, na qual foram coletados, além dos demais critérios de inclusão e exclusão, os seguintes dados:

- ***Inventário de Dominância Lateral de Edinburgh***

O inventário é constituído por 10 questões sobre preferência lateral na realização de 10 atividades motoras executadas normalmente pela maioria das pessoas. O inventário apresenta escore de 100 pontos positivos ou negativos. Consideram-se valores positivos para a mão direita e negativos para a mão esquerda. Foi atribuída a pontuação de +10 pontos, caso o voluntário realize atividade exclusivamente com a mão direita e de -10 pontos caso seja realizada exclusivamente com a esquerda. Para atividades realizadas com as duas mãos, foram atribuídos +5 pontos para direita e -5 para esquerda. O somatório é representado pelo índice de preferência manual, que deverá ser > 70 se a dominância for à direita e ≤ -70 se a dominância manual for à esquerda (105, 106).

Medidas de avaliação

Em todas as sessões, os voluntários foram submetidos às seguintes medidas antes e após as sessões de estimulação:

- ***Avaliação dos níveis de fadiga e atenção***

Os níveis de fadiga e atenção serão medidos através de escalas analógicas graduadas de 0 a 10, onde 0 representa o mínimo de fadiga ou atenção possível e 10, o máximo de fadiga ou atenção. O objetivo dessa medida é confirmar se o voluntário encontra-se motivado para realização das tarefas motoras solicitadas.

- ***Tempo de reação serial (TRS)***

O mesmo teste descrito no tópico “medidas de avaliação” no estudo 1 foi aplicado.

- **Teste de escrita**

Em cada sessão experimental, o aprendizado motor também foi avaliado pelo teste da escrita. Este teste mediu elementos importantes no desempenho de caligrafia (110). Para o teste, os voluntários foram instruídos a copiar o conjunto das seis palavras com a mão esquerda (não dominante) em um *tablet* equipado com software de análise de escrita (MovAlizeR – NeuroScript, EUA).

Antes de iniciar o teste, os voluntários foram instruídos a, durante a atividade da escrita, tocar no *tablet* apenas com a ponta da caneta. Também foi solicitado que ele escolhesse qual o tipo de letra adotada, cursiva ou fôrma, e mantivesse este padrão durante todas as sessões. Por fim, os voluntários foram advertidos a não retirar a caneta do *tablet* por mais 2 segundos durante a escrita das palavras.

Três componentes de escrita foram avaliados:

- (i) Comprimento da palavra: definido como a distância entre o ponto mais externo da extremidade esquerda e o ponto mais externo da extremidade direita (centímetros);
- (ii) Duração média total para escrever as seis palavras (segundos);
- (iii) Velocidade total média para escrita das seis palavras (milímetro por segundos).

A cada sessão foi solicitado que o voluntário escrevesse seis palavras, duas com quatro letras, duas com seis letras e duas com oito letras. A sequência de palavras por sessão foi a mesma antes e após a estimulação. A lista de palavras para cada sessão foi a seguinte (103):

Sessão 1: casa / bala / cebola / batata / sabonete / cachorro;

Sessão 2: roda / pato / tomate / goiaba / elefante / melancia;

Sessão 3: rede / bela / sapato / gaiola / biologia / serpente.

5.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Processamento dos dados

Os dados foram tabulados no *Microsoft Office Excel* por códigos (A, B e C) para garantir o cegamento dos avaliadores e do estatístico quanto ao tipo de estimulação (anódica, catódica e *sham*). Os códigos foram criados por uma pesquisadora não envolvida em nenhuma etapa do estudo e só será quebrado após a conclusão da análise de todas as variáveis do estudo.

Através do relatório final de análise do software *MovAlyzeR* em formato de planilha do *Microsoft Office Excel*, foi computado o tempo total médio para escrever as seis palavras (segundos), a velocidade média da escrita das seis palavras (segundos) e o comprimento médio das seis palavras (centímetros) antes e após as estimulações para cada voluntário.

Para o tempo de reação serial, o tempo de reação (TR) foi medido a partir do aparecimento do sinal até o primeiro botão correto ser pressionado pelo sujeito. Para cada bloco a média do TR foi calculada para cada indivíduo separadamente. Como a mudança do desempenho do bloco randomizado 6 para o 7 evidenciam o aprendizado motor, esses blocos foram os analisados para medir as mudanças. A taxa de erro dos TRs para cada sujeito, em cada bloco, também foi calculada.

Em relação à análise dos efeitos adversos após a ETCC, os sintomas do questionário foram dicotomizados em ausentes e presentes, independente da intensidade. Os sintomas reportados como presentes, porém, considerados pelos voluntários como sem nenhuma relação com a estimulação, também foram considerados ausentes.

Análise dos dados

Após checagem da normalidade, feito através do teste de Shapiro-Wilk, a ANOVA de medidas repetidas (3x2) seguida de um *post hoc test* (t pareado) foi aplicada para a análise da escrita com o intuito de comparar as médias das variáveis: duração da palavra, velocidade de escrita e comprimento da palavra nas diferentes condições de estimulação ("ETCC" – A, B e C) durante as sessões ("tempo" – antes e depois), além da interação entre esses fatores (ETCC x tempo).

Para comparar se tempos de reação no teste de reação serial foram diferentes no *baseline* (pré-estimulação), foi utilizada uma ANOVA de medidas repetidas (3x2), com os fatores "estimulação" (três níveis: a anódica, catódica e *sham*) e "blocos" (dois níveis: B6 e B7) como variáveis independentes.

A esfericidade foi verificada pelo teste de Mauchly e corrigida por Greenhouse-Geisser quando aplicável. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$ para todos os testes estatísticos. A análise dos dados foi realizada através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago - Estados Unidos).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Os resultados serão apresentados em forma de artigo científico original. O artigo do estudo 1, intitulado "Lateral cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) impairs

procedural motor learning in the contralateral upper limb” (APÊNDICE 1), será submetido na revista *Cerebellum* (fator de impacto: 2,717). O estudo 2, intitulado “Polarity-dependent specific modulation of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on procedural learning and handwriting” (APÊNDICE 2), ainda sem revista definida para submissão.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do estudo 1 foi possível observar que a ETCCc, independente da polaridade, não foi capaz de modular a excitabilidade do córtex motor primário ipsilateral à estimulação, além de piorar o aprendizado motor implícito do, medido através do TRS, com o membro superior contralateral. Esse efeito no aprendizado motor pode ter sido devido a alterações no fino ajuste necessário para um desempenho ótimo em indivíduos saudáveis.

Os resultados do estudo 2 apontam para uma piora no aprendizado motor medido pelo tempo de reação serial e melhora no teste de escrita após de estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar catódica, e uma piora no teste de escrita após estimulação anódica. Essa divergência de resultados possivelmente foi devido à diferenças nos mecanismos neurais necessários para cada tipo de tarefa avaliada.

Por fim, os resultados encontrados confirmam a influência do cerebelo tanto no membro contralateral como no ipsilateral, com o qual tem ligações diretas. Também foi possível confirmar que tarefas com diferentes complexidades podem apresentar efeitos diferentes após ETCCc. Esses achados contribuem para compreensão das funções cerebelares e podem, futuramente, guiar o desenvolvimento de protocolos ideias para o uso da ETCCc como ferramenta de reabilitação de pacientes com desordens cerebelares.

REFERÊNCIAS

1. Minks E, Kopickova M, Marecek R, Streitova H, Bares M. Transcranial magnetic stimulation of the cerebellum. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2010;154(2):133-9.
2. Galea JM, Jayaram G, Ajagbe L, Celnik P. Modulation of cerebellar excitability by polarity-specific noninvasive direct current stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(28):9115-22.
3. Ferrucci R, Brunoni AR, Parazzini M, Vergari M, Rossi E, Fumagalli M, et al. Modulating human procedural learning by cerebellar transcranial direct current stimulation. *Cerebellum*. 2013;12(4):485-92.
4. Gilbert PF, Thach WT. Purkinje cell activity during motor learning. *Brain research*. 1977;128(2):309-28.
5. Kitazawa S, Kimura T, Yin PB. Cerebellar complex spikes encode both destinations and errors in arm movements. *Nature*. 1998;392(6675):494-7.
6. Seidler RD, Purushotham A, Kim SG, Ugurbil K, Willingham D, Ashe J. Cerebellum activation associated with performance change but not motor learning. *Science*. 2002;296(5575):2043-6.
7. Dayan E, Cohen LG. Neuroplasticity subserving motor skill learning. *Neuron*. 2011;72(3):443-54.
8. Iwata NK, Ugawa Y. The effects of cerebellar stimulation on the motor cortical excitability in neurological disorders: a review. *Cerebellum*. 2005;4(4):218-23.
9. Luft AR, Manto MU, Ben Taib NO. Modulation of motor cortex excitability by sustained peripheral stimulation: the interaction between the motor cortex and the cerebellum. *Cerebellum*. 2005;4(2):90-6.
10. De Smet HJ, Paquier P, Verhoeven J, Marien P. The cerebellum: its role in language and related cognitive and affective functions. *Brain and language*. 2013;127(3):334-42.
11. D'Angelo E, Casali S. Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. *Frontiers in neural circuits*. 2012;6:116.
12. Stoodley CJ. The cerebellum and cognition: evidence from functional imaging studies. *Cerebellum*. 2012;11(2):352-65.
13. Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *The Lancet Neurology*. 2010;9(9):885-94.
14. Marsden J, Harris C. Cerebellar ataxia: pathophysiology and rehabilitation. *Clinical rehabilitation*. 2011;25(3):195-216.
15. Stagg CJ, Nitsche MA. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2011;17(1):37-53.
16. Gandiga PC, Hummel FC, Cohen LG. Transcranial DC stimulation (tDCS): a tool for double-blind sham-controlled clinical studies in brain stimulation. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2006;117(4):845-50.
17. Purcell JJ, Turkeltaub PE, Eden GF, Rapp B. Examining the central and peripheral processes of written word production through meta-analysis. *Frontiers in psychology*. 2011;2:239.
18. Planton S, Jucla M, Roux FE, Demonet JF. The "handwriting brain": a meta-analysis of neuroimaging studies of motor versus orthographic processes. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*. 2013;49(10):2772-87.
19. Broussard DM. *The Cerebellum: Learning Movement, Language, and Social Skills*: Wiley-Blackwell; 2014. 240 p.
20. Ito M. *The Cerebellum: Brain for an Implicit Self*: Pearson Education; 2011.
21. Barlow J. *Cerebellum and Adaptive Control*: Cambridge University Press; 2002. 300 p.
22. Hirano T. Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2013;89(5):183-95.

23. Hirano T. Depression and potentiation of the synaptic transmission between a granule cell and a Purkinje cell in rat cerebellar culture. *Neuroscience letters*. 1990;119(2):141-4.
24. Daskalakis ZJ, Paradiso GO, Christensen BK, Fitzgerald PB, Gunraj C, Chen R. Exploring the connectivity between the cerebellum and motor cortex in humans. *The Journal of physiology*. 2004;557(Pt 2):689-700.
25. Reis J, Swayne OB, Vandermeeren Y, Camus M, Dimyan MA, Harris-Love M, et al. Contribution of transcranial magnetic stimulation to the understanding of cortical mechanisms involved in motor control. *The Journal of physiology*. 2008;586(2):325-51.
26. Ugawa Y, Day BL, Rothwell JC, Thompson PD, Merton PA, Marsden CD. Modulation of motor cortical excitability by electrical stimulation over the cerebellum in man. *The Journal of physiology*. 1991;441:57-72.
27. Ugawa Y, Uesaka Y, Terao Y, Hanajima R, Kanazawa I. Magnetic stimulation over the cerebellum in humans. *Annals of neurology*. 1995;37(6):703-13.
28. Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-Garcia JM, da Guarda SN, Gerwig M, et al. Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum*. 2012;11(2):457-87.
29. Grimaldi G, Argyropoulos GP, Boehringer A, Celnik P, Edwards MJ, Ferrucci R, et al. Non-invasive cerebellar stimulation--a consensus paper. *Cerebellum*. 2014;13(1):121-38.
30. Habas C. Functional imaging of the deep cerebellar nuclei: a review. *Cerebellum (London, England)*. 2010;9(1):22-8.
31. Daligadu J, Haavik H, Yelder PC, Baarbe J, Murphy B. Alterations in cortical and cerebellar motor processing in subclinical neck pain patients following spinal manipulation. *Journal of manipulative and physiological therapeutics*. 2013;36(8):527-37.
32. Koch G, Mori F, Marconi B, Codeca C, Pecchioli C, Salerno S, et al. Changes in intracortical circuits of the human motor cortex following theta burst stimulation of the lateral cerebellum. *Clin Neurophysiol*. 2008;119(11):2559-69.
33. Oliveri M, Koch G, Torriero S, Caltagirone C. Increased facilitation of the primary motor cortex following 1 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation of the contralateral cerebellum in normal humans. *Neuroscience letters*. 2005;376(3):188-93.
34. Fierro B, Giglia G, Palermo A, Pecoraro C, Scalia S, Brighina F. Modulatory effects of 1 Hz rTMS over the cerebellum on motor cortex excitability. *Experimental brain research*. 2007;176(3):440-7.
35. Langguth B, Eichhammer P, Zowe M, Landgrebe M, Binder H, Sand P, et al. Modulating cerebello-thalamocortical pathways by neuronavigated cerebellar repetitive transcranial stimulation (rTMS). *Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology*. 2008;38(5):289-95.
36. Boggio PS, Castro LO, Savagim EA, Braitte R, Cruz VC, Rocha RR, et al. Enhancement of non-dominant hand motor function by anodal transcranial direct current stimulation. *Neuroscience letters*. 2006;404(1-2):232-6.
37. Galea JM, Celnik P. Brain polarization enhances the formation and retention of motor memories. *Journal of neurophysiology*. 2009;102(1):294-301.
38. Kantak SS, Mummidisetty CK, Stinear JW. Primary motor and premotor cortex in implicit sequence learning--evidence for competition between implicit and explicit human motor memory systems. *The European journal of neuroscience*. 2012;36(5):2710-5.
39. Nitsche MA, Liebetanz D, Antal A, Lang N, Tergau F, Paulus W. Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation--technical, safety and functional aspects. *Supplements to Clinical neurophysiology*. 2003;56:255-76.
40. Reis J, Schambra HM, Cohen LG, Buch ER, Fritsch B, Zarahn E, et al. Noninvasive cortical stimulation enhances motor skill acquisition over multiple days through an effect on consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(5):1590-5.
41. Schambra HM, Abe M, Luckenbaugh DA, Reis J, Krakauer JW, Cohen LG. Probing for hemispheric specialization for motor skill learning: a transcranial direct current stimulation study. *J Neurophysiol*. 2011;106(2):652-61.

42. Tecchio F, Zappasodi F, Assenza G, Tombini M, Vollaro S, Barbatì G, et al. Anodal transcranial direct current stimulation enhances procedural consolidation. *J Neurophysiol.* 2010;104(2):1134-40.
43. Zimerman M, Nitsch M, Giraux P, Gerloff C, Cohen LG, Hummel FC. Neuroenhancement of the aging brain: restoring skill acquisition in old subjects. *Ann Neurol.* 2013;73(1):10-5.
44. Popa T, Russo M, Meunier S. Long-lasting inhibition of cerebellar output. *Brain stimulation.* 2010;3(3):161-9.
45. Lehericy S, Benali H, Van de Moortele PF, Pelegrini-Issac M, Waechter T, Ugurbil K, et al. Distinct basal ganglia territories are engaged in early and advanced motor sequence learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(35):12566-71.
46. Carrillo F, Palomar FJ, Conde V, Diaz-Corrales FJ, Porcacchia P, Fernandez-Del-Olmo M, et al. Study of cerebello-thalamocortical pathway by transcranial magnetic stimulation in Parkinson's disease. *Brain stimulation.* 2013;6(4):582-9.
47. Nowak DA, Grefkes C, Ameli M, Fink GR. Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand. *Neurorehabilitation and neural repair.* 2009.
48. Di Pino G, Pellegrino G, Assenza G, Capone F, Ferreri F, Formica D, et al. Modulation of brain plasticity in stroke: a novel model for neurorehabilitation. *Nature Reviews Neurology.* 2014;10(10):597-608.
49. Pananceau M, Rispal-Padel L. Functional plasticity in the interposito-thalamo-cortical pathway during conditioning. Role of the interstimulus interval. *Experimental brain research.* 2000;132(3):314-27.
50. Wang DJ, Su LD, Wang YN, Yang D, Sun CL, Zhou L, et al. Long-term potentiation at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses requires presynaptic and postsynaptic signaling cascades. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2014;34(6):2355-64.
51. Nyberg L, Eriksson J, Larsson A, Marklund P. Learning by doing versus learning by thinking: An fMRI study of motor and mental training. *Neuropsychologia.* 2006;44(5):711-7.
52. Magill RA. *Aprendizagem Motora Conceitos e Aplicações*. São Paulo Edgard Blucher. 2000.
53. Pellegrini AM. A aprendizagem de Habilidades Motoras I: o que muda com a prática. *Revista Paulista de Educação Física.* 2000;3:29-34.
54. Karni A. The acquisition of perceptual and motor skills: a memory system in the adult human cortex. *Cognitive Brain Research.* 1996;5(1-2):39-48.
55. Vidoni ED, Boyd LA. Achieving enlightenment: what do we know about the implicit learning system and its interaction with explicit knowledge? *Journal of Neurologic Physical Therapy.* 2007;31(3):145-54.
56. Robertson EM. From creation to consolidation: a novel framework for memory processing. *PLoS biology.* 2009;7(1):e1000019.
57. Moisello C, Avanzino L, Tacchino A, Ruggeri P, Ghilardi MF, Bove M. Motor sequence learning: acquisition of explicit knowledge is concomitant to changes in motor strategy of finger opposition movements. *Brain research bulletin.* 2011;85(3-4):104-8.
58. Guo CC, Ke MC, Raymond JL. Cerebellar encoding of multiple candidate error cues in the service of motor learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2014;34(30):9880-90.
59. Martinez S. The cerebellum: from development to structural complexity and motor learning. *Frontiers in neuroanatomy.* 2014;8:118.
60. Yang Y, Lisberger SG. Role of plasticity at different sites across the time course of cerebellar motor learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2014;34(21):7077-90.
61. Ferrucci R, Priori A. Transcranial cerebellar direct current stimulation (tcDCS): motor control, cognition, learning and emotions. *NeuroImage.* 2014;85 Pt 3:918-23.

62. Oliveri M, Torriero S, Koch G, Salerno S, Petrosini L, Caltagirone C. The role of transcranial magnetic stimulation in the study of cerebellar cognitive function. *Cerebellum* (London, England). 2007;6(1):95-101.
63. Middleton FA, Strick PL. Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(2):700-12.
64. Strick PL, Dum RP, Fiez JA. Cerebellum and nonmotor function. *Annual review of neuroscience*. 2009;32:413-34.
65. Liu S, Erkkinen MG, Healey ML, Xu Y, Swett KE, Chow HM, et al. Brain activity and connectivity during poetry composition: Toward a multidimensional model of the creative process. *Human Brain Mapping*. 2015;36(9):3351-72.
66. Dell'Osso B, Cinnante C, Di Giorgio A, Cremaschi L, Palazzo MC, Cristoffanini M, et al. Altered prefrontal cortex activity during working memory task in Bipolar Disorder: A functional Magnetic Resonance Imaging study in euthymic bipolar I and II patients. *Journal of affective disorders*. 2015;184:116-22.
67. Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain : a journal of neurology*. 1998;121 (Pt 4):561-79.
68. Andreasen NC, Paradiso S, O'Leary DS. "Cognitive dysmetria" as an integrative theory of schizophrenia: a dysfunction in cortical-subcortical-cerebellar circuitry? *Schizophrenia bulletin*. 1998;24(2):203-18.
69. Koch G. Repetitive transcranial magnetic stimulation: a tool for human cerebellar plasticity. *Functional neurology*. 2010;25(3):159-63.
70. Largus S, Ruellius J, Winter J. *Compositionibus medicamentorum: Apud Cratandrum; 1529.*
71. Kellaway P. The part played by electric fish in the early history of bioelectricity and electrotherapy. *Bulletin of the history of medicine*. 1946;20(2):112-37.
72. Priori A. Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged non-invasive modulation of brain excitability. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2003;114(4):589-95.
73. Terzuolo CA, Bullock TH. Measurement of Imposed Voltage Gradient Adequate to Modulate Neuronal Firing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1956;42(9):687-94.
74. 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. *The Journal of physiology*. 1964;172:369-82.
75. Purpura DP, McMurtry JG. Intracellular Activities and Evoked Potential Changes during Polarization of Motor Cortex. *Journal of neurophysiology*. 1965;28:166-85.
76. Priori A, Berardelli A, Rona S, Accornero N, Manfredi M. Polarization of the human motor cortex through the scalp. *Neuroreport*. 1998;9(10):2257-60.
77. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *The Journal of physiology*. 2000;527 Pt 3:633-9.
78. Brunoni AR, Nitsche MA, Bolognini N, Bikson M, Wagner T, Merabet L, et al. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. *Brain stimulation*. 2012;5(3):175-95.
79. Klem GH, Luders HO, Jasper HH, Elger C. The ten-twenty electrode system of the International Federation. *The International Federation of Clinical Neurophysiology. Electroencephalography and clinical neurophysiology Supplement*. 1999;52:3-6.
80. Groppa S, Oliviero A, Eisen A, Quartarone A, Cohen LG, Mall V, et al. A practical guide to diagnostic transcranial magnetic stimulation: report of an IFCN committee. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2012;123(5):858-82.
81. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain stimulation*. 2008;1(3):206-23.

82. Monte-Silva K, Kuo MF, Hessenthaler S, Fresnoza S, Liebetanz D, Paulus W, et al. Induction of late LTP-like plasticity in the human motor cortex by repeated non-invasive brain stimulation. *Brain Stimul.* 2013;6(3):424-32.
83. Monte-Silva K, Kuo MF, Liebetanz D, Paulus W, Nitsche MA. Shaping the optimal repetition interval for cathodal transcranial direct current stimulation (tDCS). *J Neurophysiol.* 2010;103(4):1735-40.
84. Boggio PS, Nunes A, Rigonatti SP, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Fregni F. Repeated sessions of noninvasive brain DC stimulation is associated with motor function improvement in stroke patients. *Restorative neurology and neuroscience.* 2007;25(2):123-9.
85. Bastani A, Jaberzadeh S. Differential modulation of corticospinal excitability by different current densities of anodal transcranial direct current stimulation. *PloS one.* 2013;8(8):e72254.
86. Li LM, Uehara K, Hanakawa T. The contribution of interindividual factors to variability of response in transcranial direct current stimulation studies. *Frontiers in cellular neuroscience.* 2015;9:181.
87. Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain.* 2002;125(Pt 10):2238-47.
88. Roche N, Geiger M, Bussel B. Mechanisms underlying transcranial direct current stimulation in rehabilitation. *Annals of physical and rehabilitation medicine.* 2015.
89. Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology.* 2003;114(4):600-4.
90. Nitsche MA, Seeber A, Frommann K, Klein CC, Rochford C, Nitsche MS, et al. Modulating parameters of excitability during and after transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. *The Journal of physiology.* 2005;568(Pt 1):291-303.
91. Sadowski B. Plasticity of the Cortical Motor System. *Journal of Human Kinetics.* 2008;20:5-22.
92. Brunoni AR, Amadera J, Berbel B, Volz MS, Rizzerio BG, Fregni F. A systematic review on reporting and assessment of adverse effects associated with transcranial direct current stimulation. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum.* 2011;14(8):1133-45.
93. McCreery DB, Agnew WF, Yuen TG, Bullara L. Charge density and charge per phase as cofactors in neural injury induced by electrical stimulation. *IEEE transactions on bio-medical engineering.* 1990;37(10):996-1001.
94. Bastani A, Jaberzadeh S. Does anodal transcranial direct current stimulation enhance excitability of the motor cortex and motor function in healthy individuals and subjects with stroke: a systematic review and meta-analysis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology.* 2012;123(4):644-57.
95. Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *The Journal of physiology.* 2003;553(Pt 1):293-301.
96. Paulus W. Outlasting excitability shifts induced by direct current stimulation of the human brain. *Supplements to Clinical neurophysiology.* 2004;57:708-14.
97. Ferrucci R, Priori A. Transcranial cerebellar direct current stimulation (tcDCS): Motor control, cognition, learning and emotions. *Neuroimage.* 2013.
98. Galea JM, Vazquez A, Pasricha N, de Xivry JJ, Celnik P. Dissociating the roles of the cerebellum and motor cortex during adaptive learning: the motor cortex retains what the cerebellum learns. *Cerebral cortex.* 2011;21(8):1761-70.
99. Block H, Celnik P. Stimulating the cerebellum affects visuomotor adaptation but not intermanual transfer of learning. *Cerebellum.* 2013;12(6):781-93.

100. Herzfeld DJ, Pastor D, Haith AM, Rossetti Y, Shadmehr R, O'Shea J. Contributions of the cerebellum and the motor cortex to acquisition and retention of motor memories. *NeuroImage*. 2014;98:147-58.
101. Cantarero G, Spampinato D, Reis J, Ajagbe L, Thompson T, Kulkarni K, et al. Cerebellar direct current stimulation enhances on-line motor skill acquisition through an effect on accuracy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35(7):3285-90.
102. Ferrucci R, Marceglia S, Vergari M, Cogiamanian F, Mrakic-Sposta S, Mameli F, et al. Cerebellar transcranial direct current stimulation impairs the practice-dependent proficiency increase in working memory. *Journal of cognitive neuroscience*. 2008;20(9):1687-97.
103. Foerster A, Rocha S, Wiesiolek C, Chagas AP, Machado G, Silva E, et al. Site-specific effects of mental practice combined with transcranial direct current stimulation on motor learning. *The European journal of neuroscience*. 2013;37(5):786-94.
104. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A, Safety of TMSCG. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2009;120(12):2008-39.
105. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971;9(1):97-113.
106. Baumer T, Dammann E, Bock F, Kloppel S, Siebner HR, Munchau A. Laterality of interhemispheric inhibition depends on handedness. *Experimental brain research*. 2007;180(2):195-203.
107. Exner C, Weniger G, Irle E. Implicit and explicit memory after focal thalamic lesions. *Neurology*. 2001;57(11):2054-63.
108. Nissen MJ, Bullemer P. Attentional Requirements of Learning - Evidence from Performance-Measures. *Cognitive Psychol*. 1987;19(1):1-32.
109. Nitsche MA, Schauenburg A, Lang N, Liebetanz D, Exner C, Paulus W, et al. Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human. *Journal of cognitive neuroscience*. 2003;15(4):619-26.
110. Bonney M-A. Understanding and Assessing Handwriting Difficulty: Perspectives from the Literature. *Australian Occupational Therapy Journal*. 1992;39(3):7-15.
111. Keel JC, Smith MJ, Wassermann EM. A safety screening questionnaire for transcranial magnetic stimulation. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*. 2001;112(4):720.

APÊNDICE I – ARTIGO ORIGINAL (Estudo 1)**Journal Section:**

Title: Lateral cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) impairs procedural motor learning in the contralateral upper limb

Authors: Mello, Marina¹; Foerster, Águida¹; Melo, Lorena¹; Castro, Rebeca¹; Rocha, Sérgio¹; Monte-Silva, Katia¹

Affiliation: ¹Applied Neuroscience Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Running head: ctDCS influence on motor learning

Contact information: Katia Monte-Silva; ¹Applied Neuroscience Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Department of Physical Therapy. Avenida Jornalista Aníbal Fernandes s/n, 50670-900 Recife, Brazil. Phone: +55 81-2126 7579 / FAX: +55 81-2126 8491.

Abstract

Introduction: many studies have suggested that cerebellum has a crucial role on motor learning. Researches about cerebellar stimulation over the cortical excitability and motor learning have been developed. However lateralized effect of cerebellar modulation is not known.

Purpose: to investigate the interference of lateral cerebellar transcranial current direct stimulation (ctDCS) over implicit motor learning in the contralateral upper limb and over ipsilateral primary motor cortex excitability.

Methods: It was adopted a crossover and sham controlled design. The performance on Serial Reaction Time Task (SRTT) in upper limb contralateral to cerebellar stimulation was assessed in 15 healthy volunteers (mean age: 23.1 ± 1.35) who underwent three experimental sessions separated by 48 h. In each session a different type of stimulation was applied: anodal ctDCS (1 mA, 13 min), cathodal ctDCS (1 mA, 9 min) and sham ctDCS. Transcranial magnetic stimulation was used to determine changes in motor cortex excitability ipsilateral to ctDCS by motor evoked potencial (MEP) amplitude variation between before and after each session.

Results: For SRTT, ANOVA showed significant main effect only for block factor ($F=5.34$; $p=0.037$). Compared to random block, there was a reduction of reaction time for sequence block ($t=2.635$; $p=0.02$), only for sham ctDCS, reflecting learning process. Interestingly, when anodal and cathodal ctDCS were applied, the expected implicit motor learning was abolished. ANOVA revealed no significant changes in the MEPs of motor cortex ipsilateral to ctDCS

Conclusion: our results suggest that lateral cerebellar modulation, independent on polarity, disrupts procedural motor learning in the upper limb contralateral to stimulation, but did not influence the ipsilateral primary motor cortex excitability.

Keywords: cerebellum, cerebellar transcranial direct current stimulation, serial reaction time task, motor learning, transcranial magnetic stimulation

Introduction

Many studies have demonstrated the cerebellum as a learning machine, responsible for motor control and motor learning (1). In fact, cerebellum primordial functions are planning, initiation, organization, stabilization and long term memory of movements (2). Research over the recent years has proposed that noninvasive brain stimulation (NIBS) can modulate these functions (3) and represents an important step toward a better understanding of cerebellar circuitry in the central nervous system.

At the moment, functional connectivity between the cerebellum and primary motor cortex (M1) is the most studied cerebellar circuitry by non-invasive brain stimulation (4). A series of experiments conducted in healthy subjects has demonstrated that cerebellar tDCS (ctDCS), through cerebello-thalamo-cortical connections, affects contralateral M1 activity (2) and the movements executed with the ipsilateral limbs (5, 6). Hemispheric lateralization of function is an organizational feature of the motor system. Each body side is predominantly controlled by the contralateral cerebral cortex and the ipsilateral cerebellum (7).

However, considering the interhemispheric cortical connections (8) it has been demonstrated that activation of M1 can also interfere in the homologous areas activity of the contralateral hemisphere and, consequently, in the ipsilateral hemibody (9-11). Indeed, Kobayashi and colleagues (9) showed that decreasing M1 excitability it is observed an increase in the contralateral M1 excitability and an enhancement of ipsilateral motor learning (9).

These findings have attracting interest for investigating whether activation of lateral cerebellar hemisphere also could influence the ipsilateral

motor cortex activity and contralateral limb performance. Through neuroimaging studies, some authors have shown bilateral cerebello-cortical activation and transitory activation of the contralateral dentate nucleus during unilateral limb movement (12). Thus, the purpose of this study was to assess ctDCS effects over the ipsilateral cortical excitability and motor learning in the contralateral upper limb of healthy subjects.

Methods

Subjects

Twelve healthy volunteers (aged 22.16 ± 1.46 years; 12 women), right handed assessed by the Edinburgh Handedness Inventory (13) participated in this study. None were taking any acute or regular medication at the time of the study, or had a history of neurological, psychiatric, or medical disease, family history of epilepsy, pregnancy, cardiac pacemaker or previous surgery involving metallic implants. Subjects were recruited from the local university community. Experiments were conducted under a protocol approved by the local research ethics committee and were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants gave their written informed consent prior to the experiment.

Experimental Design

The study was conducted on the basis of a doubled-blind sham-controlled crossover design. Subjects underwent three experimental sessions, each one with a different stimulation modality (anodal, cathodal and sham ctDCS). The sessions were minimally at least 48 hours apart. This has been suggested to be a good interval to minimize carry-over effects (14). The participants performed

M1 excitability and motor learning assessments before and immediately after the end of the sessions. The order of the sessions was counterbalanced among participant. Both subjects and researchers responsible for the assessments were blind with respect to ctDCS protocols. Adverse effects associated with the stimulation were assessed using a previously described questionnaire (13) after each tDCS session.

Cerebellar transcranial direct current stimulation

For ctDCS, continuous direct current (1mA) was applied over the scalp by a constant-current stimulator (Soterix, USA), using a pair of saline-soaked surface electrodes (5x5 cm). One electrode was placed over the right cerebellar hemisphere, 3 cm laterally to the inion, and the other one over the right arm deltoid muscle. Anodal ctDCS was performed for 13 min and cathodal tDCS for 9 min. These stimulation durations has been shown to elicit a motor cortex excitability enhancement lasting for about 1 hour (14). For sham stimulation, ctDCS was applied for 30 s, insufficient time to modulate the cerebellar cortex (15).

Motor learning assessment

To investigate the motor learning, a variant model of the serial reaction time task (SRTT) was used (16). For the test, participants were seated in front of a computer screen. A yellow light appeared in one of four stars image that were horizontally spaced and permanently marked on a computer screen. According to the position of the yellow light, subjects were instructed, as quickly and accurately as possible, to press, on the keyboard, keys with a different finger of the left hand (index finger for keys N or M, middle finger for keys G or

H, ring finger for keys D or F, and little finger for keys Z and X). After the correct key was pushed, the visual signal disappeared and the next stimulus was displayed 500 ms after the participant pushed the correct button.

The test consisted of 8 blocks of 120 trials (total of 960 trials). In blocks 1 and 6 the sequence of stimulus followed a random order. In blocks 2–5 and 7–8, the same 10-trial sequence of light positions was repeated 12 times in each block. Reaction time (RT) and error rate was measured by software.

Cortical excitability assessment

Right cortical hemisphere excitability was assessed by the motor evoked potential (MEP) elicited by transcranial magnetic stimulation (TMS). Single-pulse TMS was performed by a magnetic stimulator (Neurosoft, Russia) with a figure-of-eight coil (diameter= 70mm; peak magnetic field= 2.2 Tesla). The participants were seated in a comfortable chair with head and arm rests. The coil was held tangentially to the scalp with the handle in a posterior direction at 45° from the sagittal plane. MEPs were recorded over the representational motor cortical area of the left first dorsal interosseous muscle (FDI). The coil position was defined as the site where stimulation resulted consistently in the largest MEPs. Surface EMG was recorded from the left FDI with Ag-AgCl electrodes in a belly-tendon montage. The stimulator intensity was adjusted to elicit baseline MEPs of 1 mV peak-to-peak amplitude (average) and was kept constant for the post-stimulation assessment. The signals were amplified and filtered with a time constant of 80 ms and a low-pass filter of 5 Hz then digitized at an analogue-to-digital rate of 2 KHz and further relayed into a laboratory computer using the Neuro-MEP-Micro software (Neurosoft Company, Russia).

Statistical analyses

In each trial of SRTT, RT was measured from the appearance of the visual signal until the correct key was pushed by the subject. For each block of trials, mean RT and error rate was calculated. For RT and error rate, statistical analyses were carried out by repeated-measure analyses of variance (ANOVA) with ctDCS protocols (anodal, cathodal and sham ctDCS) and blocks (6 and 7 block) as within-subject factors.

Individual MEP amplitude means were calculated for baseline and post session. The post session MEPs were analyzed as baseline ratios. Statistical analysis was carried out for MEP amplitudes by a repeated-measures ANOVA with ctDCS protocols (anodal, cathodal and sham ctDCS) and time (before and after stimulation) as within factors.

Paired t test was used as post hoc comparisons when applicable. The Mauchly test of sphericity was checked and when violated, the Greenhouse–Geisser correction was performed. The significance level was set at an alpha value of $<.05$. All analyses were performed using the SPSS 20.0 statistical package.

Results

No adverse events were reported by any of the participants. For SRTT, the results of the ANOVA showed significant main effect for blocks ($F=5.34$; $p=0.037$). No significant differences for ctDCS protocols factor ($F=0.273$; $p=0.763$) and interaction between blocks and ctDCS protocols ($F=1.040$; $p=0.367$) were found. Compared to block 6, post hoc test revealed significant lower RT for sequence 7 ($t=2.635$; $p=0.02$), only for sham ctDCS, reflecting

learning process. Interestingly, when anodal and cathodal ctDCS were applied, the expected implicit motor learning was not observed (Figure 1A).

INSERT FIGURE 1

For error rate, no significant effect was observed for block ($F=2.309$; $p=0.151$), ctDCS protocols ($F=1.34$; $p=0.278$) or interaction block and ctDCS ($F=0.508$; $p=0.607$) (Figure 1B).

INSERT FIGURE 2

At baseline, no significant among-session differences were found regarding MEP ($F=1.97$; $p=0.15$). ANOVA also revealed no significant changes for time ($F=1.75$; $p=0.20$), ctDCS protocols ($F=1.97$; $p=0.15$) and time x ctDCS interaction ($F=1.97$; $p=0.15$) after stimulation (Figure 2)

INSERT FIGURE 3

Discussion

The main result of this study is that lateral ctDCS, independent on polarity, disrupts procedural motor learning in the upper limb contralateral to stimulation, but did not influence the ipsilateral primary motor cortex excitability.

Similarly to our study, Torriero and colleagues (2004) also investigated the role of laterality on cerebellum function. Although these authors also used the SRTT paradigm, they investigated the effect of 1Hz rTMS over the implicit learning when performed with ipsi or contralateral hand. However their results suggests that's low frequency TMS, which is known to induce a "virtual lesion", also disrupts implicit learning when the tasks was performed either with ipsilateral or contralateral hand (17).

In contrast, another study demonstrated that patients with focal cerebellar lesions did not acquire procedural learning when performing the task with the hand ipsilateral to the lesion, but showed normal learning with the contralateral hand (18), suggesting the lateral cerebellum is not directly involved in the contralateral limb activity. Indeed, the existence of projections to ipsilateral motor cortex from the cerebellar nuclei has been previously discarded (19).

Thus, how ctDCS interferes on the procedural learning in the upper limb contralateral to stimulation remains unclear. It is well established that cerebellar cortex influences the contralateral motor cortex activity via dentate-thalamo-cortical pathway (2, 20, 21). Despite of the variability in application of ctDCS and differences in the results, the most of studies has shown that ctDCS leads to changes in cortical excitability of contralateral M1 (2,21). Considering the interhemispheric cortical connections where activation of motor cortex can affect contralateral homologous areas activity (8, 22) we hypothesized that, activation of lateral cerebellar hemisphere might indirectly influence the ipsilateral motor cortex activity through the interhemispheric cortical connections and, consequently, affect the contralateral limb performance. Studies pointed out enhancement in motor performance after an increase in M1 excitability (23). But, our study failed to show any significant change in ipsilateral M1 excitability after lateral ctDCS.

The lack of effects on M1 excitability might be mainly due limitations of the assessment approach, since ctDCS leads to tonic changes in Purkinje cell excitability and could not lead to direct activation of the cerebellum-thalamo-cortical pathway during rest (2). Even though there is no direct way in which

cerebellar excitability can be assessed in humans, measuring CBI could be a more reliable tool.

Another possibility for the lack of results on M1 cortical excitability is the intensity (1 mA) and current density (0.04 mA/cm²) used in our study. Boggio and colleagues (2006) did not find any changes in M1 excitability after 1 mA anodal tDCS over M1 with a current density of 0.028mA/cm² (23). Bastani and Jaberzadeh (2013) investigated whether different anodal tDCS current densities (0.013 mA/cm², 0.029 mA/cm², 0.058 mA/cm² and 0.083 mA/cm²) could induce different corticospinal excitability changes. The authors observed an increase in M1 excitability with larger current density when comparing the three largest ones, showing that stimulation efficacy can be affected by the current density (24).

Limitations of the present study are the lack of assessment of fatigue and attention levels, which could interfere on the SRTT results (25). Another limitation is the fact that all participants were women and it is known that inter-individual variations, such as gender, may affect cortical excitability (26).

Conclusion

Present study results show that ctDCS can modulate cerebellar function on motor learning with contralateral limb and could be a promising tool for cerebellar disorders treatment. Nonetheless, more research are needed in order to understand how the gains on motor learning could be consolidated after ctDCS and how it could be used in patients with neurological disorders.

References

1. Bastian AJ. Learning to predict the future: the cerebellum adapts feedforward movement control. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(6):645-9.

2. Galea JM, Jayaram G, Ajagbe L, Celnik P. Modulation of cerebellar excitability by polarity-specific noninvasive direct current stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(28):9115-22.
3. Ferrucci R, Cortese F, Priori A. Cerebellar tDCS: how to do it. *Cerebellum*. 2015;14(1):27-30.
4. Grimaldi G, Argyropoulos GP, Boehringer A, Celnik P, Edwards MJ, Ferrucci R, et al. Non-invasive cerebellar stimulation--a consensus paper. *Cerebellum*. 2014;13(1):121-38.
5. Cantarero G, Spampinato D, Reis J, Ajagbe L, Thompson T, Kulkarni K, et al. Cerebellar Direct Current Stimulation Enhances On-Line Motor Skill Acquisition through an Effect on Accuracy. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(7):3285-90.
6. Wessel MJ, Zimerman M, Timmermann JE, Heise KF, Gerloff C, Hummel FC. Enhancing Consolidation of a New Temporal Motor Skill by Cerebellar Noninvasive Stimulation. *Cerebral cortex*. 2015.
7. Schlerf JE, Galea JM, Spampinato D, Celnik PA. Laterality Differences in Cerebellar-motor Cortex Connectivity. *Cerebral cortex*. 2014.
8. Zarei M, Johansen-Berg H, Smith S, Ciccarelli O, Thompson AJ, Matthews PM. Functional anatomy of interhemispheric cortical connections in the human brain. *Journal of anatomy*. 2006;209(3):311-20.
9. Kobayashi M, Theoret H, Pascual-Leone A. Suppression of ipsilateral motor cortex facilitates motor skill learning. *The European journal of neuroscience*. 2009;29(4):833-6.
10. Kobayashi M, Hutchinson S, Theoret H, Schlaug G, Pascual-Leone A. Repetitive TMS of the motor cortex improves ipsilateral sequential simple finger movements. *Neurology*. 2004;62(1):91-8.
11. Avanzino L, Bove M, Trompetto C, Tacchino A, Ogliastro C, Abbruzzese G. 1-Hz repetitive TMS over ipsilateral motor cortex influences the performance of sequential finger movements of different complexity. *The European journal of neuroscience*. 2008;27(5):1285-91.
12. Lehericy S, Benali H, Van de Moortele PF, Pelegrini-Issac M, Waechter T, Ugurbil K, et al. Distinct basal ganglia territories are engaged in early and advanced motor sequence learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(35):12566-71.
13. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971;9(1):97-113.
14. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain stimulation*. 2008;1(3):206-23.
15. Galea JM, Celnik P. Brain polarization enhances the formation and retention of motor memories. *Journal of neurophysiology*. 2009;102(1):294-301.
16. Nitsche MA, Schauenburg A, Lang N, Liebetanz D, Exner C, Paulus W, et al. Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human. *Journal of cognitive neuroscience*. 2003;15(4):619-26.
17. Torriero S, Oliveri M, Koch G, Caltagirone C, Petrosini L. Interference of left and right cerebellar rTMS with procedural learning. *Journal of cognitive neuroscience*. 2004;16(9):1605-11.
18. Gomez-Beldarrain M, Garcia-Monco JC, Rubio B, Pascual-Leone A. Effect of focal cerebellar lesions on procedural learning in the serial reaction time task. *Experimental brain research*. 1998;120(1):25-30.
19. Popa T, Russo M, Meunier S. Long-lasting inhibition of cerebellar output. *Brain stimulation*. 2010;3(3):161-9.
20. Habas C. Functional imaging of the deep cerebellar nuclei: a review. *Cerebellum (London, England)*. 2010;9(1):22-8.

21. Minks E, Kopickova M, Marecek R, Streitova H, Bares M. Transcranial magnetic stimulation of the cerebellum. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2010;154(2):133-9.
22. Nowak DA, Grefkes C, Ameli M, Fink GR. Interhemispheric competition after stroke: brain stimulation to enhance recovery of function of the affected hand. *Neurorehabilitation and neural repair*. 2009;23(7):641-56.
23. Boggio PS, Castro LO, Savagim EA, Braite R, Cruz VC, Rocha RR, et al. Enhancement of non-dominant hand motor function by anodal transcranial direct current stimulation. *Neuroscience letters*. 2006;404(1-2):232-6.
24. Bastani A, Jaberzadeh S. Differential modulation of corticospinal excitability by different current densities of anodal transcranial direct current stimulation. *PloS one*. 2013;8(8):e72254.
25. Ferrucci R, Marceglia S, Vergari M, Cogiamanian F, Mrakic-Sposta S, Mameli F, et al. Cerebellar transcranial direct current stimulation impairs the practice-dependent proficiency increase in working memory. *Journal of cognitive neuroscience*. 2008;20(9):1687-97.
26. Li LM, Uehara K, Hanakawa T. The contribution of interindividual factors to variability of response in transcranial direct current stimulation studies. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:181.

Figures

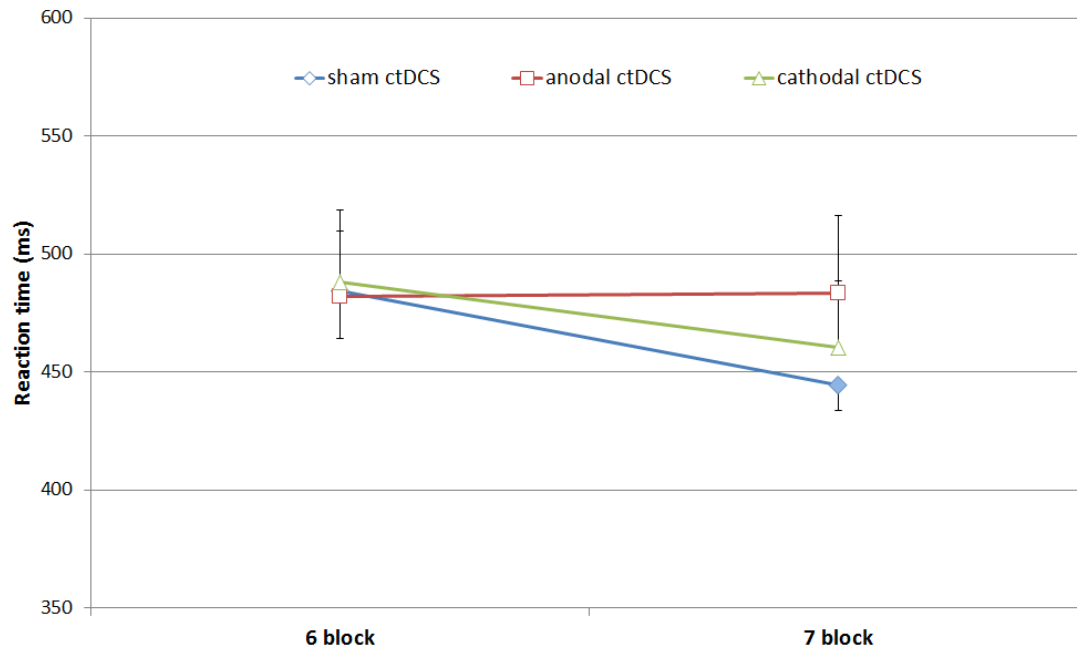


Figure 1 . Mean of reaction times for random (6 block) and sequence block (7 block) of serial reaction time task after cerebellar transcranial direct stimulation (anodal, cathodal and sham ctDCS). Vertical bars depict standard error of mean. Filled symbol indicates significant deviation of time from 6 block (paired t test; $p < 0.05$).

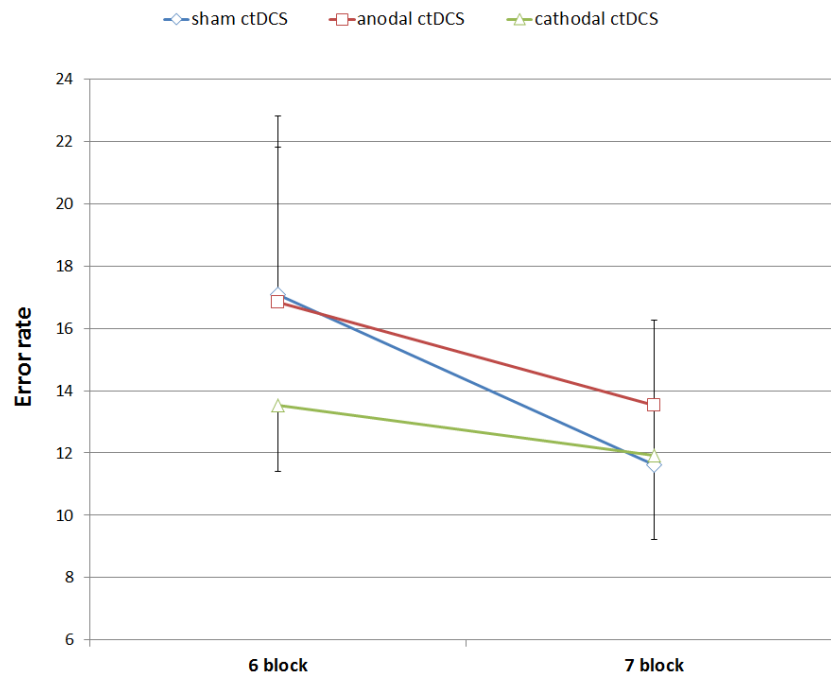


Figure 2. Error rate for random (6 block) and sequence block (7 block) of serial reaction time task after cerebellar transcranial direct stimulation (anodal, cathodal and sham ctDCS). Vertical bars depict standard error of mean (ANOVA ≤ 0.05 student t test; $p \leq 0.05$).

APÊNDICE II – ARTIGO ORIGINAL (Estudo 2)

Journal Section: Cognition

Title: Polarity-dependent specific modulation of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on procedural learning and handwriting

Authors: Mello, Marina¹; Melo, Lorena¹; Bosford, Thamyris¹, Rocha, Sérgio¹; Monte-Silva, Katia¹

Affiliation: ¹Applied Neuroscience Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Running head: ctDCS influence on motor learning

Contact information: Katia Monte-Silva; ¹Applied Neuroscience Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Department of Physical Therapy. Avenida Jornalista Aníbal Fernandes s/n, 50670-900 Recife, Brazil. Phone: +55 81-2126 7579 / FAX: +55 81-2126 8491.

Conflict of interest: All authors declared no financial interests or potential conflict of interest.

Abstract

Introduction: evidence pointed out that transcranial current direct stimulation over the cerebellum (ctDCS) can effectively improves motor learning. However, this effect seems to be dependent on the type of stimulation protocol used and influenced by the complexity of motor learning task.

Purpose: to investigate the polarity-dependent specific modulation of ctDCS on motor learning tasks of different complexity.

Methods: by using a crossover and sham controlled design, 12 healthy volunteers (mean age: 24 ± 3.71 ; 7 women) were underwent three experimental sessions separated by at least 48 h. In each session a different type of cerebellar stimulation (2mA; 20 min) was applied: anodal, cathodal and sham. Motor learning was assessed after every session by Serial Reaction Time Task (SRTT), a non-specific motor task, and by handwriting test, a measure of a complex motor learning.

Results: For SRTT, ANOVA showed significant main effect only for block factor ($F=5.63$; $p=0.024$). Compared to random block, cathodal ($t=0.97$; $p=0.35$) and anodal ctDCS ($t=0.89$; $p=0.39$) disrupt the implicit motor learning revealed by significant decrease of RTs for sequence block after sham ctDCS ($t=2.27$; $p=0.04$). ANOVA revealed a significant main effect only in time factor for writing duration ($F=8.551$; $p=0.006$) and velocity ($F=8.551$; $p=0.006$). Compared to pre-stimulation values, the post hoc tests revealed significant increases of velocity after sham ($t=-2.555$; $p=0.025$) and cathodal ctDCS ($t=-2.267$; $p=0.043$). A reduction of writing time was observed only after cathodal ctDCS ($t=3.541$; $p=0.004$). ANOVA revealed no significant changes after cerebellar stimulation for word horizontal size.

Conclusion: our results suggest that the polarity-dependent ctDCS effects only are present when a complex motor learning task, as handwriting, is performed.

Keywords: Transcranial direct current stimulation. Cerebellum. Motor learning. Handwriting test. Serial reaction time task.

Introduction

The cerebellum is a complex structure which is connected to a large range of brain areas, including the thalamus, basal ganglia and cortex (1, 2) and develops a crucial role in motor learning process (3). Non-invasive cerebellar stimulation has recently provided novel information on this issue.

Evidence pointed out that stimulation over the cerebellum can effectively improve motor learning. Indeed, in a study devoted to analyze the effect of cerebellar transcranial direct current stimulation (ctDCS) on learning of a motor sequence, Ferrucci and colleagues (2013) showed that 20 min of anodal tDCS over the cerebellum (2 cm below theinion) improves bimanual procedural learning in healthy subjects (4). However, other studies have provided different results in this field. In the study by Torriero (5), for example, 10 min of repetitive transcranial magnetic stimulation (1Hz; 600 pulses) over the lateral (right and left) cerebellum impaired procedural learning.

This controversial result indicates that the effects of cerebellar stimulation can be influenced by the type of stimulation protocol used. In most circumstances, tDCS induces a polarity-dependent site specific modulation in motor primary cortex activity in healthy subjects. Anodal tDCS on primary motor cortex increases the cortical excitability as shown by enhanced motor evoked potential (MEP) amplitudes of hand muscle, while cathodal tDCS decreases it as evidenced by a decrease in MEP size (6, 7).

We designed this study to investigate polarity-dependent effect of cerebellar tDCS on procedural learning as measured by the serial reaction time task (SRTT) and on a complex learning process measured by handwriting. To our knowledge, the issue of the polarity-dependent specific modulation of cerebellar tDCS on motor learning task of different complexity has never been directly addressed.

The SRTT have been used in both healthy volunteers (4) and patients with cerebellar damage (8, 9). The test is based on subject ability to respond to series of stimulus presented either in a sequence or in random order (10). Although it can have a declarative component (conscious learning of the sequence), implicit motor learning can be measured by the change in performance between sequenced and random blocks. Handwriting is a complex perceptual–motor skill that implies the contribution of several cognitive and motor functions (hand manipulation, bilateral integration, and motor planning) (11). We hypothesized that the difference in complexity between handwriting and non-specific motor tasks, as the SRTT, could imply in different result of ctDCS on motor learning.

Materials and methods

Participants

12 healthy right handed subjects (assessed by the Edinburgh Inventory of Manual Preference) (12) (aged 24 ± 3.71 ; 7 women) participated in the study. None were taking any acute or regular medication at the time of the study, or had history of neurological, psychiatric, or medical disease, family history of epilepsy, pregnancy, cardiac pacemaker or previous surgery involving metallic implants. Subjects were recruited from the campus of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil. Experiments were conducted under a protocol approved by the Local Research Ethics Committee and were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants gave their written informed consent prior to the experiment.

Experimental Protocol

The study had a crossover, double blind, sham-controlled and randomized design (Clinical Trials ID: NCT02557841). Participants attended three experimental sessions, with a counterbalanced order and separated by at least 48 hours, each one with a different stimulation modality (anodal, cathodal and sham ctDCS). Randomization was performed by a noninvolved researcher using a website (www.randomization.com). Allocation concealment was

guaranteed since only the researchers responsible for stimulation had access to opaque sealed envelopes with intervention assignments.

In each experimental session, first, participants were asked about their perceived fatigue and attention using a visual analogic scale graded from 0 to 10, where 0 means lower fatigue or attention levels and 10, the higher fatigue or attention levels. These measures were used to investigate whether ctDCS-induced effects were specific for learning or reflected changes in arousal or attention. Then, handwriting test was performed followed by ctDCS. After cerebellar stimulation, handwriting test was repeated and subjects performed a serial reaction time task (SRTT). Adverse effects associated with the stimulation were assessed using a previously described questionnaire (13).

A separated investigator applied the ctDCS protocol. Both subjects and researchers responsible for the evaluation methods were blinded to the type of ctDCS delivered in each session.

Handwriting Test

To investigate a complex learning process, writing kinematics were measured by handwriting recording software (MovAlyzer, EUA). For this test, participants were instructed to write six words with digital pen using the non-dominant hand (left) on a tablet provided with analysis software system. The task was performed spontaneously, without any instructions during writing activity. Each session had different word sequences but the difficulty level was maintained among sessions (six words, two of them with 4, 6 and 8 letters) (14).

Handwriting performance was measured by four components of writing: (i) writing duration; (ii) word horizontal size and (iii) writing velocity (14). Writing duration is an important element in task performance (15) and generally, decreases with motor learning (16). Word horizontal size was defined as the distance between the extreme left and right point of the word and also decreases with motor learning and writing velocity as the total length of strokes per time to write the word.

Serial time reaction task

To investigate implicit motor learning, a variant model of the SRTT was used (17). In this test, reaction time (RT) was assessed by a software which shows a visual stimulus (yellow light) on a computer screen in four different positions. Each position corresponding to one specific key on the keyboard that the volunteer should press, as quickly and accurately as possible, with a predetermined finger of left hand (index finger for keys N or M, middle finger for keys G or H, ring finger for keys D or F, and little finger for keys Z and X). After the correct key was pushed, the visual signal disappeared and the next stimulus was displayed 500 ms after the participant pushed the correct button.

The test consisted of 8 blocks, each one with 120 trials (total of 960 trials). Blocks 1 and 6 had a random order, whereas the others had a 10 stimulus sequence that repeated itself 12 times in each block. Motor learning was measured by the performance variation between the random block 6 and the sequence block 7. Although imperceptible to volunteers, it was expected a decrease in the RT during block 7 (sequence block), when compared to block 6 (random block), evidencing the implicit motor learning (17).

Cerebellar transcranial direct current stimulation

TDCS was delivered at a constant current of 2 mA (fade in and fade out of 10 seconds) for 20 min via two 35 cm² saline soaked sponge electrodes using a direct current stimulator (NeuroConn Plus, Germany). The active electrode (anode or cathode) was placed over the left cerebellum (3 cm lateral and 1 cm under to the inion) (18) and the reference over the deltoid muscle (4).

For sham ctDCS, electrodes were placed in the same of cathodal ctDCS position, however stimulation lasted only 30 seconds. The electrodes were kept on the scalp during the same time (20min) as in the active stimulation condition. 30 s of stimulation was proved to be insufficient to modulate the cerebellar cortex (19) but volunteers were able to perceive early stimulation sensations such as mild to moderate tingling on stimulation site.

After each stimulation session, participants were asked about any perceived adverse effects of ctDCS, such as headache, drowsiness and tingling (13).

Statistical analyses

The data were analyzed blind to experimental condition. For each trial of the SRTT, RT was measured from the appearance of the go signal until the correspondent button was pushed by the subject. For each block of trials of a given experimental condition, mean RT was calculated for each subject separately. For each block of trials, mean error rate was also calculated. For RT and error rate, statistical analyses were carried out by a repeated-measure analysis of variance (ANOVA) with ctDCS protocols (anodal, cathodal and sham) as between-subject factor and blocks (6 and 7 block) as within-subject factor.

For handwriting analyses, absolute values of each handwriting component (word horizontal size, writing duration and velocity) before and after each session were used. Repeated-measure ANOVAs were performed with ctDCS protocols (anodal, cathodal and sham) as between-subject factor and time (pre-stimulation and post-stimulation) as within-subject factor for each writing component.

For all ANOVAs, the Mauchly test of sphericity was checked and the Greenhouse–Geisser correction was performed, when appropriate. Paired t test was used as post hoc comparisons when applicable. P value of < 0.05 was considered significant for all statistical analyses. Pearson's chi-square test was conducted to examine reported adverse effects. All analyses were performed using the SPSS 20.0 statistical package.

Results

Results for reported adverse effects are shown in table 1. The findings indicated that there was no difference among sessions for adverse effects,

except for skin redness that was more reported during the anodal ctDCS session.

INSERT TABLE 1

For SRTT, considering RTs, the results of the ANOVA showed significant main effect only for block factor ($F=5.63$; $p=0.024$). No significant differences for ctDCS protocols factor ($F=0.05$; $p=0.951$) and interaction between blocks and ctDCS protocols ($F=0.65$; $p=0.57$) were found. Compared to random block (6 block), post hoc test revealed a significant decrease of RTs for sequence block ($t=2.27$; $p=0.04$), only for sham ctDCS, reflecting learning process. Compared to 6 block, when anodal ($t=0.89$; $p=0.39$) and cathodal ctDCS ($t=0.97$; $p=0.35$) were applied, the expected decrease of RTs at the sequence block was not observed (Figure 1).

INSERT FIGURE 1

For error rate, no significant differences were found for time ($F=0.323$; $p=0.573$), ctDCS protocol ($F=0.875$; $p=0.425$) or interaction between time and ctDCS protocol ($F=1.400$; $p=0.26$) (Figure 2).

INSERT FIGURE 2

Before stimulation, no significant among-session differences were found regarding the writing components: writing duration ($F=0.362$; $p=0.698$); word horizontal size ($F=0.052$; $p=0.949$) and writing velocity ($F=0.014$; $p=0.986$).

Results of each component of the handwriting test are shown in figure 3. With regard to writing duration (Figure 3A), ANOVA revealed a significant main effect only for time ($F=8.551$; $p=0.006$). Post hoc test pointed out a reduction of writing time only after cathodal ctDCS ($t=3.541$; $p=0.004$), when compared to pre-stimulation conditions. With regard to word horizontal size (Figure 3B), ANOVA revealed no significant changes for time ($F=0.164$; $p=0.688$), ctDCS protocols ($F=0.32$; $p=0.968$) and time x ctDCS protocols interaction ($F=0.61$; $p=0.548$). Similar to writing duration, ANOVA revealed a significant main effect only for time ($F=8.551$; $p=0.006$) for writing velocity. However, for this writing

component, when compared to pre-stimulation values, the post hoc tests revealed significant increases of velocity for both sham ctDCS ($t=-2.555$; $p=0.025$) and cathodal ctDCS sessions ($t=-2.267$; $p=0.043$) (Figure 3C).

INSERT FIGURE 3

Discussion

Our findings suggest that for a simple, non-specific motor learning task, as the SRTT, the effects of cerebellar modulation seem to be independent polarity of stimulation. Indeed, both cathodal and anodal ctDCS for 20 minutes impaired the procedural motor learning. In contrast, for a complex learning task, as handwriting, the polarity-dependent effects are present. For the handwriting test, cathodal ctDCS improved motor learning while anodal stimulation can be impaired it.

Different from our findings, by using the same stimulation protocol (2mA; 20min) and motor learning task (SRTT), Ferrucci and colleagues (4) demonstrated that anodal ctDCS improves the implicit motor learning. However some differences between procedures can help to explain the discrepancy of the results. In Ferrucci' study, ctDCS was applied centered on the median line 2 cm below the inion with its lateral borders about 1 cm medially to the right and left cerebellar hemisphere and the SRTT performed by both hands (4) . In our study, the stimulation was applied over left cerebellum and the test made with the left hand. Interhemispheric differences in the lateral cerebellum on procedural motor learning have been demonstrated (5, 20).

Another reason for the divergence of findings could be due individual differences that can interfere with the expected response to tDCS. In a recent study, Li and colleagues (2015) have pointed out the main factors related to response variability, such as cranial and brain anatomy, neurological and cognitive functions basal levels, genetics and presence of brain damage (21). This reinforces the fact that it is more likely that the ideal protocol has to be unique for each person, especially when dealing with patients.

For handwriting, anodal stimulation seems to impair the motor learning. Indeed, the enhancement of writing velocity observed after sham stimulation was abolished by anodal ctDCS. Studies revealed that handwriting movements become faster with motor learning (16). In line with this result Foerster and colleagues (2013) also observed that anodal tDCS over lateral cerebellar hemisphere impaired the motor performance. Similarly, Galea et al. (2009) found that anodal tDCS over the right cerebellar cortex can increase the inhibitory tone that the cerebellum exerts over the motor cortex. The inhibition of the motor cortex after cerebellar tDCS could be one explanation for the impairment of handwriting legibility observed in our study.

On the other hand, cathodal stimulation showed significant improvement when comparing values pre and post-stimulation for writing duration and velocity. In our study, a possible explanation for the polarity-dependent effects of ctDCS on handwriting, in contrast to SRTT, might be due the difference between the complexities of the motor learning tasks. Indeed, handwriting is a complex perceptual–motor skill that implies the contribution of several cognitive and motor functions (11).

Although studies have been developed to understand cognitive functions linked to the cerebellum (22) and how they can be influenced by cerebellar tDCS (23), cerebellar cognitive influence on handwriting is still no clear. However studies suggest that cerebellum is responsible for both motor and cognitive functions needed for the execution of this task (24, 25). Thus, studies combining handwriting and tDCS can lead to a better understanding of the mechanisms underlying this type of learning and help cerebellar patients.

In conclusion, our findings suggest that both cathodal and anodal stimulation of the cerebellum can impair procedural learning assessed by SRTT. Cathodal stimulation can enhance the performance on handwriting, while anodal stimulation has an opposite effect. These results highlight that more research is needed in order to understand how cerebellar stimulation can interfere with motor learning and to establish optimal tDCS protocols for both healthy volunteers and patients.

References

1. Bastian AJ. Learning to predict the future: the cerebellum adapts feedforward movement control. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(6):645-9.
2. Mottolese C, Richard N, Harquel S, Szathmari A, Sirigu A, Desmurget M. Mapping motor representations in the human cerebellum. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 1):330-42.
3. Celnik P. Understanding and Modulating Motor Learning with Cerebellar Stimulation. *Cerebellum*. 2014.
4. Ferrucci R, Brunoni AR, Parazzini M, Vergari M, Rossi E, Fumagalli M, et al. Modulating human procedural learning by cerebellar transcranial direct current stimulation. *Cerebellum*. 2013;12(4):485-92.
5. Torriero S, Oliveri M, Koch G, Caltagirone C, Petrosini L. Interference of left and right cerebellar rTMS with procedural learning. *Journal of cognitive neuroscience*. 2004;16(9):1605-11.
6. Nitsche MA, Seeber A, Frommann K, Klein CC, Rochford C, Nitsche MS, et al. Modulating parameters of excitability during and after transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. *The Journal of physiology*. 2005;568(Pt 1):291-303.
7. Paulus W. Outlasting excitability shifts induced by direct current stimulation of the human brain. *Supplements to Clinical neurophysiology*. 2004;57:708-14.
8. Spencer RM, Ivry RB. Sequence learning is preserved in individuals with cerebellar degeneration when the movements are directly cued. *Journal of cognitive neuroscience*. 2009;21(7):1302-10.
9. Molinari M, Leggio MG, Solida A, Ciorra R, Misciagna S, Silveri MC, et al. Cerebellum and procedural learning: evidence from focal cerebellar lesions. *Brain : a journal of neurology*. 1997;120 (Pt 10):1753-62.
10. Baillieux H, De Smet HJ, Paquier PF, De Deyn PP, Marien P. Cerebellar neurocognition: insights into the bottom of the brain. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2008;110(8):763-73.
11. Feder KP, Majnemer A. Handwriting development, competency, and intervention. *Developmental medicine and child neurology*. 2007;49(4):312-7.
12. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971;9(1):97-113.
13. Brunoni AR, Amadera J, Berbel B, Volz MS, Rizzerio BG, Fregni F. A systematic review on reporting and assessment of adverse effects associated with transcranial direct current stimulation. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*. 2011;14(8):1133-45.
14. Foerster A, Rocha S, Wiesiolek C, Chagas AP, Machado G, Silva E, et al. Site-specific effects of mental practice combined with transcranial direct current stimulation on motor learning. *The European journal of neuroscience*. 2013;37(5):786-94.
15. Bonney M-A. Understanding and Assessing Handwriting Difficulty: Perspectives from the Literature. *Australian Occupational Therapy Journal*. 1992;39(3):7-15.
16. Overvelde A, Hulstijn W. Handwriting development in grade 2 and grade 3 primary school children with normal, at risk, or dysgraphic characteristics. *Research in developmental disabilities*. 2011;32(2):540-8.
17. Nitsche MA, Schauenburg A, Lang N, Liebetanz D, Exner C, Paulus W, et al. Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human. *Journal of cognitive neuroscience*. 2003;15(4):619-26.

18. Ugawa Y, Uesaka Y, Terao Y, Hanajima R, Kanazawa I. Magnetic stimulation over the cerebellum in humans. *Annals of neurology*. 1995;37(6):703-13.
19. Galea JM, Jayaram G, Ajagbe L, Celnik P. Modulation of cerebellar excitability by polarity-specific noninvasive direct current stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(28):9115-22.
20. Seitz RJ, Roland E, Bohm C, Greitz T, Stone-Elander S. Motor learning in man: a positron emission tomographic study. *Neuroreport*. 1990;1(1):57-60.
21. Li LM, Uehara K, Hanakawa T. The contribution of interindividual factors to variability of response in transcranial direct current stimulation studies. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:181.
22. De Smet HJ, Paquier P, Verhoeven J, Marien P. The cerebellum: its role in language and related cognitive and affective functions. *Brain and language*. 2013;127(3):334-42.
23. Pope PA, Miall RC. Task-specific facilitation of cognition by cathodal transcranial direct current stimulation of the cerebellum. *Brain stimulation*. 2012;5(2):84-94.
24. Purcell JJ, Turkeltaub PE, Eden GF, Rapp B. Examining the central and peripheral processes of written word production through meta-analysis. *Frontiers in psychology*. 2011;2:239.
25. Planton S, Jucla M, Roux FE, Demonet JF. The "handwriting brain": a meta-analysis of neuroimaging studies of motor versus orthographic processes. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*. 2013;49(10):2772-87.

TABLES

Table 1. Percentage of volunteers who reported adverse effects after cerebellar stimulation.

Adverse effect	Sham ctDCS	Anodal ctDCS	Cathodal ctDCS	<i>P</i>
Headache (%)	25%	8.3%	8.3%	0.395
Neck pain (%)	0%	0%	0%	-
Scalp pain (%)	0%	0%	8.3%	0.358
Tingling (%)	41.7%	50%	41.7%	0.894
Itching (%)	66.7%	97.7%	91.7%	0.165
Burning (%)	50%	58.3%	66.7%	0.710
Skin redness (%)	25%	75%	50%	0.05*
Sleepiness (%)	16.7%	8.3%	16.7%	0.793
Trouble concentrating (%)	8.3%	8.3%	16.7%	0.755
Acute mood change (%)	0%	0%	8.3%	0.358

Chi-square test; * Statistical difference;

Figures

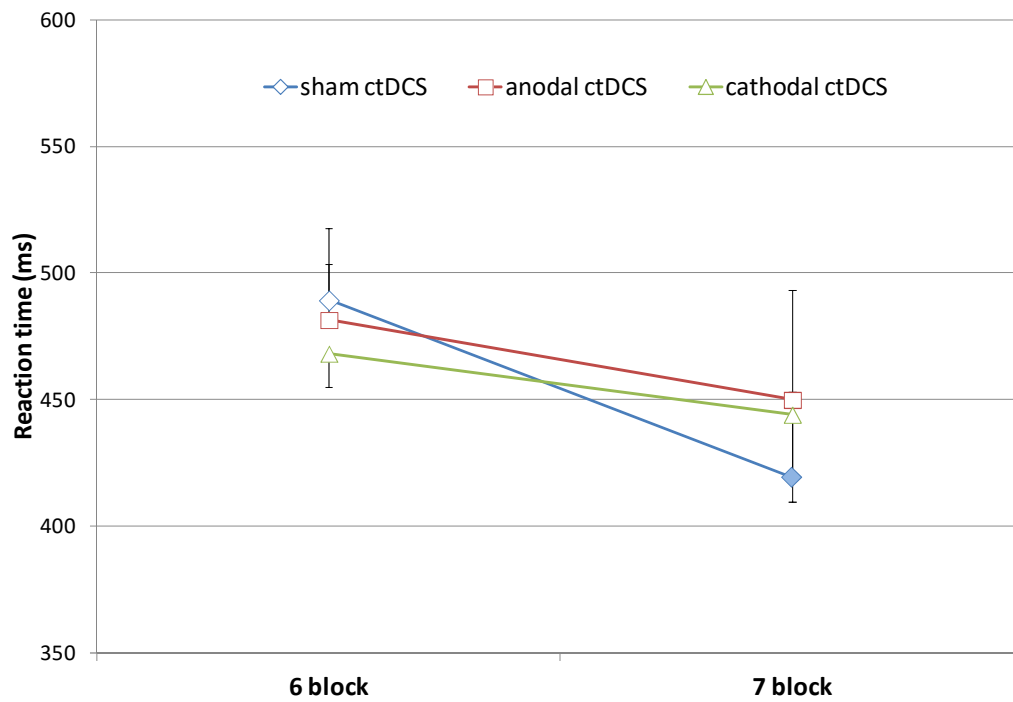


Figure 1 . Mean of reaction times for random (6 block) and sequence block (7 block) of serial reaction time task after cerebellar transcranial direct stimulation (anodal, cathodal and sham ctDCS). Vertical bars depict standard error of mean. Filled symbol indicates significant deviation of time from 6 block (paired t test; $p < 0.05$).

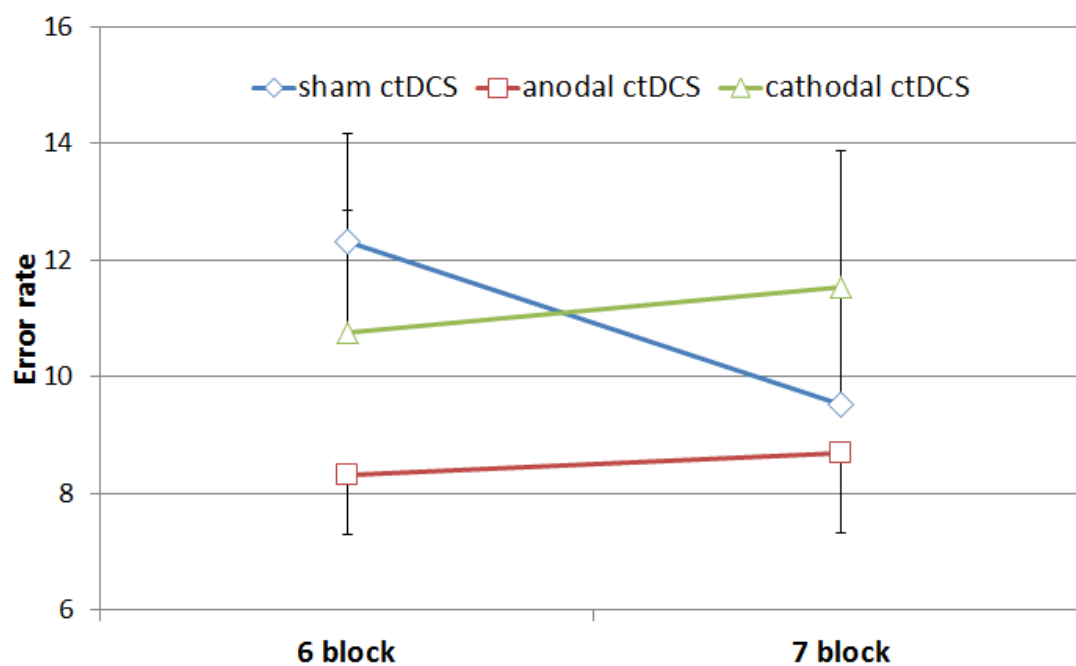


Figure 2. Error rate for random (6 block) and sequence block (7 block) of serial reaction time task after cerebellar transcranial direct stimulation (anodal, cathodal and sham ctDCS). Vertical bars depict standard error of mean.

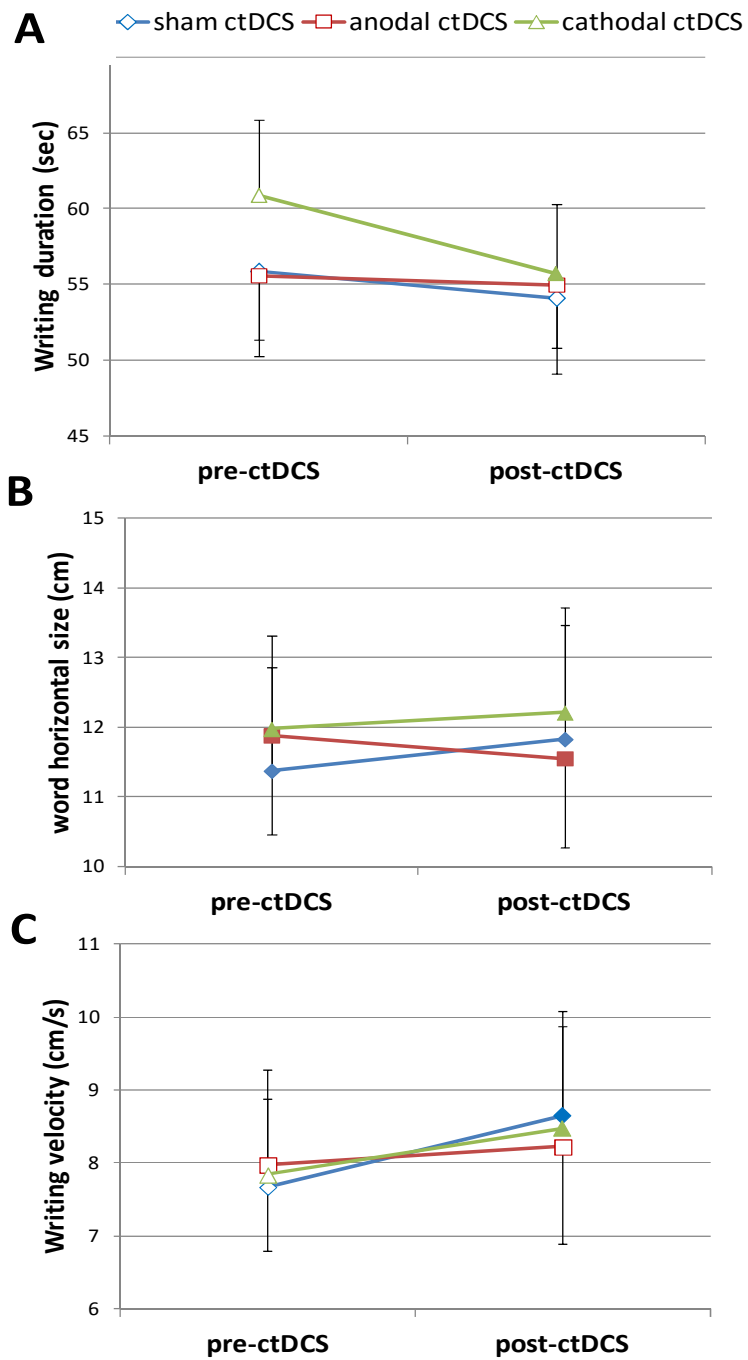


Figure 3. Effect of cerebellar transcranial direct current stimulation (sham, anodal and cathodal ctDCS) before (pre-ctDCS) and after (pos-ctDCS) on three of handwriting components: **A.** writing duration. **B.** word horizontal size. **C.** writing velocity. Vertical bars depict standard error of mean. Filled symbol indicates significant deviation of pre-ctDCS conditions (paired t test; $p < 0.05$).

APÊNDICE III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (estudo 1)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Modelo para maiores de 18 anos; de acordo com a Resolução 466/12 - CNS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa **“Efeitos da estimulação transcraniana por corrente direta cerebelar sobre o aprendizado motor de indivíduos saudáveis”**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora **Kátia Karina do Monte-Silva**. Endereço do pesquisador responsável: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisioterapia, Avenida Professor Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária - Recife/PE-Brasil CEP: 50670-901. Telefone: (81) 2126-8939 / Fax: (81) 2126-8939 / e-mail: monte.silvakk@gmail.com

Também participa desta pesquisa: **Marina Almeida de Mello** – mestranda do Programa de Pós-graduação em Neurociência e Comportamento (contato: 81 99181037).

Este termo de consentimento pode conter informações que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Objetivo da pesquisa: avaliar e comparar os efeitos da estimulação transcraniana por corrente direta cerebelar sobre o aprendizado motor de indivíduos saudáveis.

Procedimentos da Pesquisa: se concordar em participar, você participará de três sessões que incluirão as seguintes medidas, escalas, questionários e intervenções: *inventário de segurança da estimulação magnética transcraniana no adulto, questionário de presença de indícios do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), questionário de dominância de Edimburgh, Escala de avaliação do nível de ansiedade e fadiga (HAD), avaliação da percepção de fadiga e atenção e perímetro da cabeça*. Esses dados serão coletados antes da primeira sessão. *Para cada sessão, será determinado através de um programa de computador a ordem em que o participante receberá a estimulação transcraniana por corrente contínua cerebelar (ETCCc) – anódica catódica ou sham – e logo em seguida, responderão ao questionário de efeitos adversos*. Todos esses procedimentos já foram utilizados anteriormente e oferecem riscos mínimos à saúde dos indivíduos submetidos a eles. A duração das sessões poderá variar de uma a duas horas aproximadamente, porém poderão ser realizados intervalos para repouso, caso você se sinta cansado.

Riscos: O estudo oferece pouco risco à saúde dos participantes, uma vez que as técnicas que serão empregadas já são bem estabelecidas na literatura científica e serão realizadas sob a supervisão de pesquisadores experientes na área. Pode-se considerar um risco que alguns questionamentos propostos para avaliação dos voluntários possam deixá-los constrangidos ou desconfortáveis, porém todas as informações obtidas mediante a coleta serão mantidas em sigilo, respeitando assim a privacidade dos indivíduos. Além disso, os voluntários podem relatar alguns efeitos adversos comuns durante ou após a aplicação das estimulações não invasivas, tais como: formigamento, coceira, dor de cabeça, sonolência, entre outros; no entanto, esses sintomas não são persistentes.

Benefícios: através da sua participação na pesquisa, você estará contribuindo para o conhecimento de parâmetros que poderão orientar os profissionais de saúde quanto à melhor conduta de tratamento em relação às estimulações cerebrais não invasivas na reabilitação de indivíduos com distúrbios no cerebelo. Além disso, os resultados do estudo poderão servir de base para a consolidação das técnicas e nortear novas abordagens fisioterapêuticas no âmbito clínico e fortalecer a prática da saúde baseada em evidência.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas, questionários e avaliações) ficarão armazenados em pastas de arquivo e computadores do Laboratório de Neurociência Aplicada (LANA), sob a responsabilidade das pesquisadoras Kátia Monte-Silva, Marina de Almeida Mello e Lorena Figueiredo de Melo, no endereço acima informado, pelo período mínimo de cinco anos.

O(a) senhor(a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UFPE no endereço: **Avenida da Engenharia s/n – 1 andar , sala 4 – Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.**

Assinatura do pesquisador

Eu,

CPF _____, Idade _____, declaro que fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa **“Efeitos das estimulações cerebrais não invasivas cerebelares sobre o aprendizado motor e a atividade elétrica cortical de indivíduos saudáveis”**, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido

que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Estou ciente que os resultados deste estudo poderão ser aproveitados para fins de ensino e pesquisa, desde que minha identidade não seja revelada. Enfim, tendo sido orientado quanto à natureza e o objetivo do estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Local e data: _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar (2 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Assinatura: _____

APÊNDICE IV – TRIAGEM CLÍNICA (estudo 1 e 2)

IDENTIFICAÇÃO Nº: _____

DATA: ____ / ____ / ____

VOLUNTÁRIO ☐ incluído ☐ excluído

AVALIADOR: _____

Nome: _____

Data de Nasc.: ____ / ____ / ____ Idade: ____ Sexo: ____ Est. Civil: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Naturalidade: _____

Nacionalidade: _____ Escolaridade: _____ Profissão: _____

Médicos: _____

Contato: _____

Tabagista: _____ Consumo de café: _____ Consumo de bebida alcoólica: _____

**Mulheres: uso de anticoncepcional (qual e há quanto tempo): _____*

DUM (adicionar fase do ciclo): _____

1. INVENTÁRIO DE SEGURANÇA NA APLICAÇÃO DA EMT NO ADULTO

		SIM	NÃO
1.	Você já teve alguma reação adversa ao TMS?		
2.	Você já teve uma convulsão?		
3.	Você já fez um exame de eletroencefalograma (EEG)?		
4.	Você já teve um derrame (AVC)?		
5.	Você já teve traumatismo craniano (TCE) incluindo neurocirurgia?		
6.	Você possui algum implante metálico na sua cabeça (fora da boca) tais como estilhaços de acidente por arma de fogo, clipes ou fragmentos originados de artroplastia (tratamento ortopédico)?		
7.	Você tem algum dispositivo implantado como marca-passo cardíaco, bombas médicas ou fios intracardíacos?		
8.	Você sofre de dor de cabeça frequente ou severa?		
9.	Você já teve alguma doença relacionada ao cérebro?		
10.	Você já teve alguma outra doença que causou uma lesão cerebral?		
11.	Você está tomando alguma medicação?		
12.	Se você é uma mulher em idade fértil, e se é sexualmente ativa, você está usando algum método contraceptivo confiável?		
13.	Alguns de seus familiares tem epilepsia?		
14.	Você precisa de explicação adicional sobre a EMT e sobre os riscos relacionados a seu uso?		

Adaptado de (111)

2. INVENTÁRIO DE DOMINÂNCIA LATERAL DE EDINBURGH (105)

Por favor, indique sua preferência no uso das mãos nas seguintes atividades pela colocação do sinal + na coluna apropriada. Onde a preferência é tão forte que você nunca usaria a outra mão a menos que fosse forçado a usá-la, coloque ++. Se em algum caso a mão utilizada é realmente indiferente coloque + em ambas as colunas. Algumas das atividades requerem ambas as mãos. Nestes casos a parte da tarefa, ou objeto, para qual preferência manual é desejada é indicada entre parênteses.

Por favor, tente responder a todas as questões, e somente deixe em branco se não tiver qualquer experiência com o objeto ou tarefa.

TAREFA	ESQUERDA	DIREITA
Escrever		
Desenhar		
Arremessar		
Uso de tesouras		
Escovar os dentes		
Uso de faca (sem garfo)		
Uso de colher		
Uso de vassoura (mão superior)		
Ascender um fósforo (mão do fósforo)		
Abrir uma caixa (mão da tampa)		

3. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Critérios de exclusão	Sim	Não
Gestação	☐	☐
Implante metálico intracraniano	☐	☐
Marcapasso cardíaco	☐	☐
Epilepsia/crise convulsiva	☐	☐

Critérios de inclusão	Sim	Não
Destro (Edinburgh)	☐	☐
Idade entre 18 e 40 anos	☐	☐
Saudável (auto-relato)	☐	☐
Ausência de lesões osteomioarticulares severas no punho e dedos	☐	☐

DECLARAÇÃO

Eu, _____ declaro que todas as informações prestadas acima são verdadeiras, que não omiti nem falei com a verdade em nenhum dado relevante e responsabilizo-me inteiramente por qualquer consequência que advinha de informações inexatas.

Recife, ____ / ____ / ____, _____

APÊNDICE V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (estudo 2)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Modelo para maiores de 18 anos; de acordo com a Resolução 466/12 - CNS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa **“Efeitos das estimulações cerebrais não invasivas cerebelares sobre o aprendizado motor e a atividade elétrica cortical de indivíduos saudáveis”**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora **Kátia Karina do Monte-Silva**. Endereço do pesquisador responsável: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisioterapia, Avenida Professor Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária - Recife/PE-Brasil CEP: 50670-901. Telefone: (81) 2126-8939 / Fax: (81) 2126-8939 / e-mail: monte.silvakk@gmail.com

Também participam desta pesquisa: **Lorena Figueiredo de Melo** – mestranda do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia (contato: 81 9618.5404) e **Marina Almeida de Mello** – mestranda do Programa de Pós-graduação em Neurociência e Comportamento (contato: 81 99181037).

Este termo de consentimento pode conter informações que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Objetivo da pesquisa: avaliar e comparar os efeitos das estimulações cerebrais não invasivas cerebelares sobre o aprendizado motor e a atividade elétrica cortical de indivíduos saudáveis.

Procedimentos da Pesquisa: se concordar em participar, você participará de seis sessões que incluirão as seguintes medidas, escalas, questionários e intervenções: *inventário de segurança da estimulação magnética transcraniana no adulto, questionário de presença de indícios do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), questionário de dominância de Edimburgh, Escala de avaliação do nível de ansiedade e fadiga (HAD), avaliação da percepção de fadiga e atenção e perímetro da cabeça*. Esses dados serão coletados antes da primeira sessão. Em cada uma das seis sessões, os participantes serão submetidos, antes e após a estimulação: *a avaliação da percepção dos níveis de fadiga e atenção, medidas da atividade elétrica cortical com a estimulação magnética*. Para cada sessão, será determinado através de um programa de computador se o participante receberá a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) ou a estimulação magnética transcraniana repetitiva (EMTr) e logo em seguida, responderão ao questionário de efeitos adversos. Todos esses procedimentos já foram utilizados anteriormente e oferecem riscos mínimos à saúde dos indivíduos submetidos a eles. A duração das sessões poderá variar de uma a duas horas aproximadamente, porém poderão ser realizados intervalos para repouso, caso você se sinta cansado.

Riscos: O estudo oferece pouco risco à saúde dos participantes, uma vez que as técnicas que serão empregadas já são bem estabelecidas na literatura científica e serão realizadas sob a supervisão de pesquisadores experientes na área. Pode-se considerar um risco que alguns questionamentos propostos para avaliação dos voluntários possam deixá-los constrangidos ou desconfortáveis, porém todas as informações obtidas mediante a coleta serão mantidas em sigilo, respeitando assim a privacidade dos indivíduos. Além disso, os voluntários podem relatar alguns efeitos adversos comuns durante ou após a aplicação das estimulações não invasivas, tais como: formigamento, coceira, dor de cabeça, sonolência, entre outros; no entanto, esses sintomas não são persistentes.

Benefícios: através da sua participação na pesquisa, você estará contribuindo para o conhecimento de parâmetros que poderão orientar os profissionais de saúde quanto à melhor conduta de tratamento em relação às estimulações cerebrais não invasivas na reabilitação de indivíduos com distúrbios no cerebelo. Além disso, os

resultados do estudo poderão servir de base para a consolidação das técnicas e nortear novas abordagens fisioterapêuticas no âmbito clínico e fortalecer a prática da saúde baseada em evidência.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas, questionários e avaliações) ficarão armazenados em pastas de arquivo e computadores do Laboratório de Neurociência Aplicada (LANA), sob a responsabilidade das pesquisadoras Kátia Monte-Silva, Marina de Almeida Mello e Lorena Figueiredo de Melo, no endereço acima informado, pelo período mínimo de cinco anos.

O(a) senhor(a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UFPE no endereço: **Avenida da Engenharia s/n – 1 andar , sala 4 – Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.**

Assinatura do pesquisador

Eu,

CPF _____, Idade _____, declaro que fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa **“Efeitos das estimulações cerebrais não invasivas**

cerebelares sobre o aprendizado motor e a atividade elétrica cortical de indivíduos saudáveis”, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Estou ciente que os resultados deste estudo poderão ser aproveitados para fins de ensino e pesquisa, desde que minha identidade não seja revelada. Enfim, tendo sido orientado quanto à natureza e o objetivo do estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Local e data: _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar (2 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Nome: _____

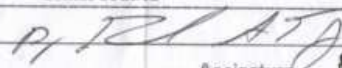
Assinatura: _____

Assinatura: _____

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (estudo 1)

PROT. Nº 253 / 10
CEP / CCS
FL.

 **MINISTÉRIO DA SAÚDE**
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -
CONEP

PROJETO RECEBIDO NO		CAAE -
CEP		0255.0.172.000-10
Projeto de Pesquisa		
ESTIMULAÇÃO CEREBRAL NÃO-INVASIVA: UMA PROPOSTA PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH) EM ADULTOS		
Área(s) Temática(s) Especial(s)		Fase
Não se aplica		Não se aplica
Pesquisador Responsável		
CPF	Pesquisador Responsável	Assinatura
03666828493	Kátia Karina do Monte Silva	
Comitê de Ética		
Data de Entrega	Recebimento:	Assinatura
15/07/2010		
		Renata Santos Menela Assistente em Administração Mat. SIAPE 1317987

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

ANEXO II – QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS DA APLICAÇÃO DA ETCC

PACIENTE: _____

SESSÃO: _____

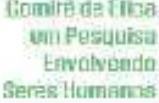
Você experimentou alguns dos sintomas seguintes?	Pontue com valores de 1 a 4 no espaço abaixo: (1 - ausente; 2 - leve; 3 - moderado; 4 - severo)	Se presente, está relacionado à ETCC? (1 – nada; 2 - remoto; 3 – possível; 4 - provável; 5 - definitivo)	Comentários
Dor de cabeça			
Dor no pescoço			
Dor no couro cabeludo			
Prurido			
Formigamento			
Sensação de queimação			
Vermelhidão na pele			
Sonolência			
Dificuldade de concentração			
Mudança repentina de humor			
Outros (especificar)			

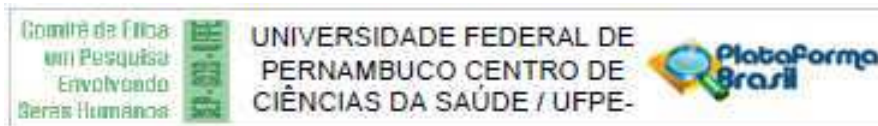
Adaptado de (92).

Você acha que foi submetido à estimulação *sham* (fictícia) ou real? () *sham* () real

Você acha que a ETCC foi aplicada de maneira: () sigilosa () não sigilosa

ANEXO III – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (estudo 2)

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Efeitos das estimulações cerebrais não invasivas cerebelares sobre o aprendizado motor e a atividade elétrica cortical de indivíduos saudáveis		
Pesquisador: Marina Almeida de Melo		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 44049715.7.0000.5208		
Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.075.960		
Data da Relatoria: 21/05/2015		
Apresentação do Projeto: O projeto proposto intitulado "Efeitos das estimulações cerebrais não invasivas cerebelares sobre o aprendizado motor e a atividade elétrica cortical de indivíduos saudáveis" será conduzido por Marina Almeida de Melo (mestranda), Dra Katia Karina Monte Silva (orientadora), e demais membros da equipe, como parte de uma linha de pesquisa já bem estabelecida pelo grupo, com várias contribuições prévias importantes, amplamente divulgadas e citadas na literatura técnica internacional. O projeto usa métodos que inclusive já fazem parte do arsenal terapêutico em serviços de reabilitação neurológica e psiquiátricos. Mesmo assim, ainda há pouco conhecimento sobre a relação de causa e efeito, ligando o uso da técnica em si aos reais impactos neuro-fisiológicos.		
Objetivo da Pesquisa: O estudo pretende investigar os potenciais impactos da estimulação transcraniana em parâmetros clínicos e neuro-eletrofisiológicos, relacionados ao aprendizado motor. A hipótese principal se concentra na estimulação direcionada ao cerebelo, estrutura essa já amplamente investigada em relação a memória implícita da execução motora. O aspecto inovador se relaciona com a simultânea investigação da atividade elétrica cortical.		
Endereço: Av. de Engenharia nº - 1ª andar, sala 4, Prédio do CCS Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600 UF: PE Município: RECIFE Telefone: (81)2128-8588 E-mail: cepcos@ufpe.br		



Continuação do Parecer: 1.075.960

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram adequadamente expostos no TCLE, detalhando inclusive a possível e eventual reparação em caso de dano não previsto durante o procedimento, deixando claro de antemão que o risco, apesar de pequeno, existe sempre, mostrando assim uma atitude responsável por parte da equipe de trabalho.

Há um claro benefício para o aumento do conhecimento básico, na área do estudo, com potencial benefício a longo prazo no fomento à implantação de serviços especializados neste procedimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apesar do projeto proposto não ter finalidade terapêutica, é extremamente importante que esse tipo de abordagem possa ser melhor investigada para uma adequada avaliação dos riscos e benefícios, a curto, médio e longo prazo. Há um potencial intrínseco de que este tipo de metodologia venha a beneficiar condições clínicas que não respondem bem às tradicionais intervenções medicamentosas ou mesmo cirúrgicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A documentação apresentado atende plenamente às demandas exigidas.

Recomendações:

Não tenho recomendações a serem feitas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho está bem elaborado e atende as exigências submetidas a essa comissão.

Parecer favorável, sem lista de pendências ou exigências a serem pedidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2125-4588 E-mail: cepcca@ufpe.br