

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

JULIANA CARDOSO DE SOUZA CUSTÓDIO

**ESTIMULAÇÃO EPIDURAL DE CORRENTE CONTÍNUA DE
BAIXA INTENSIDADE SOBRE O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
MEDIAL ESQUERDO: NOVO MÉTODO DE MODULAÇÃO DA
MEMÓRIA OPERACIONAL EM RATOS**

VITÓRIA

2012

JULIANA CARDOSO DE SOUZA CUSTÓDIO

**ESTIMULAÇÃO EPIDURAL DE CORRENTE CONTÍNUA DE
BAIXA INTENSIDADE SOBRE O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
MEDIAL ESQUERDO: NOVO MÉTODO DE MODULAÇÃO DA
MEMÓRIA OPERACIONAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ester Miyuki Nakamura-Palacios.

**VITÓRIA
2012**

Custódio, Juliana Cardoso de Souza

Estimulação Epidural de Corrente Contínua de baixa intensidade sobre o Córtex pré-frontal medial esquerdo: novo método de modulação da Memória operacional em ratos

Juliana Cardoso de Souza Custódio – Vitória, 2012. 122 p.

Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ester Miyuki Nakamura-Palacios.

1. Córtex Pré-Frontal Medial. 2. Estimulação cerebral. 3. Memória Operacional. 4. Labirinto Radial. 5. Estimulação Epidural por Corrente Contínua.

Juliana Cardoso de Souza Custódio

**ESTIMULAÇÃO EPIDURAL DE CORRENTE CONTÍNUA DE
BAIXA INTENSIDADE SOBRE O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
MEDIAL ESQUERDO: NOVO MÉTODO DE MODULAÇÃO DA
MEMÓRIA OPERACIONAL EM RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em ___ de _____ de _____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ester Miyuki Nakamura-Palacios, UFES, E.S

Prof^a. Dr^a. Ângela Cristina do Valle, USP, S.P

Prof. Dr. Nyam Florêncio da Silva, UFES, E.S

**Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon
Coordenadora do PPGCF, UFES**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, 15 de Fevereiro de 2012.

Aos meus pais e avós, por me apoiarem
ao longo de toda minha caminhada.
Ao meu esposo Ricardo, pela compreensão,
amor e companherismo.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamaís voltará a seu tamanho original”*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até aqui.

À Profª Ester, orientadora desta dissertação, exemplo de pessoa e de profissional que consegue conduzir com excelência a múltipla jornada de mãe, esposa, professora, e pesquisadora. Por todo empenho, sabedoria, compreensão e exigência. Gostaria de ratificar a sua enorme competência, participação com discussões, correções, sugestões e idéias que fizeram com que concluíssemos este trabalho. Obrigada por acreditar em mim, pela confiança em mim depositada na condução deste projeto, pelo enorme aprendizado profissional e pessoal e pela oportunidade de continuar seguindo o caminho da ciência.

Ao Prof. Dr. Nyam Florêncio da Silva e a Profª. Drª Ângela Cristina do Valle, por aceitarem participar da Banca de Defesa desta Dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

À Profª Livia, não só pela amizade, carinho e auxílio técnico, mas, principalmente, pelo sorriso e bom humor constantes.

Ao Profº Nyam, por sua ajuda, disponibilidade e interesse na montagem e avaliação das lâminas e por permitir a utilização de seu laboratório sempre que solicitado.

Ao grupo eDCS pelo empenho e perseverança na condução deste projeto.

À aluna de Iniciação Científica, Cleciane Martins, pela amizade e parceria, pela sua seriedade, responsabilidade e disponibilidade na realização deste trabalho.

Ao Jozué, pelo convívio sempre agradável, pela boa vontade em ajudar sempre que solicitado e por suas soluções criativas.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivência.

Aos professores da pós-graduação do Departamento de Ciências Fisiológicas, agradeço pelos cursos ministrados.

Aos meus pais, avós, irmão e demais familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

Ao meu esposo Ricardo, por seu amor, pela sua compreensão nos meus momentos de ausência, pela sua força nos meus momentos de tristeza, pelo seu companherismo nos muitos fins de semana e feriados passados no laboratório, por entender e apoiar meus objetivos profissionais, por ser meu suporte, meu descanso, meu companheiro de caminhada.

À todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação, meu agradecimento.

RESUMO

O córtex pré-frontal (CPF) é a região mais complexa e altamente desenvolvida das regiões neocorticais do cérebro humano, sendo considerado o córtex de associação do lobo frontal. O CPF pode ser considerado como um “substrato cortical chave dos processos mentais de níveis superiores”, gerenciando todos os processos necessários para objetivos de curto ou longo prazo, por regular o comportamento imediato e planejar o comportamento futuro exercendo um controle sobre quais informações são relevantes e precisam ser utilizadas e excluindo informações não relevantes para um determinado objetivo, ou seja, gerenciando o processamento da memória operacional. Estudos vêm sendo realizados no intuito de modular a excitabilidade do CPF através da utilização de técnicas de estimulação elétrica de baixa intensidade com o objetivo de tratar diversas patologias e melhorar determinadas funções cognitivas. Técnicas de neuroimagem e mapeamento cerebral vêm revelando dados positivos e mostrando que a estimulação é capaz de modular a função cortical do cérebro humano induzindo mudanças prolongadas, mas reversíveis, da excitabilidade cortical. O objetivo deste estudo foi desenvolver um novo método de estimulação cerebral por corrente contínua de baixa intensidade que ofereça uma maior focalidade de estimulação e uma menor perda de corrente através de um protocolo de estimulação epidural. Ratos wistar machos ($n=23$; 250 - 300 g) previamente treinados no labirinto radial de 8 braços, com eletrodos implantados sobre o CPFm, foram submetidos a estimulação epidural por corrente contínua (eDCS) de 400 μ A aplicadas por 11 minutos antes das sessões de testes de retardo no labirinto radial de 8 braços. Os animais desempenharam tarefas com retardo de 1 h, 4 h ou 10 h (memória operacional de curso prolongado). Os animais submetidos a eDCS apresentaram significativamente um menor número de erros quando comparados aos animais *sham* após os intervalos de retardo de 1 hora (eDCS $1,22 \pm 0,22$ vs *Sham* $2,78 \pm 0,49$, $n = 18$, $p = 0,01$), 4 horas (eDCS $0,89 \pm 0,26$ vs *Sham* $3,56 \pm 0,29$, $n = 18$, $p < 0,0001$) e 10 horas (eDCS $2,00 \pm 0,26$ vs *Sham* $3,71 \pm 0,15$, $n = 16$, $p < 0,0001$). Esses resultados demonstram que a eDCS aplicada sobre o CPFm esquerdo melhorou significativamente o desempenho de tarefas com retardos bastante prolongados no labirinto radial de 8 braços, e sugerem que a estimulação por corrente contínua epidural sobre o CPFm facilita o processamento da memória operacional espacial de longa duração.

ABSTRACT

The prefrontal cortex (PFC) is the most complex and highly developed region of the neocortical regions of the human brain and is considered the cortex of association of the frontal lobe. It can be considered as a “key cortical substrate of the highest-level mental processes”, managing all the necessary processes for short- or long-term goals and to regulate immediate behavior and to plan behavior in the future by exerting a “top-down” control over which information is relevant and has to be utilized while excluding non-relevant information for the a specific task at hand. Therefore, it is implicated in working memory processing. Many studies have been carried out in order to modulate the CPF excitability using techniques of low-intensity direct current stimulation in order to treat several diseases and to improve cognitive functions. Neuroimaging techniques and brain mapping have revealed positive data and have shown that direct current stimulation can modulate the human brain functions inducing persisting, but reversible, changes in cortical excitability. The objective of this study was to develop a new method of brain stimulation by direct current stimulation that offers a focal stimulation and less loss of current using an epidural stimulation protocol. Male Wistar rats ($n = 23$, 250 - 300 g) well trained in the radial maze procedure and with electrode implanted over the medial PFC (mPFC) (B: 2.5 mm A, +/- 1 mm L), received epidural direct current stimulation (eDCS) (400 μ A) applied for 11 minutes before the delayed tasks sessions in the 8-arms radial maze. The animals performed delayed tasks of 1, 4 and 10 h (long-term memory). Animals receiving eDCS showed statistically significant decrease in the number of errors compared to *sham* animals in the post-delays performances after 1 hour (eDCS 1.22 ± 0.22 vs *Sham* 2.78 ± 0.49 , $n = 18$, $p = 0.01$), 4 hours (eDCS 0.89 ± 0.26 vs *Sham* 3.56 ± 0.29 , $n = 18$, $p < 0.0001$) and 10 hours (eDCS 2.00 ± 0.26 vs *Sham* 3.71 ± 0.15 , $n = 16$, $p < 0.0001$). These results showed that eDCS applied over left mPFC improved the performance of long-termed delayed tasks in the 8-arm radial maze, and suggests that eDCS over mPFC facilitates the long term spatial working memory processing.

LISTA DE ABREVIATURAS

CPF	Córtex pré-frontal
CPFm	Córtex pré-frontal medial
NMDT	Núcleo médio-dorsal do tálamo
CPFDL	Córtex pré-frontal dorsolateral
tDCS	Estimulação transcraniana por corrente contínua
LTP	Potenciação de longa duração
LTD	Depressão de longa duração
NMDA	N-metil-D-aspartato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
eDCS	Estimulação epidural por corrente contínua
LR-8	Labirinto radial de 8 braços
e.p.m	Erro padrão da média
AMPA	Ácido α -hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
IP3	Inositol trifosfato
CaMKII	Cálcio calmodulina quinase II
PKC	Proteína quinase C
PKA	Proteína quinase A
AMPC	Monofosfato de Adenosina cíclico
Ca ⁺²	Cálcio
Na ⁺	Sódio
Mg ²⁺	Magnésio
NO	Óxido Nítrico
AA	Ácido araquidônico
PPSE	Potencias pós-sinápticos excitatórios
GABA	Ácido gama-aminobutírico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O Lobo frontal.....	17
1.1.1.O Córtex pré-frontal.....	23
1.1.1.1 CPF medial	27
1.1.1.2 Funções do CPF.....	29
1.2. A Memória Operacional.....	32
1.3. Estimulação cerebral por correntes elétricas.....	35
1.3.1. A história da estimulação cerebral por correntes elétricas.....	35
1.3.2. Estimulação transcraniana por corrente contínua.....	39
1.3.2.1. O equipamento.....	41
1.3.2.2. Uso clínico da tDCS.....	44
1.3.2.3. Estudos em animais.....	45
1.4. Um novo método: A eDCS.....	45
2. OBJETIVOS.....	47
2.1. Objetivo geral.....	48
2.2. Objetivos específicos.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. Animais.....	50
3.2. Labirinto radial de 8 braços.....	51
3.2.1. Aquisição da tarefa.....	53
3.3. Cirurgia estereotáxica.....	58
3.4. Estimulação epidural por corrente contínua de baixa intensidade.....	61
3.5. Histologia.....	63
3.6. Análise de resultados.....	64
4. RESULTADOS.....	66
4.1. Aquisição da tarefa no labirinto radial de 8 braços.....	67
4.2. Efeitos da estimulação epidural de corrente contínua de baixa intensidade sobre o CPFm esquerdo sobre a Memória Operacional de Ratos.....	68
4.2.1. Retardos de 1 hora.....	68
4.2.2. Retardos de 4 horas.....	70
4.2.3. Retardos de 10 horas.....	71
4.2.4. Desempenho Intra-grupos.....	73
4.2.4.1. Grupo <i>Sham</i>	73
4.2.4.2. Grupo eDCS.....	74
4.3. Histologia.....	75
5. DISCUSSÃO.....	78

5.1.	Desenho experimental: Intensidade da corrente.....	79
5.2.	Labirinto radial de 8 braços.....	80
5.3.	Sítio neuroanatômico de implantação dos eletrodos.....	82
5.4.	A estimulação cerebral e os processos de aprendizagem e memória.....	84
5.4.1.	LTP.....	87
5.4.2.	A LTP e a plasticidade sináptica no Neocórtex.....	91
5.5.	Segurança da estimulação cerebral por corrente contínua.....	95
5.6.	eDCS – O modelo desenvolvido.....	97
6.	CONCLUSÃO.....	102
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 O lobo frontal

Anatomicamente, o lobo frontal (Fig. 1) compreende a porção anterior do hemisfério cerebral; estende-se do pólo frontal ao sulco central e é limitado inferiormente pelo sulco lateral ou fissura de Sylvius (Erhart, 1972; Adams et al., 1997).

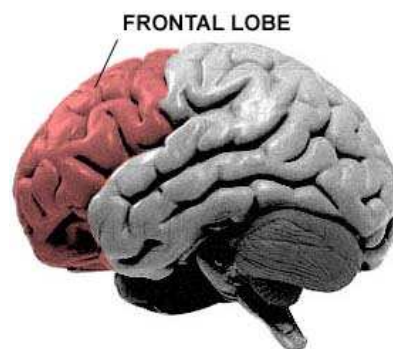


Figura 1: Representação do lobo frontal, vista lateral (Extraído de: McMinn, 1990).

Ontogeneticamente os lobos frontais são as últimas estruturas do hemisfério cerebral a se formarem, sendo pouco desenvolvida em animais inferiores e consideravelmente grande em primatas (Luria, 1981; Kolb, 1984; Adams et al., 1997).

A associação entre as funções intelectuais superiores e o lobo frontal tem sido descrita há mais de 2.000 anos, tanto na Grécia quanto em Roma. No século XIV, um italiano, Guido Lanfranchi, foi o primeiro a descrever uma seqüela clínica após lesão no lobo frontal, e no início do século XVIII Swedenborg menciona que os lobos frontais estão intimamente relacionados as funções cognitivas superiores (Duffy e Campbell, 1994).

No homem, os lobos frontais ocupam cerca de um quarto da massa total da superfície do córtex cerebral, e alcançam praticamente o volume do indivíduo adulto aproximadamente aos sete anos de idade (Luria, 1981). Enquanto no homem o número de circunvoluções e fissuras é bastante grande, em animais

inferiores isso não ocorre, sendo essas áreas constituídas por uma camada fina e lisa (Reading, 1991; Machado, 2000).

No homem e em primatas não-humanos o lobo frontal pode ser dividido segundo diferentes critérios, uma vez que cada área cortical dessa região recebe projeções de núcleos talâmicos específicos, além de se diferenciarem em sua citoarquitetura, filogenia, ontogenia, e também em suas funções cognitivas (Jodar-Vicente, 2004).

Em relação a sua citoarquitetura, os lobos frontais podem ser divididos em **córtex motor e pré-motor**, com localização mais posterior e responsável pela função motora (movimento) e em **córtex pré-frontal (CPF)**, situado mais rostralmente, anterior ao sulco pré-central, que ao ser estimulado eletricamente, não produz movimento ou sensações sensoriais (Kolb, 1984; Adams et al., 1997). Essas duas regiões são formadas por isocórtex (camadas corticais bem definidas), sendo que a região do CPF apresenta uma camada IV granular, o que não é evidenciado na região mais posterior dos lobos frontais (Kolb, 1984; Stuss e Benson 1984).

Seguindo um gradiente ontogenético do córtex sensorial primário para áreas de associação multimodais, as áreas posteriores do córtex são responsáveis pela percepção das informações do meio e as áreas frontais pelas funções executivas do comportamento. O nível mais inferior dessa hierarquia seria o córtex motor primário que executa o movimento planejado em áreas associativas através de grupos musculares envolvidos em determinada ação. O nível mais elevado seria o CPF, integrando as mais elaboradas informações da percepção e da execução do comportamento (Fuster, 2000^a; Fuster, 2001).

Uma outra forma de se dividir as regiões do lobo frontal é de acordo com o mapa citoarquitetonico de Brodmann (1909).

Segundo esta classificação, a área 4 do mapa, o giro pré-central, é a área motora primária. A área 6 e a parte posterior da área 8 compõem a área pré-motora. As áreas 44 e 45, conhecidas como “área da Broca” são consideradas parte da área pré-motora (Jouandet & Gazzaniga, 1979). Lesões na região da “área da broca” podem causar *afasia motora*, isto é, perda da habilidade para

efetuar os movimentos coordenados necessários a fala (Erhart, 1972). A parte anterior da área 8 representa os campos visuais frontais e está envolvida nos reflexos visuais como dilatação e constrição da pupila.

As demais áreas do lobo frontal formam o córtex pré-frontal (Stuss e Benson,1984) (Fig. 2).

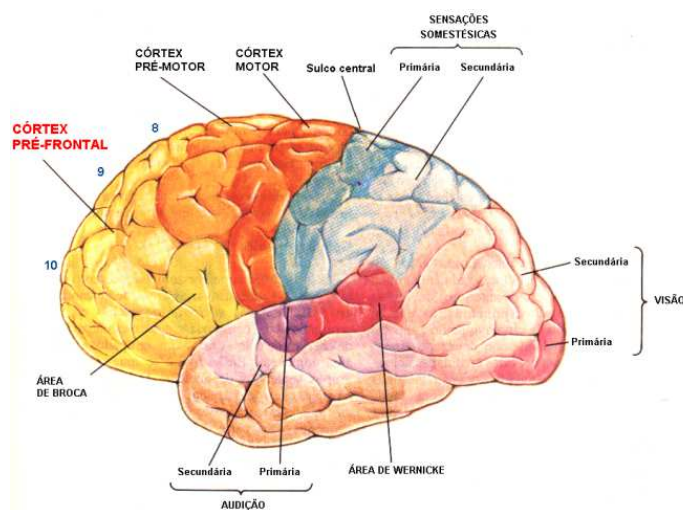


Figura 2: Cérebro humano em uma visão lateral. Nota-se o lobo frontal funcionalmente dividido em: córtex motor, córtex pré-motor, córtex pré-frontal (CPF) e área de Broca (Extraído de: Guyton AC. Neurociência Básica: Anatomia e Fisiologia, 2ªEd. Guanabara Koogan ©, 1993).

Adicionalmente alguns autores defendem a divisão do lobo frontal em função das suas conexões com as regiões talâmicas.

Seguindo este critério, existem cinco circuitos frontais-subcorticais definidos. Eles são denominados de acordo com sua função ou local de origem no córtex (Cummings, 1993).

Os cinco circuitos apresentam algumas similaridades, como por exemplo, o fato de que todos originam-se no córtex frontal, se projetam para o estriado (caudado, putamen, ou estriado ventral), se conectam com o globo pálido e substância negra e então com o tálamo. Por fim, cada circuito se projeta de

volta para o córtex frontal formando uma alça fechada (Fig. 3). Existem também projeções tanto partindo quanto se projetando para outras estruturas corticais e subcorticais relacionadas a cada circuito em particular (Cummings, 1993).

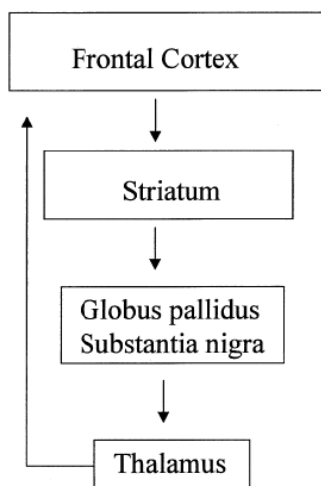


Figura 3: Estrutura geral dos circuitos frontais sub-corticiais (Extraído de: Tekin e Cummings, 2002).

O circuito motor origina-se de neurônios da área motora suplementar, córtex pré-motor e córtex somatosensorial, e o circuito oculomotor nos campos visuais frontais e estão envolvidos em funções motoras (Cummings, 1993).

Existem ainda, três circuitos frontais subcorticiais que se originam no córtex pré-frontal e estão envolvidos nos processos cognitivos, emocionais e motivacionais: Circuito dorsolateral, Circuito do cíngulo anterior (ou ventromedial), e Circuito orbitofrontal (Cummings, 1993; Duke e Kaszniak, 2000; Sbordone, 2000; Stuss e Benson, 1984; Alvarez e Emory 2006).

a) Circuito frontal dorsolateral

Origina-se nas áreas 9 e 10 de Brodmann da superfície lateral do lobo frontal anterior e se projeta para a cabeça dorsolateral do núcleo caudado. Neurônios desse sítio se projetam para a parte lateral do globo pálido médiodorsal e para a substância negra *pars reticulata* rostro-lateral e interna como uma via direta. As fibras dos gânglios da base se projetam para as porções parvocelulares do médiodorsal do tálamo e tálamo ventral anterior. O médiodorsal do tálamo envia fibras de volta à origem do circuito no córtex frontal dorsolateral (Tekin e Cummings, 2002).

Este circuito tem sido associado a funções executivas, incluindo fluência verbal e atividade não verbal, manutenção da atenção, planejamento, inibição de resposta, memória operacional, capacidade de organização, raciocínio, resolução de problemas e raciocínio abstrato (Cummings, 1993; Duke e Kaszniak, 2000; Grafman e Litvan, 1999; Jonides et. al., 1993; Malloy e Richardson, 2001; Stuss et. al., 2000; Alvarez e Emory, 2006).

Disfunções desse circuito produzem sintomas semelhantes aos descritos após lesão direta do córtex pré-frontal: síndrome disexecutiva, caracterizada por alterações na capacidade de manter a flexibilidade mental e mudança de critérios no planejamento e geração de estratégias, dificuldades na organização de ações, prejuízos nas memórias de longo prazo e produção de atividade espontânea (verbal ou não-verbal) (Jódar-Vicente, 2004).

b) Circuito do Cingulado anterior (ou ventromedial)

Origina-se no cingulado anterior ou CPFm (área 24 de Brodmann) e se projeta para o *striatum* ventral, que inclui o caudado ventromedial, putâmen ventral, núcleo accumbens e tubérculo olfatório. Essa área também é conhecida por *striatum* límbico. Projeções desta área passam para o globo pálido rostromedial, pálido ventral e substância negra rostradorsal. O pálido ventral

então se conecta ao núcleo anterior ventral do tálamo. Este circuito se fecha com as projeções do tálamo anterior ventral de volta para o córtex cingulado anterior (Rodrigues, 2006).

Além dessas alças frontais-subcorticais fechadas, há conexões de circuitos que integram informações de áreas cerebrais anatomicamente distantes, mas funcionalmente relacionadas. Por exemplo, o circuito do cingulado anterior recebe aferências da área perirrinal e hipocampo e envia eferências para a substância negra, hipotálamo lateral e núcleos subtalâmicos. Também importantes são as aferências da área tegmentar ventral do mesencéfalo (Tekin e Cummings, 2002).

Este circuito estaria envolvido com a motivação. Lesões nesta região muitas vezes produzem apatia, diminuição da interação social, e retardo psicomotor (Sbordone, 2000; Alvarez e Emory, 2006).

A síndrome cingulado anterior é tipicamente caracterizada por um mutismo acinético. Pacientes com lesões bilaterais são profundamente apáticos: "eles normalmente têm os olhos abertos, não falam espontaneamente, e respondem a perguntas com monossílabos; se movem pouco, são incontinentes, e comem e bebem somente se alimentados ; não exibem nenhuma emoção, nem mesmo dor e são indiferentes a sua circunstância" (Cummings 1993).

c) Circuito orbitofrontal

Origina-se nas áreas 10 e 11 de Brodmann e envia fibras para o núcleo caudado ventromedial. Neurônios que formam essa região do caudado se projetam para a parte medial do globo pálido médiodorsal e para a substância negra *pars reticulata* ventromedial e interna. Fibras da substância negra e do globo pálido se conectam ao tálamo médiodorsal e ventral anterior. O circuito então é fechado por fibras que se projetam de volta via tálamo para o córtex orbitofrontal.

Este circuito está relacionado a mecanismos inibitórios - comportamento social apropriado - (Blumer e Benson, 1975; Cummings, 1995), bem como o controle da interferência de estímulos irrelevantes para determinado fim. Disfunções nesse sistema produzem alterações severas na inibição e na capacidade de controlar impulsos. Um exemplo seria o de pacientes portadores da doença de Huntington, uma doença em que há um sério envolvimento do núcleo caudado (Jódar-Vicente, 2004).

1.1.1 O córtex pré-frontal

O córtex pré-frontal é a região mais complexa e altamente desenvolvida das regiões neocorticais do cérebro humano (García-Moreno, 2008), sendo considerado o córtex de associação do lobo frontal (Fuster, 2000^b).

No cérebro de mamíferos, esta região é usualmente definida por dois critérios básicos: citoarquitetura e conectividade. Ambos os critérios são utilizados para delimitar aproximadamente o mesmo território cortical, que é caracterizado por uma proeminente camada celular IV, ou camada granular, e maciças projeções provindas do núcleo médiodorsal do tálamo (Fuster, 2002), embora já tenha sido descrito que as áreas pré-frontais que recebem as conexões do núcleo médiodorsal do tálamo (NMDT) também se conectam com outros núcleos talâmicos (Uylings, Groenewegen e Kolb 2003).

Em primatas humanos e não-humanos, o CPF está localizado rostralmente às áreas motoras do córtex cerebral, sendo dividido em três regiões anatomicamente definidas (lateral, medial e ventral ou orbital), as quais foram subdivididas por Brodmann em áreas que variam de acordo com sua citoarquitetura (Fig.4) (Fuster, 2002).

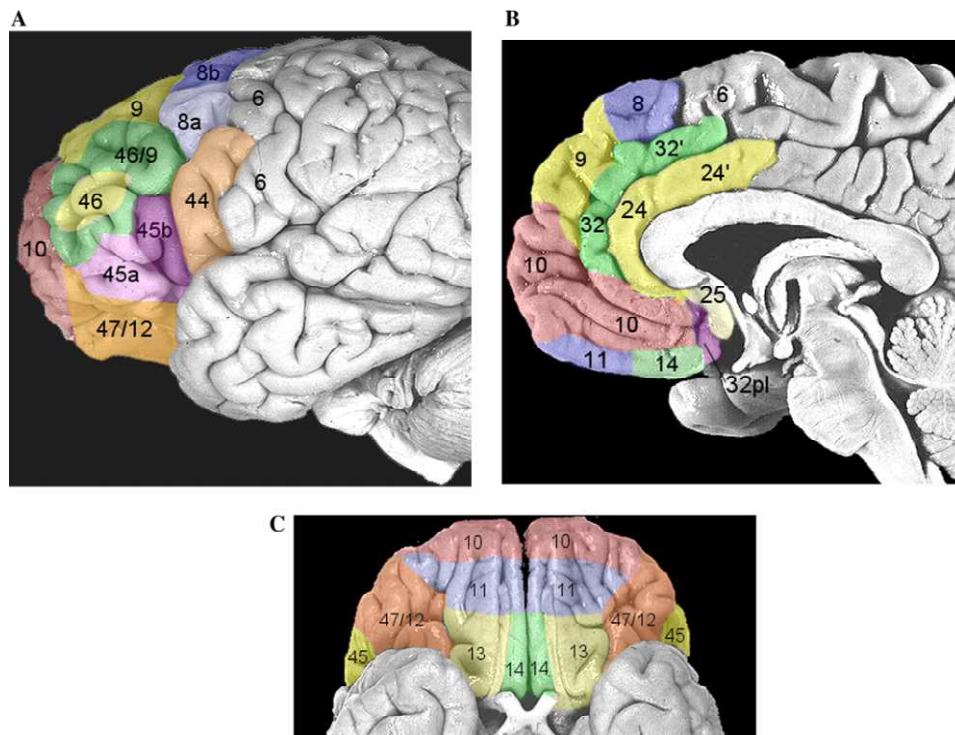


Figura 4: Divisões do CPF ([ateral(A), medial(B) e orbital(C)) numeradas segundo o mapa arquitetônico de Brodmann (1909). Brodmann subdivide ainda o CPF em área oculomotora (área 8 de Brodmann); área dorsolateral (áreas 9 e 10 de Brodmann); área orbitofrontal lateral (área 10 de Brodmann) e cíngulo anterior ou córtex pré-frontal medial (CPFm) (área 24 de Brodmann) (Extraído de: Carter et.al, 2006).

Filogeneticamente é um dos últimos córtices a se desenvolver tendo atingido um crescimento relativo máximo no cérebro humano (Brodmann, 1912; Jerison, 1994), onde constitui quase um terço do neocórtex (Fuster, 2002).

De acordo com Brodmann, o CPF constitui 3,5% do córtex do gato, 12,5% do córtex do cachorro, 11,5% em macacos, 17% em chimpanzés, levando a uma inferência legítima de que a expansão evolucionária do córtex de associação, tanto posterior quanto pré-frontal, está intimamente relacionado a evolução das funções cognitivas (Fuster, 2002).

Em roedores, o CPF não pode ser definido por suas características citomorfológicas como ocorre em animais superiores. Essa estrutura por muito tempo foi considerada exclusiva das espécies de primatas devido à ausência do córtex granular em espécies não primatas (Uylings, Groenewegen e Kolb 2003). Apesar de nesses animais o córtex poder ser referido até como

agranular, Rose e Woolsey (1948) propuseram que o CPF em roedores corresponde à área que recebe maciça projeção do núcleo médiadorsal do tálamo (NMDT), e este campo de projeção seria equivalente em diversas espécies de mamíferos (Rose e Woolsey, 1948; *apud* Uylings, Groenewegen e Kolb 2003).

Zilles e Wree (1985) definem como constituintes do CPFm em roedores as áreas Cg1 e Cg2 do cíngulo anterior, Cg3 do córtex pré-límbico e Fr2 do córtex frontal motor (Fig.5).

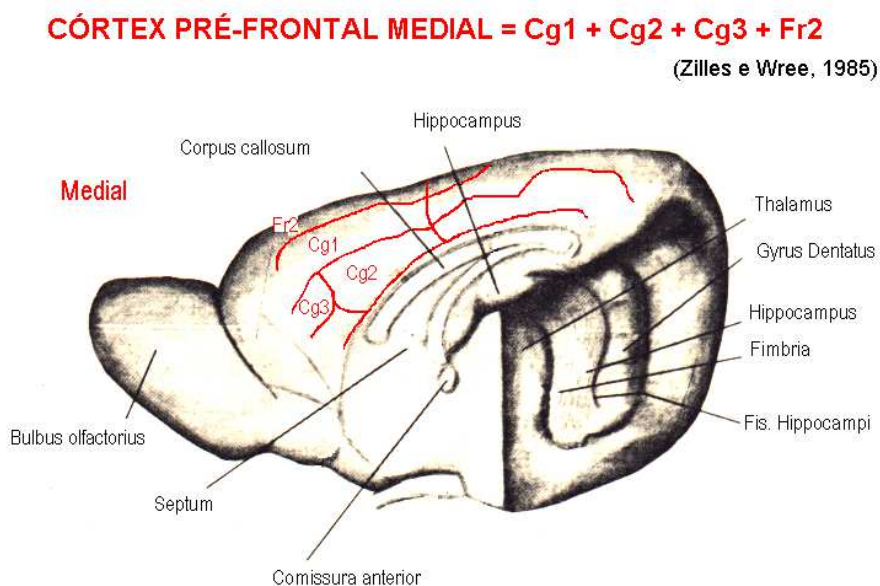


Figura 5: Uma visão medial do cérebro de rato. Observa-se em destaque em vermelho as áreas Cg1, Cg2 e Cg3 do cíngulo anterior e Fr2 do córtex frontal motor, que compõem o córtex pré-frontal medial em roedores (Modificado de Zilles e Wree, 1985).

Porém, com o advento de refinadas técnicas de tracejamento anterógrado e retrógrado, tem-se descoberto que as áreas pré-frontais que recebem as conexões do MD também se conectam com outros núcleos talâmicos (Uylings, Groenewegen e Kolb 2003). Adicionalmente, a definição de Rose e Woolsey's do CPF baseada apenas em critérios anatômicos, isto é, as áreas de projeções do núcleo dorsolateral do tálamo, não são suficientes para definir o CPF. Um

estudo realizado em 2003 levantou dados relacionados a diferentes critérios estruturais e funcionais, como por exemplo, o padrão de conexões específicas e a densidade dessas conexões, propriedades eletrofisiológicas, desenvolvimento embriológico, presença e distribuição específica de receptores de neurotransmissores e aspectos comportamentais, para traçar uma homologia entre as áreas corticais de roedores e primatas, e os autores concluíram que os ratos possuem um córtex pré-frontal funcionalmente dividido que possui características semelhantes não apenas ao córtex orbital e medial dos primatas como também ao córtex pré-frontal dorsolateral. Além disso, os autores destacam a incorporação da área do cíngulo anterior dorsal (ACd) e a área Fr2 ao CPF, uma vez que essas áreas possuem, entre outras características funcionais, projeções maciças com o núcleo médiodorsal do tálamo, portanto possuindo mais conexões talâmicas características do CPF do que de áreas pré-motoras (Uylings, Groenewegen e Kolb, 2003; Vertes, 2002).

Paxinos e Watson (1986) denominam o cíngulo anterior (ACg) de Cg1 e a área pré-central (PrC) de Fr2.

Portanto, em roedores, o CPF pode ser subdividido em áreas infralímbica (IL), pré-límbica (PrL), cíngulo anterior, ventral e dorsal (ACg ou Cg1, ACd e Cg2); área pré-central (Fr2 ou PrC), área orbital (medial- MO, ventral- VO, ventro-lateral- VLO e lateral- LO); e em área agranular insular ventral e dorsal (AIV e AID) que compõe o córtex gustatório (Fig.6) (Dalley, 2004; Uylings, Groenewegen e Kolb 2003; Vertes 2002).

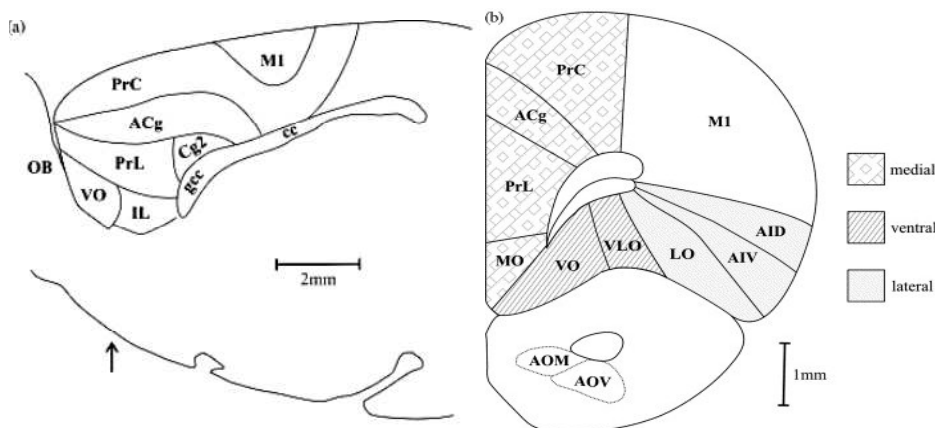


Figura 6: Subregiões do CPF de roedores. a) Secção sagital: 0,9 mm da linha média. b) Secção coronal unilateral: 3,5 mm anterior ao bregma. Os sombreados diferentes indicam as três principais divisões do CPF de roedores (medial, ventral e lateral). Abreviaturas: ACg, córtex cingulado anterior; AID, córtex agranular insular dorsal; AIV, córtex agranular insular ventral; AOM, núcleo olfatório anterior medial; AOV, núcleo olfatório anterior ventral; cc, corpo caloso; Cg2, área 2 do córtex cingulado; gcc, joelho do corpo caloso; IL, córtex infralímbico; LO, córtex orbital lateral; M1, área motora primária; MO, córtex orbital medial; OB, bulbo olfatório; PrL, córtex pré-límbico; PrC, córtex pré-central; VLO, córtex orbital ventrolateral; VO, córtex orbital ventral. (Extraído e traduzido de *Neurosci Biobehav Rev*, 28: 771-784, 2004).

O CPF, tanto em primatas quanto em ratos, também possui amplas conexões com os córtices pré-motor, somatossensorial, auditivo, visual, olfatório, gustatório e límbico, estando envolvido, portanto, em diferentes funções e aspectos do comportamento (Uylings e Van Eden, 1990).

1.1.1.1. CPF medial

O córtex pré-frontal medial (**CPFm**), vem sendo amplamente estudado, pelo fato de ser um componente do circuito de gratificação cerebral, que está envolvido no comportamento de recompensa, incluindo aqueles associados com as drogas de abuso, e também por participar de uma gama de funções cognitivas (Tzschentke, 2000; Dalley, 2004) e de memória, particularmente aquelas que envolvem o procedimento de retardo (Delatour e Gisquet-Verrier,

1999), ou seja, a interposição de um intervalo de tempo (segundos, minutos ou horas) no meio da realização de uma tarefa cognitiva.

A Figura 7, ilustra o CPFm de roedores e demonstra as extensões de algumas subregiões, advindas com a melhora das técnicas anatômicas citadas nas sessões anteriores. São elas: pré-central (PrC ou Fr2), cíngulo anterior dorsal e ventral (ACd e ACv - Cg1 e Cg2, respectivamente), pré-límbica (PrL ou Cg3), infra-límbica (IL) e orbital medial (MO).

Uylings (1990) relata que as características das subregiões Fr2 e parte do cíngulo anterior do CPFm de roedores tornam-se segregadas em primatas nas áreas 6, 8, 9, 10 e 46 (CPF dorsolateral). Kolb *apud* Brown (2002) sugere que a parede medial do córtex cerebral do rato é uma área não-diferenciada que estaria relacionada às funções cognitivas encontradas no córtex pré-frontal dorsolateral de primatas, como a memória operacional, a atenção, o raciocínio, a tomada de decisões, a capacidade de detectar novos estímulos e a organização temporal do comportamento.

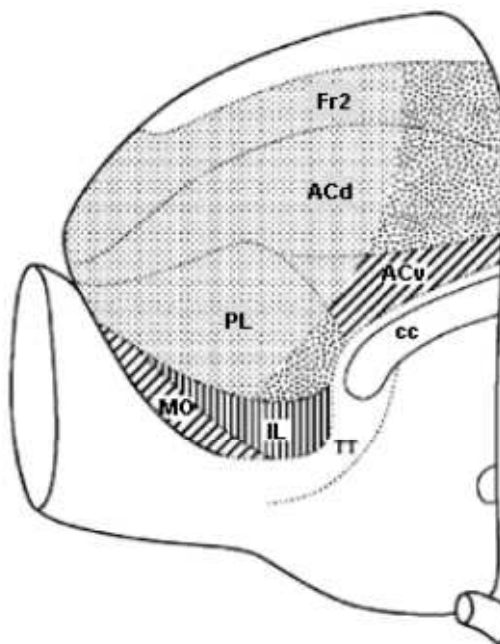


Figura 7: CPFm de roedores. Abreviaturas: ACd, córtex cíngulo anterior dorsal (Cg1); ACv, córtex cíngulo anterior ventral (Cg2); FR2, área frontal 2 (PrC- córtex pré-central); IL, córtex infralímbico; MO,

área orbital medial; PL, córtex pré-límbico (Cg3). (Extraído e adaptado de *Behavioral Brain Research*, 146: 3-7, 2003).

1.1.1.2. Funções do CPF

O CPF é caracterizado como uma área de associação terciária, multimodal, cuja função é primariamente integrativa, não sendo exclusivamente sensorial ou motora (Luria, 1981; Machado, 1998; Fuster, 2001).

A função integrativa e multimodal do CPF está diretamente relacionada com suas conexões aferentes e eferentes. Neste contexto, ele não recebe as aferências sensoriais diretamente da periferia, mas devido as suas conexões com outras regiões corticais e sub-corticais ele recebe informações em relação ao meio externo através de todas as modalidades sensoriais processadas inicialmente por outras vias primárias, além de receber informações sobre o estado emocional do indivíduo e o *status* autonômico relacionado a memórias relevantes de eventos prévios que tenham sido consolidados e armazenados (Barbas, 2000; Powell & Voeller 2004).

O CPF possui três circuitos córtico-subcorticais discutidos em detalhes nas sessões anteriores, o circuito dorsolateral, o circuito orbitofrontal e o circuito do cíngulo anterior, todos eles se originando no CPF e se conectando posteriormente com regiões talâmicas. Por ser uma área de grande variedade e heterogeneidade de conexões, sugere-se que esteja relacionado ao controle do estado geral do córtex cerebral e atividades complexas, como planejamento e controle comportamental e emocional (Luria, 1981). Por possuir tais circuitos, exerce influencia nos estados de alerta, estresse e humor, bem como em funções específicas como a gratificação do comportamento, atenção seletiva e memória (Robbins, 2000).

Em primatas, as áreas pré-frontais medial, lateral e orbitofrontal estão fortemente interconectadas, sugerindo que elas participam do planejamento e controle das funções executivas centrais (Fuster, 2002).

O CPF possui um papel central no controle cognitivo. Esta região recebe projeções de áreas dos lobos occipital, parietal, e temporal, e também, do giro cingulado. Com isso, parece receber informações sobre todas as modalidades sensoriais. Além disso, está envolvido na organização temporal do comportamento, mediando as contingências sensório-motoras através da integração da ação motora com as informações sensoriais recentes (Kolb, 1984; Fuster, 1991).

Luria (1981) propôs para o CPF a função de supervisão e controle das demais atividades cerebrais, levando ao conceito de unidade hierarquicamente superior expressos pela função integradora associada ao CPF. Damásio (1994) em um estudo que integrava as diversas proposições sobre a função do CPF incorporou o componente afetivo, afirmando ser impossível entender a atividade humana sem considerar o sentimento e a razão como seus integrantes essenciais. Também atribuído ao CPF é a função de planejamento motor, relacionado com a preparação e a execução de programas motores.

No livro recém publicado *Working Memory: Capacity, Developments and Improvement Techniques*, Nakamura-Palacios (2011) cita que o CPF é também referido como o “orgão da civilização” uma vez que é seu papel monitorar tanto a informação cortical interna quanto a informação extra-sensorial tornando os seres humanos capazes de ser “conscientes” deles mesmos em relação ao ambiente.

Ainda, dados coletados de estudos utilizando tomografia por emissão de pósitron (PET) ou Ressonância Magnética Funcional (fMRI) enquanto voluntários realizavam testes cognitivos, sugerem que o CPF é organizado de acordo com a modalidade de informação sendo processada. A informação espacial parece estar representada mais dorsalmente do que a informação das características do objeto, a armazenagem verbal em áreas da linguagem no hemisfério esquerdo, a armazenagem espacial no córtex pré-frontal direito (Smith e Jonides, 1999).

As funções do CPF também podem ser compreendidas através das vias neuronais que se originam de suas regiões medial ou lateral, bem como através das conexões dessas áreas com outras regiões do CPF. Nesse

contexto, o CPF ventromedial possui conexões recíprocas com a amígdala, associadas ao processamento emocional, com o hipocampo, associado a memória, e áreas associativas temporais visuais associadas ao processamento sensorial de alta ordem, assim como o CPF dorsolateral (Wood e Grafman, 2003).

Esta área também está envolvida com a motilidade geral e com a atenção. Lesões nessa região geralmente levam a uma perda da espontaneidade e dificuldade em iniciar movimentos e de linguagem (Verfaellie e Heilman, 1987; Cummings, 1993). Pacientes com lesões nesta área, incluindo a área do cíngulo anterior, são geralmente apáticos, desinteressados pelo ambiente, e incapazes de focar sua atenção em testes cognitivos ou comportamentais (Fuster 2001).

O CPF dorsolateral possui conexões recíprocas com regiões do cérebro que estão associadas ao controle motor, tais como gânglios da base, córtex pré-motor, a área motora suplementar, com monitoramento do desempenho, como o córtex cíngulo e com áreas de processamento sensorial de alta ordem como as áreas associativas e o córtex parietal (Wood e Grafman, 2003).

Ainda, o CPF ventromedial e suas conexões realizam funções envolvendo a integração de informações relacionadas a emoção, memória e estímulos ambientais, e o CPF dorsolateral através de suas redes neurais estão envolvidos na regulação do comportamento e no controle das respostas aos estímulos ambientais (Wood e Grafman, 2003).

Em relação ao CPF orbital, desde que Harlow (1848) descreveu o famoso caso de Phineas Gage, sabe-se que lesões dessa região frequentemente induzem mudanças dramáticas da personalidade (Damásio, 1994). Sujeitos com tais lesões são impulsivos e desinibidos em relação aos comportamentos institucionais, irritados, com tendência a um humor grosseiro e a negligenciar princípios morais e éticos. Sua impulsividade geralmente os leva a comportamentos de risco e conflitos com a lei. Adicionalmente pacientes com lesões orbitofrontais quase unanimemente apresentam um severo distúrbio de atenção (Fuster, 2001).

Macacos com dano orbitofrontal apresentam dificuldades semelhantes em relação ao controle de impulsos e distração. O córtex orbitofrontal exerce função de controle inibitório através de suas eferências para o hipotálamo, ganglios da base e outras áreas neocorticais algumas no próprio CPF (Fuster, 2001).

Embora as regiões do CPF pareçam ter funções específicas individuais como mencionado acima, elas funcionam de forma articulada a fim de gerenciar tarefas complexas, e estão provavelmente todas envolvidas em orquestrar múltiplas funções em demandas de alta complexidade, como por exemplo no processamento da memória operacional (Nakamura-Palacios, 2011).

Portanto, o CPF pode ser considerado como um “substrato cortical chave dos processos mentais de níveis superiores” (Wang, 2005), gerenciando todos os processos necessários para objetivos de curto ou longo prazo por regular o comportamento imediato e planejar o comportamento futuro exercendo um controle sobre quais informações são relevantes e precisam ser utilizadas e excluindo informações não relevantes para determinado objetivo. Assim, o CPF está envolvido em uma variedade de processos cognitivos e executivos, incluindo atenção, tomada de decisões, controle da resposta inibitória, integração temporal do comportamento voluntário (Dalley et.al. 2004), todos envolvidos no processamento da memória operacional (Nakamura-Palacios, 2011).

1.2. A Memória operacional

A memória operacional se refere ao armazenamento temporário e manipulação de informações necessárias para a execução de tarefas complexas como compreensão da linguagem, aprendizado e raciocínio. Segundo Goldman-Rakic 1995, o termo é aplicado a um tipo de memória que é ativa e relevante apenas por um período de tempo, e cita um exemplo comum de memória operacional que seria manter em mente um novo número de telefone lido, até que se realize a discagem e então imediatamente esquecê-lo. Uma analogia

possível a esse processo seria a de um bloco de rascunhos mental, e ele se difere claramente da alteração duradoura na circuitaria neuronal devido ao aprendizado. O critério “útil ou relevante apenas transitoriamente” distingue a memória operacional de outros processos.

O termo “memória operacional” foi proposto inicialmente por Miller et al., em 1960. Contudo ao longo do tempo foi modificado e complementado por outros autores. Atkinson e Shiffrin, em 1968 propuseram que ela seria um sistema unitário e de curta duração.

O conceito atual de memória operacional a define como um sistema contendo múltiplos sub-sistemas cognitivos ou um sistema de múltiplos componentes.

Embora diferentes, os modelos de memória operacional parecem convergir na idéia de que múltiplos sub-sistemas trabalham em conjunto para ativar, manter e manipular uma informação relacionada a uma determinada tarefa durante a realização de testes cognitivos. Desta forma, a existência de tais sub-sistemas modificam o conceito de uma armazenagem de curto prazo em direção a uma visão mais dinâmica e sistêmica da memória operacional. Ainda, parece haver um consenso de que a armazenagem da memória de curto prazo é atualmente uma função ou um dos componentes da memória operacional (Yuan et.al.2006, *apud*, Nakamura-Palacios, 2011).

Portanto, a memória operacional tem sido descrita como um sistema multi-componente ou uma coleção de processos cognitivos distintos que provêm manutenção ativa da informação de diferentes modalidades sensoriais em um armazenamento temporário. Isto possibilita a manipulação, o processamento e a recuperação de memórias para serem convertidas em uma ação efetiva e apropriada após intervalos curtos (segundos), ou longos (minutos), em testes laboratoriais (Floresco e Phillips, 2001; Fuster 1997; Funahashi, 2006), e na cognição cotidiana (Badley e Logie, 1999). Assim, a memória operacional processa a informação momento a momento, e mesmo deficiências sutis nesta maquinaria podem significar deficiências substanciais na formação de idéias, raciocínio e planejamento (Goldman-Rakic,1995; Muly e Williams, 2000).

A memória operacional pode ser considerada como um sistema dividido em dois componentes gerais, um armazenamento de curto prazo para a manutenção ativa de um conjunto limitado de informações por um período limitado de tempo (da ordem de segundos), e um conjunto de "processos executivos" que opera sobre o conteúdo do armazenamento. Assim, o comportamento direcionado a um objetivo e essencialmente, as funções executivas frontais, tais como a resolução de problemas, tomada de decisão, planejamento de ações futuras, são altamente relacionadas e dependentes da sua função (Smith e Jonides, 1999).

Em um artigo clássico de 1987, Goldman-Rakic propôs que o CPF era essencial para a memória operacional. De fato, o CPF é o gerenciador dos vários processos envolvidos na memória operacional. Fuster (2002), relatando sobre as funções cognitivas do lobo frontal, evidenciou a associação do CPF com outras regiões cerebrais, de forma a manter um circuito de reverberação durante a execução da memória operacional, um processo crucial para sustentação da informação enquanto durar uma função.

Atualmente estudos de neuroimagem mostram um envolvimento do córtex pré-frontal, particularmente da estrutura dorsolateral (áreas 9 e 46 de Brodmann), durante tarefas de memória operacional (D'Esposito et. al., 1998; Mottaghy et al., 2000; Sauseng et al., 2004).

No âmbito da neurociência comportamental em animais, a memória operacional está associada ao paradigma do labirinto radial. Neste contexto, ela possui uma definição diferente da utilizada pela psicologia cognitiva: memória operacional que capacita o animal a localizar-se no espaço através da lembrança de onde ele esteve anteriormente, denominada memória operacional espacial (Olton, 1979; Gagliardo, Mazzotto e Divac, 1997).

O modelo do labirinto radial foi proposto por Olton e Samuelson em 1976, e pode ser utilizado em diferentes protocolos experimentais em diferentes versões, que estariam avaliando funções cognitivas distintas, incluindo a

memória operacional. Para este fim, o animal estando sob privação alimentar parcial é treinado a alcançar o reforço localizado no fim de cada braço do labirinto. Após algumas sessões de treinamento é introduzido um intervalo de retenção (retardo) entre um número de braços visitados, possibilitando um procedimento que é o utilizado no presente estudo, conhecido por teste com retardo (“delayed task”), ou retardo não pareado à amostra (“delayed non-matching to sample” - DNMS), ou ainda de ganho na mudança de resposta com retardo (“delayed spatial win shift”) (Aujla e Beninger, 2001; Phillips et al., 2004). Neste procedimento o animal deverá evitar, após o retardo, a entrada em braços já visitados, pois se o fizer incorrerá em erro de desempenho e conseqüentemente em prejuízo de memória operacional. Nesse contexto, a memória operacional se refere à capacidade do animal em reter informações numa dada sessão de teste. As informações, entretanto, não são relevantes em sessões seguintes (Olton et.al.,1980).

Além da memória operacional, a memória de referência ou de procedimento também é avaliada no paradigma do labirinto radial. Ela é um tipo de memória de longo prazo que armazena informações independentes de contexto, sendo necessário o registro de regras para a correta execução da tarefa. Seus mecanismos cerebrais são diferentes do processamento da memória operacional, no entanto eles se associam para o desempenho no labirinto radial (Olton et al., 1977).

1.3. Estimulação cerebral por correntes elétricas

1.3.1. A história da estimulação cerebral por correntes elétricas

A utilização de correntes elétricas com o intuito de modificar a atividade cerebral é uma técnica muito antiga.

Embora muitos estudos tenham surgido nas últimas décadas, os primeiros registros de utilização de correntes elétricas na medicina datam de 43 – 48 DC

quando o físico e farmacologista Scribonius Largus observou que posicionando um peixe torpedo acima do escalpo de um paciente com dor de cabeça, a forte corrente elétrica direta oriunda do animal, provocava um torpor repentino, transitório, com alívio da sensação de dor.

As descargas produzidas por esse peixe podem variar em torno de 50 volts (V) e o fato desse peixe ser oriundo do mar e, portanto, apresentar solução salina no meio exterior fazia com que o contato entre o animal e o paciente apresentasse baixa resistência a corrente. Segundo descrições, o número de peixes necessários para produzir um torpor inicial com subsequente alívio da dor variava entre os casos; a variabilidade individual e posterior resposta a um determinado tratamento já podia ser observada (Boggio, 2006).

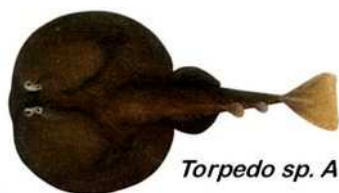


Figura 8- *Torpedo torpedo*, família Torpedinidae.

Achados semelhantes foram reportados pelo físico grego Claudius Galen (131 – 401 DC), tendo ele sugerido que o efeito era devido ao entorpecimento e ação narcótica induzido pelo peixe elétrico.

Os estudos utilizando este animal associado a métodos científicos modernos iniciados por Walsh (1773) iniciaram a ciência da eletrofisiologia, estimulada na Itália pelo trabalho de Galvani (1791) professor da Universidade de Bolonha (Itália) e membro da *Accademia delle Scienze*, que realizou diversos experimentos sobre eletricidade sendo boa parte descritos em seu trabalho publicado em 1791 *De Viribus Electricitatis in Motu Musculari Commentarius* (Piccolino, 1998 *apud* Boggio 2008, Priori 2003), e Alessandro Giuseppe Antonio Anastasio Volta da Universidade de Pavia.

Observações importantes foram realizadas por Galvani em estudos com sapos, mas boa parte de suas interpretações seguiu na direção errada. Galvani constatou que o contato de duas estruturas metálicas com o tecido muscular resultava em contração, fazendo com que ele levantasse a hipótese da existência de uma eletricidade animal (Piccolino, 1998). A primeira observação foi acidental; um de seus assistentes tocou a ponta de um equipamento no nervo interno da coxa de uma rã e viu-se em seguida uma série de contrações. A partir disso, Galvani começou a alterar as condições experimentais chegando, inclusive a considerar que as condições atmosféricas fossem capazes de interferir nas questões elétricas envolvidas. Galvani poderia ter seguido na direção de uma hipótese eletrolítica, entretanto ele acreditava existir uma eletricidade animal inerente (Boggio, 2006).



Figura 9: Luigi Galvani (1737-1798).

A hipótese de Galvani da eletricidade animal foi calorosamente criticado por Alessandro Volta. Volta replicou alguns dos estudos de Galvani, entretanto utilizando as mesmas composições metálicas nos dois eletrodos; nenhuma resposta com essa montagem era observada. Segundo Volta, os resultados de Galvani eram dependentes do material utilizado nos eletrodos, e esses sim estavam gerando uma diferença de potencial entre os pólos e subsequente circulação de corrente elétrica – tratava-se de eletrodos metálicos dissimilares o que gerava entre eles fluxo de elétrons; logo a conclusão seria que, ao invés de eletricidade animal, a estrutura que sofria contração poderia ser considerado como um condutor de corrente. Volta seguiu adiante com essa idéia culminando na elaboração da chamada pilha voltaica (Boggio, 2006).



Figura 10: Alessandro Volta (1745 – 1827).

A famosa discussão entre os dois grandes cientistas italianos, provavelmente o protótipo da discussão científica moderna, iniciou o “Século elétrico” com a descoberta e a ampla aplicação da eletricidade na medicina.

Logo após os experimentos de Galvani e Volta terem funcionado, correntes galvânicas (DC) foram prontamente aplicadas na medicina, particularmente em distúrbios mentais (Priori, 2003).

Em 1804, Giovanni Aldini, sobrinho de Galvani, dando continuidade aos trabalhos do tio, mas também considerando as colocações de Volta, realizou passos importantes na aplicação de eletricidade em seres humanos e forneceu elementos centrais para o desenvolvimento posterior de aspectos da fisiologia do Sistema Nervoso (Boggio, 2006). Aldini relatou o tratamento bem sucedido de pacientes sofrendo de melancolia através da aplicação de correntes galvânicas sobre a cabeça. A partir disto, muitos outros pesquisadores fizeram uso extensivo das correntes galvânicas para o tratamento de distúrbios mentais com resultados variados (Priori, 2003), uma vez que, a carga aplicada, localização dos eletrodos, caracterização dos pacientes, entre outros fatores, não eram variáveis bem controladas nessa época (Parent, 2004).

Por volta de 1930, Bini e Cerletti, da Universidade de Roma descobriram a terapia eletroconvulsiva, e observaram melhoras relevantes nos pacientes com o uso da técnica, levando a uma abrupta perda de interesse dos pesquisadores pela técnica de estimulação elétrica cerebral em humanos. Assim, o uso da terapia eletroconvulsiva e o posterior desenvolvimento da neuropsicofarmacologia enfraqueceram os estudos sobre os outros tratamentos (Priori, 2003).

Porém no início do século XX os estudos sobre o uso da estimulação elétrica foram retomados com a aplicação de estimulação por corrente contínua, dentro de um rigor metodológico mais apropriado em uma série de estudos com animais (Boggio, 2006).

Goldring & O'Leary (1950) apresentaram resultados de diversos experimentos realizados com coelhos. Em um desses experimentos, os autores investigaram os efeitos da polarização superficial positiva no potencial de ação. Os autores verificaram que a polarização positiva aplicada na superfície do córtex resultou no desenvolvimento de descargas paroxísticas. Também verificaram que a intensidade da corrente necessária para isso variava de experimento para experimento, sendo encontrada no geral com correntes variando entre 1 e 3 mA após polarização de 20-30 segundos. Também observaram duração do efeito após o término da estimulação variando de 1 a 2 minutos. Nos casos em que a corrente foi de 0.1-0.5 mA, nenhuma mudança foi observada (Boggio, 2006).

Nas últimas décadas, com o advento de métodos modernos de neuroimagem, um número crescente de técnicas de modulação da atividade cerebral vem se tornando cada vez mais estudadas e utilizadas para diversos tratamentos clínicos e pesquisas experimentais.

Algumas destas técnicas tem alcançado resultados promissores ao induzir alterações na excitabilidade cortical ampliando de forma significativa nossas possibilidades de desenvolver futuras terapias mais eficazes para diversas patologias que alteram o funcionamento cerebral, bem como um melhor entendimento do funcionamento de processos relacionados a neuroplasticidade, e a função cortical.

1.3.2. Estimulação transcraniana por corrente contínua

A Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC), do inglês, *transcranial Direct Current Stimulation* (tDCS), é uma técnica não invasiva e indolor de modulação da atividade cortical.

Passadas vários anos dos estudos iniciais sobre o uso da estimulação elétrica como ferramenta no tratamento de patologias cerebrais, por volta dos anos 60 a estimulação transcraniana por corrente contínua, teve uma breve retomada e seus efeitos foram sistematicamente investigados. Durante este tempo, foi observado que a tDCS seria capaz de afetar funções corticais através da modulação da atividade cortical.

Em dois artigos publicados em 1966 na quarta edição da “Neuropsychologia”, D.J. Albert (*apud* Utz et al., 2010) mostrou que estimulação elétrica catódica do córtex medial prejudicou a memória de ratos enquanto a estimulação anódica estimulou a consolidação da memória.

Outros trabalhos em animais também mostraram que a estimulação cerebral tinha fortes efeitos sobre a atividade e a excitabilidade cerebral (Bindman et.al. 1964; Purpura & McMurtry 1965, *apud* Fregni et al., 2005^a).

Apesar deste breve interesse, a técnica foi novamente abandonada pelo avanço do tratamento das desordens psiquiátricas com o uso de fármacos (Utz et. al. 2010).

Nas últimas décadas, no entanto, a tDCS tem ressurgido como uma técnica promissora de modulação da atividade cortical. Estudos associando tDCS com outras técnicas de imagem e mapeamento cerebral como a ressonância magnética funcional fMRI, a tomografia por emissão de pósitrons (PET) e a eletroencefalografia (EEG) vem revelando dados positivos e mostrando que a tDCS é capaz de modular a função cortical do cérebro humano induzindo mudanças focais, prolongadas, mas reversíveis, da excitabilidade cortical (Nietsche et al., 2008).

Apesar do grande número de evidências clínicas e pré clínicas da efetividade da tDCS, o conhecimento sobre seus mecanismos moleculares e celulares ainda precisam ser melhor elucidados. Sabe-se que a tDCS fortalece as conexões sinápticas induzindo potenciação a longo-prazo (*long-term potentiation* – LTP), e foi demonstrado através de experimentos farmacológicos realizados em humanos que os efeitos a longo prazo da técnica dependem de modificações na eficiência dos receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), uma vez que o bloqueio desses receptores por antagonistas como o dextrometorfano bloqueia os efeitos da tDCS (Liebetanz et. al., 2002). Ainda, as concentrações de Ca^{2+} intraneuronais contribuem para a modulação da LTP e a utilização de antagonistas de canais de cálcio eliminam o aumento da excitabilidade pós-tDCS anódica (Nitsche et.al., 2003).

Adicionalmente, em relação aos mecanismos moleculares, um estudo realizado em 2010 com fatias de córtex motor primário de camundongos, mostrou-se que a secreção de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), envolvido na plasticidade neuronal e a ativação do seu receptor TrkB são mediadores chave potenciais dos efeitos da tDCS na plasticidade sináptica. Em particular, a potenciação sináptica de longa duração promovida pela estimulação direta por corrente contínua foi ausente em camundongos “*knockout*” de BDNF e TrkB (Fritsch, 2010).

Embora ainda sejam necessários muitos estudos para a completa elucidação dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes a estimulação cerebral, sua eficiência em melhorar processos cognitivos e sua aplicabilidade em diversas patologias já são bem estabelecidas. Com isso, abre-se um desafio futuro de elucidar tais processos e aprimorar cada vez mais os parâmetros técnicos através de estudos clínicos e pré-clínicos.

1.3.2.1. O equipamento

O equipamento geralmente utilizado para gerar corrente contínua é constituído basicamente por quatro componentes principais: eletrodos (ânodo e cátodo), amperímetro (medidor de intensidade de corrente elétrica), potenciômetro

(componente que permite a manipulação da intensidade da corrente) e um jogo de baterias para gerar a corrente aplicada. A Figura 11 mostra o circuito básico do equipamento (Boggio, 2006).

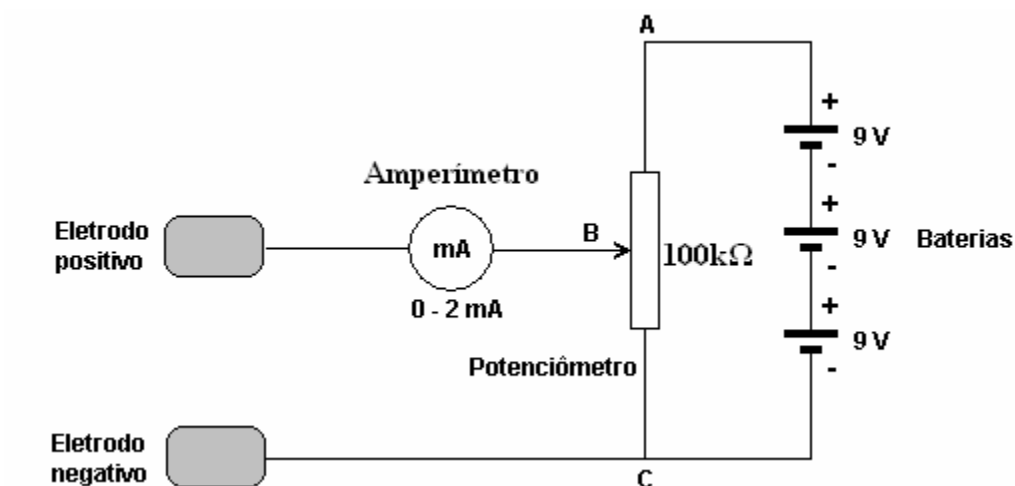


Figura 11: Circuito elétrico básico do equipamento de tDCS (Extraído de: Boggio, 2006).

Os eletrodos (sufixo derivado do grego *hodós*, que significa *via*) são os dispositivos que fazem com que a corrente elétrica se transmita do fio metálico para o indivíduo ou no caso do presente estudo para o animal.

Uma fraca corrente direta é induzida no córtex cerebral através desses dois eletrodos colocados geralmente sobre o couro cabeludo (Nitsche et al., 2008). Esta corrente fraca pode induzir mudanças focais da excitabilidade cortical - aumentando-a ou diminuindo-a dependendo da polaridade do eletrodo - que persistem após o período de estimulação. A direção e duração dessas mudanças na excitabilidade dependem da polaridade dos eletrodos, intensidade e duração da estimulação aplicada (Nitsche & Paulus 2001).

De forma geral, o eletrodo anódico, ou anodo, é definido como o eletrodo positivamente carregado e o eletrodo catódico ou catodo é o eletrodo carregado negativamente (Nitsche et al., 2008). O posicionamento destes eletrodos é de importância crucial para a distribuição espacial e direção do fluxo de corrente, que juntos determinam a efetividade da estimulação. Na maior parte dos estudos um anodo e um catodo são posicionados em diferentes regiões do escalpo, dependendo da função cerebral que está sendo estudada (Utz et al., 2010).

A densidade da corrente que alcança o córtex cerebral e portanto, a eficácia da tDCS em induzir modificações agudas na polaridade da membrana irá depender por sua vez, dos seguintes fatores: tamanho, posição e polaridade dos eletrodos, intensidade da corrente aplicada e propriedades do tecido na área estimulada (Wagner et al., 2007). Além disso, uma vez mantida constante a densidade da corrente o tempo de duração da estimulação irá determinar a ocorrência e duração dos efeitos pós-tDCS em humanos e animais (Nitsche et al., 2008).

Os efeitos da tDCS podem durar de alguns minutos a uma hora, ou até mais (Fregni et al., 2005^a; Nitsche et al., 2003; Liebetanz et al., 2009). Os efeitos imediatos são gerados pela mudança do potencial de repouso da membrana, enquanto que os efeitos a longo prazo dependem também de modulações na eficácia dos receptores NMDA (Nitsche et al., 2003).

A tDCS difere de outros métodos de estimulação cerebral como a EMT (estimulação magnética transcraniana) do inglês, TMS (*Transcranial Magnetic Stimulation*), por não induzir potenciais de ação nos neurônios, sendo portanto considerada uma intervenção neuromodulatória. A tDCS produz modificações na excitabilidade e atividade neuronal espontânea por uma despolarização ou hiperpolarização tônica do potencial de repouso da membrana (Nitsche et al., 2008).

1.3.2.2. Uso clínico da tDCS

A tDCS tem sido aplicada em estudos clínicos com resultados favoráveis em muitas desordens psiquiátricas e neurológicas, incluindo pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) (Fregni et al., 2005^b), dor crônica (Fregni et al., 2006^a), depressão (Fregni et al., 2006^b; Fregni et al., 2006^c), epilepsia (Fregni et al., 2006^d), doença de Parkinson (Fregni et al., 2006^e), na reabilitação motora (Fregni et al., 2005^b), e na redução da compulsão em usuários de drogas e alcoolistas (Boggio et al., 2008; 2010).

Além disso, existem evidências mostrando que a estimulação anódica transcraniana melhora a função cognitiva no homem, e este efeito parece ser devido a um reforço das sinapses glutamatérgicas (Fregni et al., 2005^a; Iyer et al., 2005; Nitsche et al., 2003).

Em estudos realizados em nosso laboratório avaliamos os efeitos clínicos e eletrofisiológicos (indicado pelo componente P3) da aplicação da tDCS sobre o córtex pré-frontal dorsolateral (CPF DL) esquerdo em diferentes tipos de alcoolistas de acordo com a Tipologia de Lesch (dados submetidos para publicação). Foram incluídos 49 alcoolistas, entre 18 e 75 anos, durante o período de abstinência prolongada. Estes indivíduos foram submetidos à registro de potenciais relacionados a eventos (PRE) sob a apresentação de sons relacionados ao álcool e sons neutros, antes, durante e após tDCS ativa (1mA, 35 cm², durante 10 minutos) ou procedimento simulado (*sham*) em uma ordem contrabalanceada e randomizada. Observamos uma melhora significativa do desempenho da função frontal após tDCS ativa quando comparado com o sham em alcoolistas do tipo IV. Houve um aumento na amplitude média de P3 principalmente no sítio frontal (Fz). Essa mudança foi também mais acentuada em alcoolistas do tipo IV (Nakamura-Palacios, 2011). Assim, nós encontramos evidências clínicas e eletrofisiológicas de aumento da atividade frontal induzida pela tDCS específica para os alcoolistas do tipo IV. Considerando-se que a disfunção frontal, pode contribuir para a perda de controle sobre o comportamento de beber, estes resultados sugerem que um

aumento local da atividade frontal induzida pela tDCS pode ter um impacto clínico benéfico.

1.3.2.3. Estudos em animais

Os estudos em animais a partir da década de 60 mostraram que os efeitos da tDCS estão associados a mudanças no limiar da membrana neuronal em repouso (Bindman et al., 1964; Púrpura & McMurtry 1965).

Um trabalho recém publicado por Takano e cols. 2011, mostrou através de experimentos utilizando ressonância magnética funcional (fMRI) a efetividade da tDCS em ativar áreas corticais através de estimulação anódica . Os autores observaram que uma estimulação de 400 μ A aplicada por 10 minutos na região acima do córtex frontal de ratos aumentou significativamente a intensidade do sinal de ressonância magnética no córtex frontal e nucleus accumbens.

A tDCS também mostrou aumentar a amplitude do potencial evocado motor em camundongos submetidos a estimulação anódica e levar ao efeito contrário, ou seja redução, quando aplicada uma corrente catódica (Cambiaghi et al., 2010). Além disso, a tDCS aplicada no córtex pré-frontal dorsolateral melhorou a aprendizagem em macacos (Rosem & Stamm, 1972 *apud* Nitsche et al.,2003), e apresentou resultados nos modelos animais de depressão (Fregni et al., 2007, Liebetanz et al.,2006^a), isquemia cerebral (Kim et. al., 2010) e epilepsia (Liebetanz et al., 2006^b).

1.5. Um novo método: A eDCS

Uma importante limitação da técnica de tDCS é sua baixa focalidade espacial. Isso é causado pelo tamanho relativamente largo dos eletrodos. Além disso, em protocolos padrão tanto o eletrodo de estímulo quanto o eletrodo de

referência estão localizados sobre o couro cabeludo, acima do cérebro (Nitsche et al.,2007).

A baixa focalidade da estimulação restringe a utilização da tDCS em protocolos básicos e clínicos por duas razões principais: o tamanho relativamente largo do eletrodo normalmente utilizado atinge em muitos casos não apenas a área de interesse, mas também áreas corticais adjacentes, limitando a interpretação dos resultados experimentais e podendo ser disfuncional em estudos clínicos, como por exemplo no tratamento de alguns casos de epilepsia, uma vez que a aplicação da tDCS catódica no foco epileptogênico primário é inevitavelmente acompanhada por um aumento na excitabilidade de outra área cortical próxima, o que poderia resultar em efeitos indesejáveis do tDCS . Para superar essas limitações é necessário que se aumente a focalidade da estimulação (Nitsche et. al. 2007).

Uma das alternativas para se aumentar a focalidade da estimulação seria a diminuição do tamanho do eletrodo desde que se mantenha a densidade da corrente constante (Nitsche et al., 2008).

Outro fator importante é a grande perda de corrente que ocorre na passagem da mesma pela superfície da pele, osso e meninges. Estima-se que pelo menos 50% da corrente seja perdida antes de alcançar o córtex cerebral (George & Aston Jones, 2010; Rush & Driscoll,1968 *apud* Nitsche et al.,2003).

Considerando as limitações supracitadas e ao mesmo tempo o grande número de possibilidades terapêuticas que se apresentam com as técnicas de neuromodulação, o desenvolvimento de uma alternativa que apresente uma maior focalidade da estimulação aliada a uma menor perda da corrente elétrica será de grande relevância para avançarmos no desenvolvimento de novas técnicas para a aplicação da corrente contínua de baixa intensidade de forma terapêutica.

A eDCS, ou estimulação epidural por corrente contínua é um modelo desenvolvido pioneiramente por nosso laboratório para o presente estudo que utiliza eletrodos posicionados diretamente acima da duramáter, diminuindo a

perda da corrente aplicada e aumentando a focalidade da estimulação, possibilitando uma aplicação mais precisa da técnica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Neste estudo pretendeu-se examinar os efeitos de um novo método de estimulação epidural pré-frontal esquerda por corrente contínua de baixa intensidade sobre a memória operacional de duração prolongada em ratos.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Examinar a viabilidade da implantação de eletrodos sobre a dura mater em região acima do córtex pré-frontal medial esquerdo para oferecer uma maior focalidade de estimulação e uma menor perda de corrente.
- ❖ Investigar os efeitos da estimulação epidural de corrente contínua sobre o córtex pré-frontal medial esquerdo no desempenho da memória operacional espacial de animais submetidos a tarefas com retardos prolongados (1 h, 4 h e 10 h) no labirinto radial de 8 braços.
- ❖ Avaliar as alterações morfológicas no córtex pré-frontal dos animais submetidos a estimulação epidural repetitiva.
- ❖ Estudar a correlação entre as modificações morfológicas e os parâmetros comportamentais avaliados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 23 ratos *Wistar*, machos, pesando entre 250 e 300 g, provenientes da colônia do biotério do Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno medindo 30 cm de comprimento, 19 cm de largura, e 13 cm de altura, em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$), e ciclo claro-escuro artificial de 12 h, com alimento e água *ad libitum*.



Figura 12: Colônia do biotério do laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia, CCS, UFES, 2011.

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais, além da Resolução N°714/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária no que diz respeito aos procedimentos anestésicos e eutanásia. Este projeto foi

aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo no. 009/2011 do CCS/UFES.

3.2. Labirinto Radial de 8 Braços

O labirinto radial de 8 (oito) braços (LR-8) foi originalmente proposto por Olton e Samuelson em 1976 com a finalidade de avaliar a memória operacional espacial de animais (Olton, 1979). Posteriormente, este método também foi introduzido para investigar os efeitos de diversas drogas sobre a função da memória operacional espacial (Oliveira et al., 1990; Nakamura et al., 1991; Nakamura-Palácios & Roelke, 1997).

O LR-8 é construído em acrílico transparente, possuindo uma área central de base octogonal com 33 cm de diâmetro, de onde partem 8 braços simétricos e removíveis com 65 cm de comprimento, 10 cm de largura e paredes laterais de 4 cm de altura. No final de cada braço estão fixados receptáculos de acrílico preto com 11 cm de comprimento, 5 cm de largura e 3 cm de profundidade para colocação do reforço (pedaços de amendoim). A plataforma central é constituída, em suas margens, de paredes de acrílico transparente de 30 cm de altura, nas quais encontram-se portas deslizantes em forma de guilhotina que permitem o acesso aos braços. As portas estão presas a fios de nylon que ficam sob o controle do examinador, o qual encontra-se à distância do labirinto para abertura e fechamento das mesmas. Placas de acrílico transparente com 20 cm de altura estão fixadas na entrada das portas para evitar que o animal atravesse de um braço a outro.

O aparato é montado sobre uma armação de madeira compensada revestida de fórmica branca e sustentado por um suporte de metal a 100 cm do assoalho (Fig.13).



Figura 13: Labirinto radial de 8 braços.

Neste estudo, uma série de precauções foram tomadas a fim de garantir um resultado plenamente confiável e livre de interferências externas.

A sala onde localiza-se o labirinto radial foi projetada exclusivamente para este fim, possuindo pistas espaciais fixas, temperatura controlada e iluminação especial (Fig 14). Além disso, para evitar qualquer interferência de ruídos externos no momento do treinamento do animal, utilizamos uma música de fundo em todas as sessões de treinamento de todos os animais. A mesma música era utilizada em todas as sessões desde o momento da habituação do animal à sala de comportamento até o retorno ao biotério.



Figura 14: Sala de experimentos comportamentais utilizada na realização do protocolo. O ambiente possui iluminação especial e temperatura controlada.

3.2.1. Aquisição da Tarefa

Os animais foram submetidos a sessões de treinamento no LR-8 sob privação parcial de alimento, de modo a mantê-los em aproximadamente 85 a 90% do peso corporal inicial, para possibilitar a aquisição das tarefas no decorrer dos treinos. Os pesos foram ajustados de acordo com o desempenho do animal nas seguintes fases para aquisição da tarefa:

Fase I – Os animais são colocados no centro do labirinto com todas as portas abertas para exploração e adaptação no ambiente durante 10 minutos por dois dias consecutivos.



Figura 15: Labirinto radial: Fase I

Fase II – Pedacos de amendoim (reforço) são colocados nos receptáculos nos finais dos braços. Essa fase perdura até que o animal encontre o reforço nos receptáculos

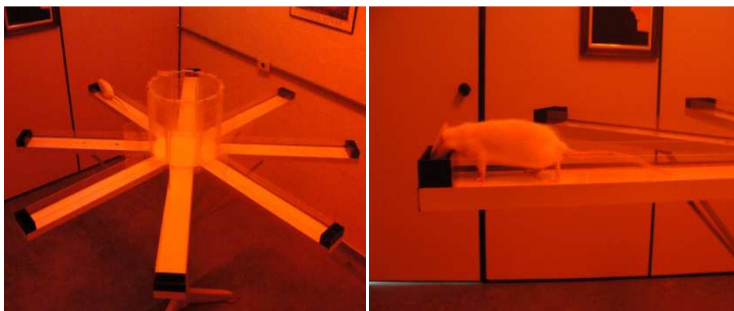


Figura 16: Labirinto radial: Fase II

Fase III – Uma vez que o animal localiza o reforço, o mesmo é colocado no centro do labirinto com todas as portas abertas. Após entrar em um dos braços, a porta que permitia o acesso àquele braço é fechada e o animal colocado novamente no centro do labirinto com livre acesso aos outros braços. Esta fase termina quando o animal percorre todos os braços em até 10 minutos.

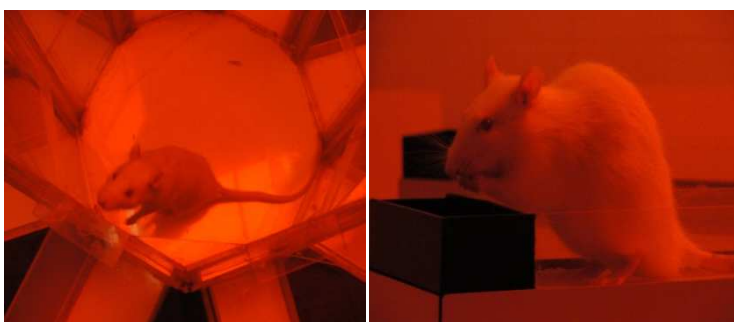


Figura 17: Labirinto radial: Fase III

Fase IV – É a fase de aquisição da tarefa propriamente dita, onde o animal aprende a entrar em cada braço apenas uma vez. Todas as portas são abertas a cada recolocação do animal no centro do labirinto. O mesmo deve aprender a

visitar cada um dos braços apenas uma única vez em cada sessão. Considera-se erro de desempenho a repetição de um braço já visitado pelo animal. Os animais são treinados até atingirem o critério de 0 a 1 erro por sessão, nas últimas 3 sessões de treinamento.



Figura 18: Labirinto radial: Fase IV.

Fase V – Após os animais terem atingido o critério de aprendizagem na fase IV, foi realizado o treinamento com testes de retardo de 5 segundos, com o objetivo de habituar o animal ao procedimento que avaliou os efeitos da eDCS sobre a memória operacional espacial.

Nesta fase foi introduzido um **intervalo de retenção (retardo)** entre o quarto e quinto braços visitados. A sessão de treinamento era dividida em 2 partes: na **primeira corrida (pré-retardo)** 4 portas foram abertas aleatoriamente e os animais alcançavam o reforço. As quatro portas restantes permaneciam fechadas. Após terem visitado o quarto braço, eles eram levados até a gaiola-casa onde permaneciam por um período de 5 segundos (Fig 19).



Figura 19: Labirinto radial: Fase V. Após visitar os 4 primeiros braços o animal era colocado de volta para sua gaiola-casa onde permanecia por 5 segundos no intervalo de retenção.

Na **segunda corrida (pós-retardo)** os animais foram recolocados no centro do labirinto e estando todas as portas abertas eles deveriam entrar nos 4 braços ainda não visitados.

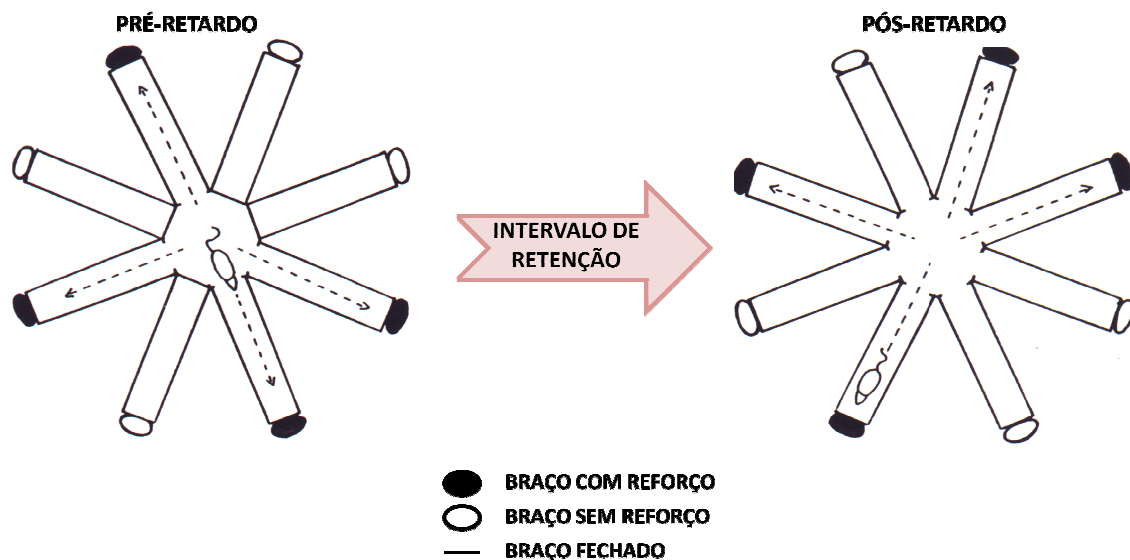


Figura 20: Desenho esquemático da fase V ilustrando o pré e pós-retardo. Note que no pré-retardo apenas 4 portas encontram-se abertas e após o intervalo de retenção todas as 8 portas do labirinto encontram-se abertas sendo que o animal deverá entrar apenas nas 4 não visitadas anteriormente (Extraído e modificado de Rodrigues, 2006).

Os animais foram treinados até atingirem um critério de 0 a 1 erro por sessão, tanto no pré- como no pós-retardo. Foram necessárias cerca de 3 sessões para que os animais atingissem o critério, estando aptos então a serem submetidos à cirurgia estereotáxica.

Após o período de recuperação pós-cirúrgica, os animais retornaram ao labirinto radial de 8 braços para as devidas sessões de teste com os diferentes intervalos de retardo.

Foram realizadas seis sessões de retardo divididas como se segue:

Sessão 1

Esta sessão foi realizada com o objetivo de re-habituar o animal ao procedimento de retardo, bem como para a certificação de que o animal não sofreu nenhum dano cognitivo devido ao procedimento cirúrgico. O procedimento foi realizado como descrito acima sendo que nenhuma estimulação foi realizada.

Intervalo de retenção: 5 segundos.

Sessão 2

O animal recebeu a estimulação por 11 minutos e após o intervalo habitual de 5 minutos pós-estimulação foi levado ao labirinto para a sessão de treinamento.

Intervalo de retenção: 1 hora

Sessão 3

O animal era submetido ao teste de retardo normalmente, porém não recebia a estimulação.

Intervalo de retenção: 5 segundos

Sessão 4

Esta sessão era semelhante à sessão 2, porém, ao invés do tempo de intervalo ser de 1 hora foi realizada uma única sessão com um intervalo de 4 horas entre o pré e o pós-retardo.

Intervalo de retenção: 4 horas.

Sessão 5

O animal era submetido ao teste de retardo normalmente, porém não recebia a estimulação.

Intervalo de retenção: 5 segundos.

Sessão 6

Esta sessão era semelhante à sessão 4, porém, ao invés do tempo de intervalo ser de 4 horas, foi realizada uma única sessão com um intervalo de 10 horas entre o pré e o pós-retardo.

Intervalo de retenção: 10 horas.

Todo o estudo foi realizado em formato duplo-cego, o experimentador que realizava a coleta dos dados de desempenho comportamental no labirinto radial desconhecia a que grupo pertencia o animal em teste, e o experimentador que realizava as aplicações da eDCS ou procedimento sham desconhecia o resultado do desempenho dos animais, para evitar qualquer viés no registro dos procedimentos comportamentais.

3.3. Cirurgia Estereotáxica

Após terem alcançado a fase V do treinamento, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante do eletrodo de estimulação (anodo) na região epidural acima do córtex pré-frontal medial esquerdo (Fig 21).

Inicialmente, os animais foram anestesiados com o anestésico Cetamina (75 mg/kg) + Xilazina (10 mg/kg) em um volume de 0,1 ml/100g de peso corpóreo. A seguir, foi realizada a tricotomia na parte superior da cabeça e os mesmos foram fixados no estereotáxico (modelo 51600, Stoeling, IL, EUA), onde os seguintes procedimentos foram realizados:

1. Assepsia com álcool iodado na área cirúrgica;
2. Injeção de um botão anestésico com 0,2 ml de solução de lidocaína a 1 % no tecido subcutâneo;
3. Corte da região do botão anestésico, com retirada de pele e tecido subcutâneo para exposição da calota craniana na região do bregma;

4. Realização das primeiras medidas estereotáticas, para definição e marcação do local de fixação do eletrodo;
5. O posicionamento do eletrodo (anodo) foi: + 2,5 mm AP, + 1 mm L em relação ao Bregma para o alcance do córtex pré-frontal;
6. Após a devida marcação do local de fixação do eletrodo foi realizada uma abrasão da superfície craniana com o auxílio de uma mini-furadeira (Dremel Multipro + Kit, Stoeling, IL, USA), até a exposição da duramater, sem que as meninges fossem perfuradas.
7. Abertura de dois orifícios laterais na calota craniana para o posicionamento de um fixador confeccionado de material plástico não condutor de eletricidade com o auxílio de uma mini-furadeira (Dremel Multipro + Kit, Stoeling, IL, USA), como preparação para a ancoragem da prótese cirúrgica (neste procedimento, o crânio do animal não foi totalmente perfurado, foi realizada apenas uma abrasão bilateralmente com a finalidade de ancorar o fixador no crânio do animal);
8. Preenchimento da abertura craniana de 5 mm sobre a duramater com gel condutor;
9. O eletrodo medindo 5 mm de diâmetro era devidamente posicionado acima da abertura do crânio sobre o CPFm e fixado com resina acrílica auto-polimerizável de secagem rápida (polímero de metacrilato, JET, São Paulo, SP, Brasil);
10. Após o procedimento cirúrgico e ainda sob o efeito da anestesia o animal recebeu aproximadamente 0,2 ml de Penicilina G Benzatina 24.000 UI por via intramuscular.

11. Foi realizada também uma tricotomia na região posterior direita do animal, próximo ao pescoço, onde o catodo móvel era posicionado no momento da estimulação para uma melhor fixação do mesmo.
12. Colocação do animal em um local aquecido para recuperação pós-cirúrgica;
13. Retorno do animal para sua gaiola-casa.



Figura 21: Cirurgia extereotóxica para colocação do eletrodo de estimulação. Da esquerda para direita: Colocação do animal no aparato extereotáxico; retirada da pele e tecido subcutâneo para exposição da calota craniana, localização do Bregma para a realização das medidas extereotáxicas; Localização da área do CPFm, abrasão da superfície craniana para exposição da duramáter, fixador plástico utilizado para ancoragem do eletrodo; colocação do fixador

plástico na calota craniana, colocação do eletrodo de estimulação (anodo), fixação do eletrodo com resina auto-polimerizável de secagem rápida.

Nos dias seguintes ao procedimento cirúrgico foram diluídas duas gotas do analgésico Ibuprofeno infantil 50 mg na água do bebedouro do animal para evitar possíveis desconfortos causados pela cirurgia.

3.4. Estimulação epidural por Corrente Contínua de Baixa Intensidade

A estimulação epidural de corrente contínua direta de baixa intensidade foi realizada empregando-se um par de eletrodos de estimulação constituído de material auto-adesivo (Valutrode®, Axelgaard Mfg.Co.,Ltd. USA), sendo que o eletrodo anódico media 5 mm de diâmetro e o catódico 10 mm. O eletrodo anódico era fixado previamente na região epidural, acima do córtex pré-frontal em procedimento cirúrgico descrito previamente.

O eletrodo catódico era colocado sobre a pele na região posterior direita da cabeça do animal próxima ao pescoço (Fig.22).



Figura 22: A estimulação epidural de corrente contínua direta de baixa intensidade era realizada empregando-se um par de eletrodos de estimulação, sendo que o eletrodo anódico previamente fixado sobre o CPFm do animal em procedimento cirúrgico era conectado ao estimulador, e o eletrodo catódico era colocado sobre a pele na região posterior direita da cabeça do animal próxima ao pescoço.

A corrente elétrica era liberada por um estimulador de corrente contínua, empregando uma bateria de 9V, especialmente desenvolvido para esta finalidade (tDCS Demo Unit serial # 072208-03, NeuroQuest Therapeutics, USA) sendo a saída máxima de corrente de 10 mA (Fig.23).

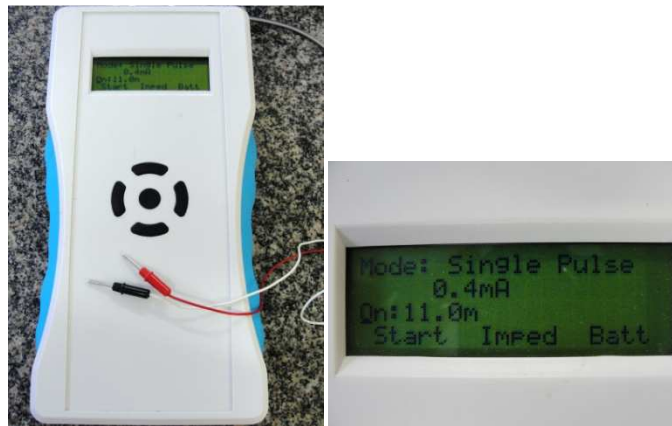


Figura 23: Estimulador de corrente contínua, *tDCS Demo Unit serial # 072208-03*, NeuroQuest Therapeutics®, USA.

Uma corrente constante de intensidade de 400 μ A foi aplicada por 11 minutos, previamente a sessão de testes. No momento da estimulação era realizada uma leve contensão do animal para a correta aplicação do estímulo e posicionamento do catodo.

Dos 23 animais submetidos a todos os procedimentos no labirinto radial, um animal foi excluído por não atingir o critério de aprendizagem após aproximadamente 30 sessões de treinamento, três animais foram excluídos por não percorrerem o labirinto de forma a permitir o prosseguimento dos treinamentos para aquisição das tarefas ou realização dos testes com retardos, e um animal foi excluído já na fase dos testes por extrapolar o critério de desempenho previamente definido cometendo dois erros no desempenho do pré-retardo. Portanto, dezoito animais seguiram satisfatoriamente até o final do protocolo experimental, porém havendo perda das próteses de fixação do eletrodo em dois animais antes da realização dos testes com retardos de 10

horas, daí ter ocorrido uma redução do número de animais em cada grupo para estes testes.

Assim, os animais que atingiram o critério de aprendizagem no labirinto radial ($n = 18$) foram distribuídos por randomização em blocos de 4 (<http://www.randomization.com>) em 2 grupos:

(1) Grupo eDCS ($n = 9$)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação de 400 μ A por 11 minutos, 5 minutos antes do início das sessões de testes.

(2) Grupo Sham ($n = 9$)

Na estimulação simulada (*sham*), os eletrodos foram colocados na mesma posição, entretanto, o estimulador não foi ligado.

Cinco minutos após a estimulação, os animais eram colocados no labirinto radial de 8 braços para a realização dos procedimentos de retardos de 1 h, 4 h ou 10 h no labirinto radial sob a estimulação prévia do córtex pré-frontal medial esquerdo ou procedimento sham.

Ao final de todo protocolo experimental, os animais foram eutanasiados sob anestesia em procedimento descrito a seguir.

3.5. Histologia

A análise histológica foi realizada ao final de todo o protocolo experimental com o objetivo de observar se houve a ocorrência de lesão no córtex cerebral na região abaixo do eletrodo de estimulação (anodo) bem como na região de interesse do estudo (CPFm).

Vinte e quatro horas após o último teste de retardo com estimulação ativa ou *sham*, os animais receberam altas doses do anestésico Cetamina + Xilazina (IP) e foram submetidos à perfusão intracardíaca com solução salina seguida de solução de formaldeído a 8%.

Os cérebros foram então removidos e mantidos em solução de formaldeído a 8% por um período mínimo de 48 horas, depois dos quais foram seccionados em cortes coronais de 40 µm de espessura em um Micrótomo de congelamento (JUNG-AG, Alemanha).

Os cortes obtidos foram montados sequencialmente em lâminas gelatinizadas e, após um período de secagem de 24 horas, passaram por processamento histológico com a técnica de marcação pelo método de coloração de Nissl (cresil violeta) e proteção com DPX e lamínula. A observação das características histológicas gerais e a localização da região de interesse (CPFm) foram feitas através da visualização em uma lupa estereoscópica (SZ40) e um microscópio (BX41) ambos da marca Olympus®.

As imagens das lâminas foram capturadas com o auxílio de uma câmera de vídeomicroscopia e digitalizadas em computador para posterior análise.

3.6. Análise de resultados

Para análise de desempenho no labirinto radial de 8 braços foram observados o número de erros cometidos e o tempo gasto em cada braço visitado numa sessão de treinamento ou de teste.

A análise do número de erros cometidos foi realizada através da entrada do animal em braços já visitados numa mesma sessão de treinamento, enquanto a análise de tempo gasto em cada braço foi avaliada pela relação entre o tempo total de permanência no labirinto (em segundos) e o número de braços visitados naquela sessão.

Tanto os dados de desempenho como os de tempo de permanência nos braços foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) dos dados analisados.

A comparação do desempenho entre os grupos (sham vs eDCS) em cada teste de retardo foi feita pela através de teste t de Student para amostras independentes. As análises de desempenho intra-grupos (entre os testes de retardos de 1 h, 4 h e 10 h) foram feitas por Análises de Variância de uma via para medidas repetidas seguidas do teste de Bonferroni para as comparações múltiplas.

Em todas as análises foi empregado um nível de significância para $p < 0,05$. Para as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foi empregado o programa GraphPad Prisma em sua versão 4.0.

4. RESULTADOS

4.1 Aquisição da tarefa no labirinto radial de 8 braços

Todos os animais ($n = 18$) apresentaram melhora progressiva do desempenho na fase de aquisição da tarefa (fase IV) no decorrer das últimas 10 sessões de treinamento. A análise de regressão linear demonstrou uma diminuição progressiva do número de erros até a última sessão, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem, ou seja, 0 a 1 erro por sessão ao longo de 3 sessões consecutivas [$F(1,8) = 5,456$; $Y = 1,854 - 0,13X$; $r = 0,41$; $p < 0,05$], (Fig. 24).

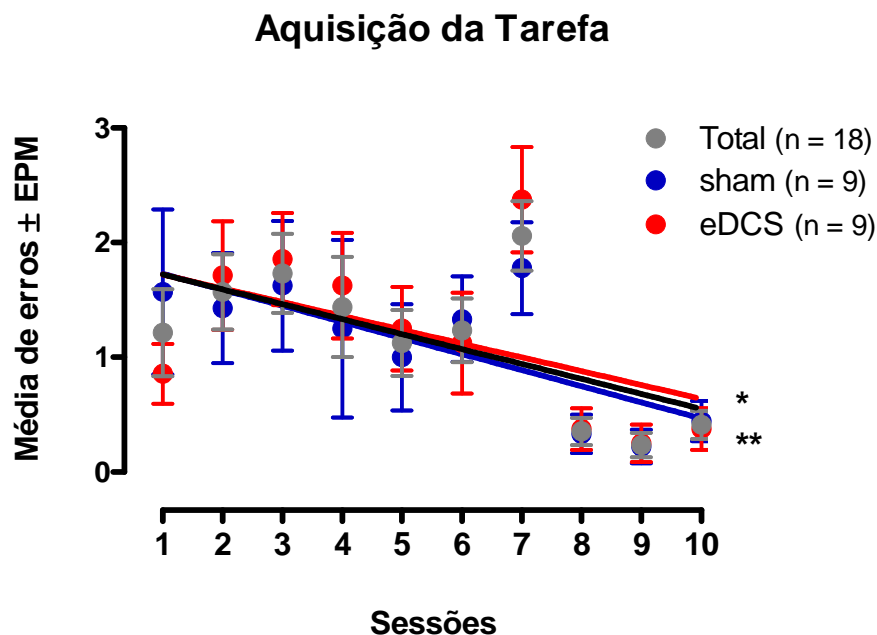


Figura 24: Média de erros \pm e.p.m. nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no labirinto radial de 8-braços. * $p < 0,05$ (Total); ** $p < 0,001$ (*sham*) (Análise de regressão linear).

Ao analisarmos o desempenho dos 2 grupos (*sham* x eDCS) de forma separada, a análise de regressão exponencial mostrou uma redução estatisticamente significativa do número de erros com a progressão das sessões de treinamento no grupo *sham* [$F(1,8) = 9,82$; $Y = 1,870 - 0,14X$; $r = 0,55$; ** $p < 0,01$], e embora alguns animais do grupo eDCS tenham

apresentado maiores flutuações no desempenho ao longo das sessões intermediárias, observa-se que o grupo eDCS [$F(1,8) = 2,78$; $Y = 1,843 - 0,12X$; $r = 0,26$) também apresentou uma redução no número de erros ao longo das sessões de treinamento, embora de forma não estatisticamente significativa, tendo ambos os grupos alcançado resultados que estão em concordância com a melhora progressiva do desempenho, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem.

4.2. Efeitos da estimulação epidural de corrente contínua de baixa intensidade sobre o CPFm esquerdo sobre a Memória Operacional de Ratos

4.2.1 Retardos de 1 h

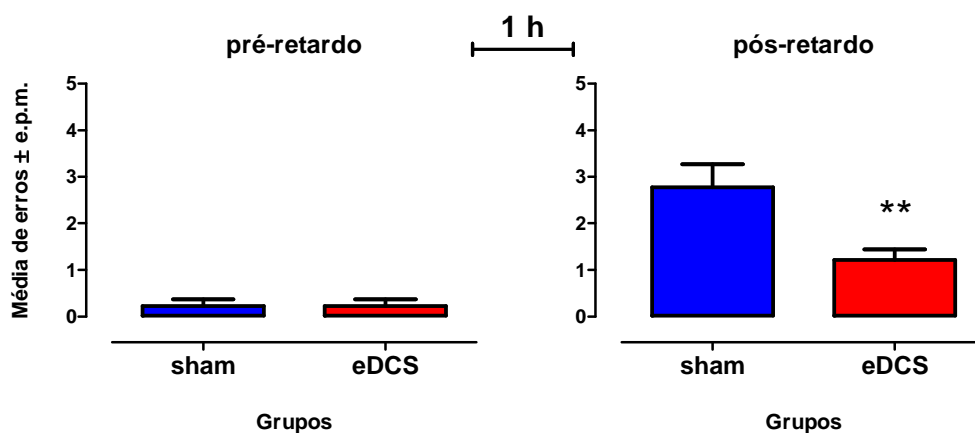


Figura 25: Efeito da eDCS ($n = 9$) e do procedimento *sham* ($n = 9$), sobre o desempenho (média de erros \pm e.p.m) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no labirinto radial de 8-braços. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo *sham*. (Teste t de Student para medidas independentes $t=2,873$).

O desempenho dos animais na realização dos testes com retardos de 1 hora no labirinto radial após terem sido submetidos a eDCS pode ser observado na

figura 25. A análise do desempenho foi feita com base no número de erros cometidos pelo animal em cada sessão de teste.

Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos no desempenho dos animais no pré-retardo. (Fig. 25, à esquerda).

O teste t de *Student*, entretanto, detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais do grupo eDCS quando comparados ao grupo *sham* após o intervalo de retardo de 1 hora, onde os animais submetidos a eDCS antes do teste de retardo, apresentaram significativamente ($p < 0,01$) um menor número de erros quando comparados aos animais *sham* (Fig. 25, à direita).

O tempo gasto em cada braço antes e após o retardo de 1 hora está representado na Tabela 1. O teste t de *Student* para medidas independentes não identificou diferenças estatisticamente significantes entre os tempos em cada tratamento tanto no pré- quanto no pós-retardo de 1 hora.

Tabela 1: Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado pelos animais antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 1 hora no labirinto radial de 8-braços.

Retardo de 1 hora		
Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Grupos	Pré-retardo	Pós-retardo
SHAM (n = 9)	24,2 \pm 4,5	21,9 \pm 2,8
eDCS (n = 9)	26,4 \pm 7,3	23,0 \pm 4,8

4.2.2. Retardo de 4 horas

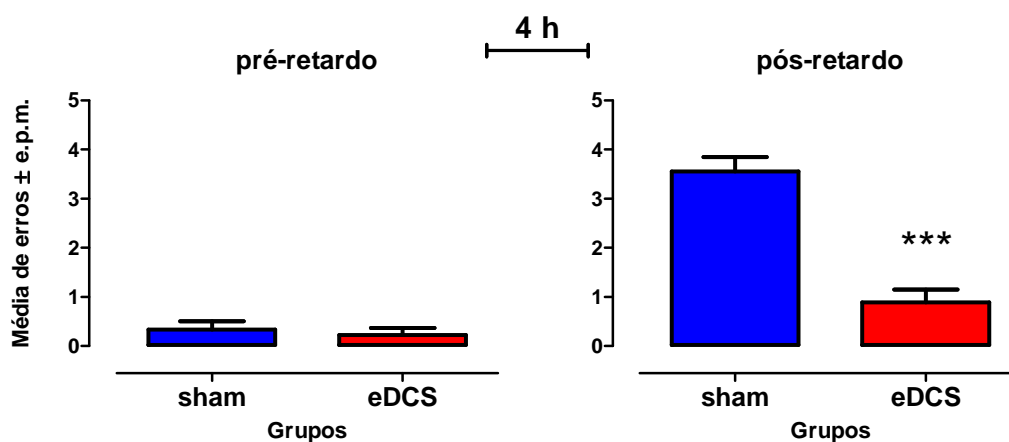


Figura 26: Efeito da eDCS ($n = 9$) e do procedimento *sham* ($n = 9$), sobre o desempenho (média de erros \pm e.p.m) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 4 horas no labirinto radial de 8-braços. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo *sham*. (Teste t de *Student* para medidas independentes $t=6,788$).

A figura 26 apresenta o desempenho dos animais na realização dos testes com retardos de 4 horas no labirinto radial de 8 braços após terem sido submetidos a eDCS.

Assim como no intervalo de retardo de 1 hora, não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos no desempenho dos animais no pré-retardo. (Fig. 26, à esquerda).

Em relação ao desempenho dos animais após os retardos de 4 horas, também foram detectadas diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais submetidos à eDCS. Nesta condição, os animais novamente apresentaram significativamente ($p < 0,001$) um menor número de erros quando comparados aos animais *sham*. (Fig. 26, à direita)

Em relação ao tempo gasto em cada braço visitado pelo animal, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, tanto no pré quanto no pós-retardo nesse intervalo de retenção (Tabela 2).

Tabela 2: Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado pelos animais antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 4 horas no labirinto radial de 8-braços.

Retardo de 4 horas		
Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Grupos	Pré-retardo	Pós-retardo
SHAM (n = 9)	23,9 \pm 6,4	20,1 \pm 3,5
eDCS (n = 9)	25,9 \pm 6,5	22,9 \pm 4,0

4.2.3. Retardo de 10 horas

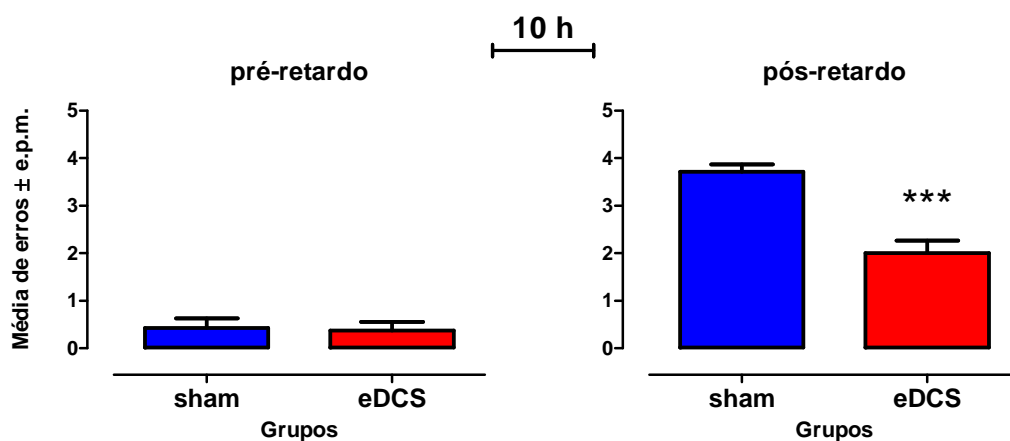


Figura 27: Efeito da eDCS (n = 8) e do procedimento sham (n = 8), sobre o desempenho (média de erros \pm e.p.m.) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 10 horas no labirinto radial de 8-braços. ** P < 0,001 comparado ao grupo *sham*. (Teste t de Student para medidas independentes t=5,506).

O desempenho dos animais na realização dos testes com o maior intervalo de retenção (10 horas) está ilustrado na figura 27.

Assim como nos intervalos anteriores, não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos no desempenho dos animais no pré-retardo. (Fig. 27, à esquerda).

Em relação ao desempenho dos animais após os retardos de 10 horas, foram detectadas diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais do grupo eDCS, quando comparados ao grupo *sham*, com os animais submetidos a eDCS apresentando novamente um número de erros significativamente ($p < 0,001$) menor em comparação aos animais *sham* (Fig.27, à direita), confirmando os dados encontrados nos demais intervalos de retardo.

Em relação ao tempo gasto em cada braço antes e após o retardo de 10 horas não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos em cada tratamento tanto no pré- quanto no pós-retardo (Tabela 3).

Tabela 3: Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado pelos animais antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardos de 10 horas no labirinto radial de 8-braços.

Retardo de 10 horas		
Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Grupos	Pré-retardo	Pós-retardo
SHAM (n = 8)	17,0 \pm 2,6	19,0 \pm 4,7
eDCS (n = 8)	19,1 \pm 2,2	26,5 \pm 7,4

4.2.4. Desempenho intra-grupos

A análise do desempenho intra-grupos foi feita com base na média do número de erros cometidos pelo grupo em cada sessão de teste nos diferentes intervalos de retenção.

4.2.4.1. Grupo *Sham*

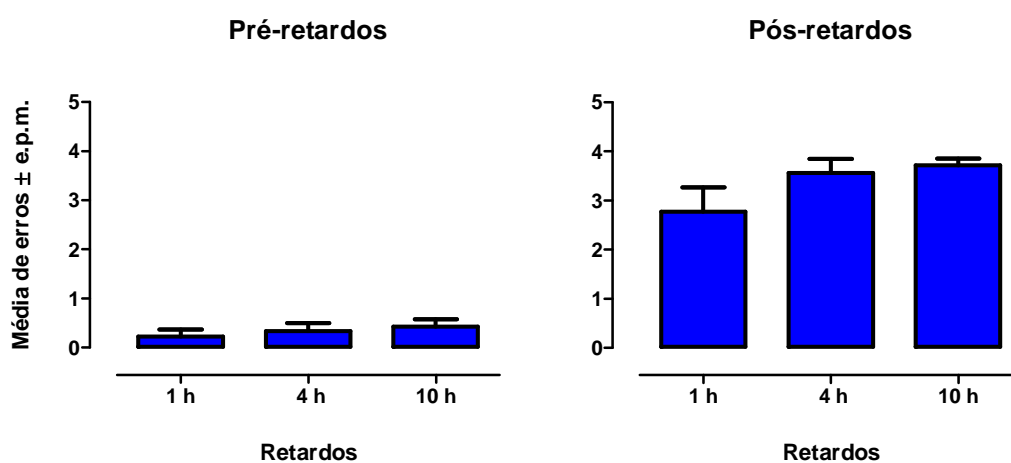


Figura 28: Média do desempenho dos animais do grupo *sham* durante o pré (à esquerda) e pós-retardo (à direita), ao longo dos diferentes intervalos de retenção ($n = 9$) (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Bonferroni).

A figura 28, compara o desempenho dos animais do grupo *sham* na realização dos testes no labirinto radial de 8 braços nos diferentes intervalos de retenção durante a fase de pré e pós-retardo.

Não foram encontradas diferenças significativas entre o desempenho dos animais durante o pré-retardo nos diferentes intervalos de retenção (1, 4 ou 10 horas).

A análise conjunta do desempenho do grupo *sham* durante o pós-retardo também não detectou diferenças estatisticamente significantes, embora ocorra uma tendência a um aumento no número de erros no retardo de 4 horas se comparado ao menor intervalo de retardo de 1 hora.

4.2.4.2. Grupo eDCS

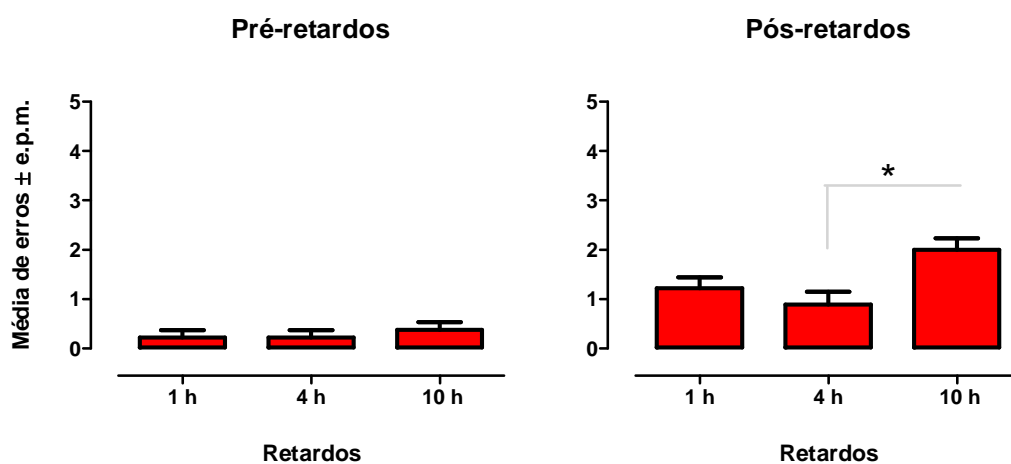


Figura 28: Média do desempenho dos animais do grupo eDCS durante o pré (à esquerda) e pós-retardo (à direita), ao longo dos diferentes intervalos de retenção ($n = 9$), * $p < 0,05$ (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Bonferroni).

A figura 28, representa o desempenho dos animais do grupo eDCS na realização dos testes no labirinto radial de 8 braços nos diferentes intervalos de retenção durante a fase de pré- e pós-retardo.

Assim como no grupo *sham*, não foram encontradas diferenças significativas entre o desempenho dos animais eDCS durante o pré-retardo entre diferentes intervalos de retenção (1, 4 ou 10 horas).

Entretanto, analisando-se a fase de pós-retardo, a ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes no desempenho dos animais eDCS entre os diferentes testes de retardos [$F(2,16) = 4,329$; $p = 0,03$].

O teste de comparações múltiplas de Bonferroni demonstrou que os animais apresentaram maior número de erros ($p < 0,05$) no teste de retardo de 10 h comparado ao desempenho observado no teste de retardo de 4 h.

Adicionalmente, também pudemos observar uma tendência a um melhor desempenho dos animais do grupo eDCS no retardo de 4 horas quando comparado ao menor intervalo de retardo, de 1 hora, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

4.3. Histologia

A análise histológica foi realizada ao final de todo o protocolo experimental com o objetivo de observar se houve a ocorrência de lesão no córtex cerebral na região abaixo do eletrodo de estimulação (anodo) e principalmente na região de interesse do estudo (CPFm) (Fig.29).

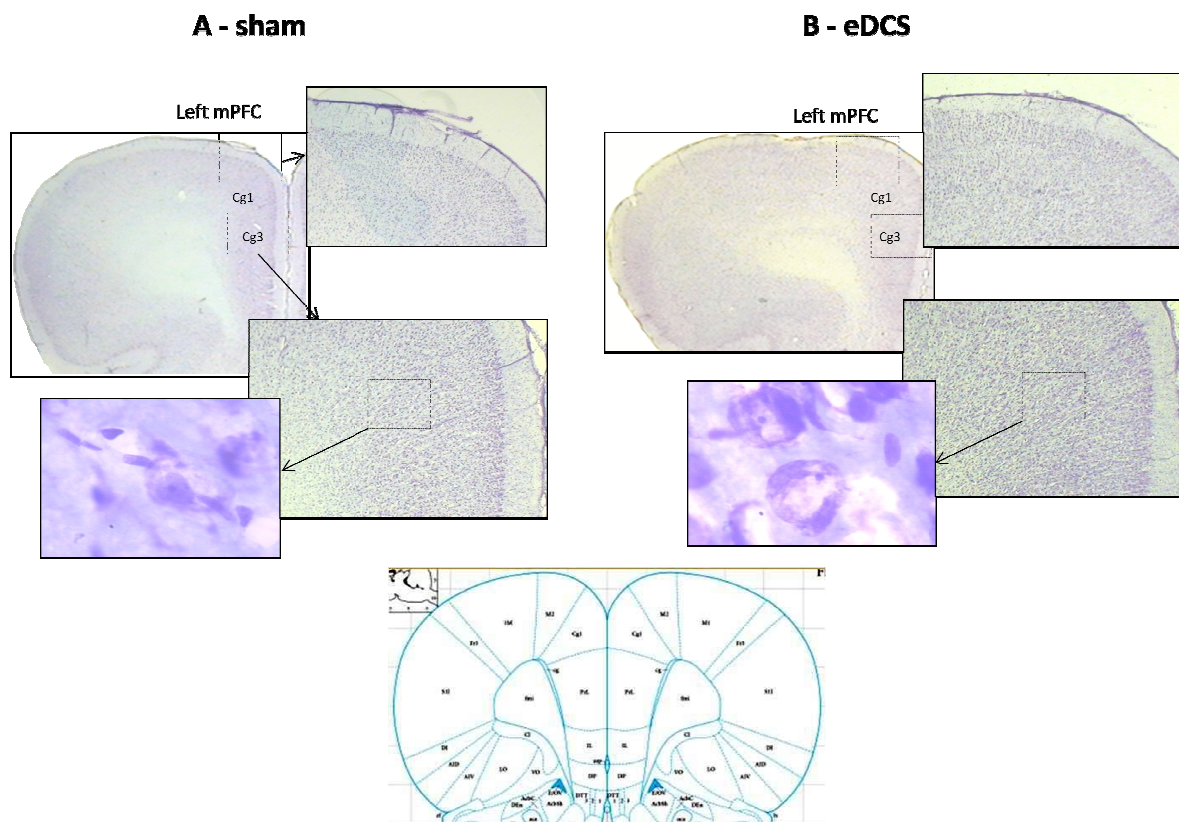


Figura 29: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) do cérebro de ratos com implantação de eletrodos de estimulação epidural por corrente contínua de baixa intensidade (eDCS), aproximadamente 3,0 mm anterior ao Bregma (Paxinos, 2002). Nas imagens A e B identificam-se as áreas Cg1 do cíngulo anterior e Cg3 do córtex pré-límbico que constituem parte importante do CPFm em roedores. A análise histológica das imagens indica a integridade dos neurônios do córtex pré-frontal medial tanto nos animais sham (A), quanto nos animais submetidos a 3 sessões de eDCS na intensidade de 400 μ A por 11 minutos (B). Objetivas de 2X, 10X e 100X para os respectivos cortes.

A observação das características histológicas gerais e a localização da região de interesse (CPFm) foram feitas através da visualização em uma lupa estereoscópica (SZ40) e um microscópio (BX41) ambos da marca Olympus®.

As imagens das lâminas foram capturadas com o auxílio de uma câmera de videomicroscopia e digitalizadas em computador para posterior análise.

A análise das características histológicas gerais da região localizada abaixo do eletrodo de estimulação mostrou que a estimulação epidural por corrente

contínua na intensidade utilizada (400 μ A) não provocou a formação de qualquer tipo de lesão na camada de neurônios subjacente.

Ainda, a região de interesse do presente estudo é mostrada na figura 29, onde podemos identificar as áreas Cg1 do cíngulo anterior e Cg3 do córtex pré-límbico que constituem parte importante do CPFm em roedores. Nota-se que não houve a formação de nenhum tipo de alteração ou lesão neuronal na região. A fotomicrografia utilizando-se a objetiva de 100x mostra os neurônios da região íntegros e sem qualquer indício de lesão ou morte celular.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que os animais submetidos à estimulação epidural por corrente contínua (eDCS) na intensidade de 400 μ A aplicada sobre o CPFm esquerdo por 11 minutos antes das sessões de teste, apresentaram significativamente um menor número de erros quando comparados aos animais *sham* após os retardos de 1, 4 e 10 horas, sugerindo que a eDCS, facilitou a memória operacional espacial de longa duração avaliada no labirinto radial de 8 braços nos três intervalos de retenção promovendo uma facilitação da memória operacional espacial dos animais submetidos a eDCS.

Adicionalmente, além de demonstrar os efeitos de facilitação obtidos pela técnica, o presente estudo constatou que tais efeitos permaneceram mesmo após várias horas, ampliando nossos conhecimentos sobre a duração dos efeitos da estimulação cerebral por corrente contínua de baixa intensidade, o que se caracteriza em mais um importante dado sobre os mecanismos subjacentes à técnica desenvolvida.

5.1. Desenho experimental: Intensidade da corrente

Em nosso estudo, utilizamos a corrente de 400 μ A aplicada acima da duramater para avaliar os efeitos de uma estimulação cerebral mais focalizada e com menor perda de corrente, e seus efeitos nas funções cognitivas dos animais.

Esta é uma intensidade de corrente inferior ao que tem sido usualmente empregada na clínica e nas investigações em seres humanos. Entretanto, Takano et al. (2011), realizaram um experimento em modelo animal utilizando ressonância magnética funcional (fMRI) para avaliar a efetividade da estimulação transcraniana por corrente contínua (tDCS) em ativar áreas corticais através de estimulação anódica. Os autores observaram que uma estimulação transcraniana de 400 μ A aplicada por 10 minutos na região acima do córtex frontal de ratos anestesiados aumentou significativamente a

intensidade do sinal de ressonância magnética no córtex frontal e nucleus accumbens.

Portanto, com base neste estudo e em resultados preliminares de nosso próprio laboratório e, principalmente, considerando-se que estaríamos transferindo uma corrente mais focalizada e com menor perda diretamente sobre a dura mater, julgamos ser esta intensidade satisfatória para os propósitos da presente investigação.

5.2. O labirinto radial de 8 braços

As teorias atuais sobre cognição animal sofreram grande influência de idéias decorrentes da observação de animais desempenhando tarefas em labirintos. Conceitos como memória visuoespacial e grande parte das concepções sobre aprendizagem e memória surgiram no contexto de experimentação em labirintos (Olton, 1979).

O modelo experimental deste estudo utilizou o labirinto radial de 8-braços como paradigma para avaliar a memória operacional espacial em roedores. Com este paradigma foi possível avaliar a habilidade do animal de se guiar pelas orientações espaciais do ambiente para obter alimento.

A versão do labirinto utilizada para a avaliação de memória operacional é a versão espacial. É importante enfatizar que o desempenho adequado em tarefas espaciais requer a presença de estímulos distais que mantenham fixas suas relações uns com os outros, e que apresentem fácil discriminação e visualização a partir do labirinto. Para desempenhar a tarefa nesse tipo de labirinto, o animal deverá utilizar pistas visuais que se encontram localizadas externamente ao labirinto para mapear o ambiente e poder distinguir a exata localização dos braços a serem visitados. Deste modo, os animais podem discriminar os braços já visitados e armazenar essa informação em uma memória transitória (memória operacional). O labirinto radial de 8 braços

portanto, permite avaliar as características visuoespaciais da memória operacional (Olton, 1979).

Segundo Olton e Samuelson (1976), neste modelo os roedores não utilizam variáveis como odores, dicas de comida e/ou respostas em cadeia para resolver a tarefa, mas basicamente se utilizam de suas capacidades de memória para informações sobre localização espacial. Por isso, alguns cuidados adicionais foram realizados no aparato, como pistas visuais do ambiente sempre alocadas na mesma posição; limpeza do labirinto a cada treino e sala iluminada na mesma intensidade, som de fundo e temperaturas constantes nas sessões de treinamento para evitar que qualquer mudança no ambiente pudesse interferir no desempenho dos animais.

Para o desempenho de tarefas no labirinto radial de 8 braços são diferenciados dois tipos de memória: a memória de referência (ou procedimentos) e a memória operacional (ou de trabalho). A memória de referência armazena informações que independem do contexto, sendo de ocorrência freqüente. Por exemplo, saber que há apenas um pedaço de amendoim (reforço) em cada braço em uma dada sessão e que a repetição de braços já visitados implica em não reforçamento. Já a memória operacional é responsável pela manutenção temporária da informação sobre a localização dos braços já visitados, o que é específico para uma sessão, não tendo utilidade em sessões subseqüentes (Olton et al., 1977 apud Rodrigues, 2006).

A capacidade de armazenar temporariamente uma informação que seja necessária para realização de tarefas que incluam pensamento, raciocínio e planejamento é uma das características principais da memória operacional (Baddeley, 1983; 1997; Goldman-Rakic, 1996). Essa capacidade é semelhante aos processos que são mensurados por tarefas com retardo (Goldman-Rakic, 1990).

Entretanto, manipulações nos procedimentos podem ser realizadas de modo que o teste se torne mais sensível a um ou outro tipo de memória. Para a avaliação da memória operacional, por exemplo, a introdução de um intervalo de retenção entre um determinado número de braços permite a avaliação satisfatória de diferentes extensões da memória operacional espacial no

labirinto radial (Olton, 1987; Mizumori et al., 1987; Levin, 1988). Os intervalos de retenção (retardos) podem ser curtos (segundos), podendo ser verificada uma memória operacional de curso breve, ou mais prolongado (horas), que estaria avaliando uma memória operacional de longa duração (Nakamura et al., 1991; Nakamura-Palacios et al., 1996; Nakamura-Palacios e Roelke, 1997; Oliveira e Nakamura-Palacios, 2003 *apud* Rodrigues, 2006). Nos experimentos realizados neste estudo os retardos utilizados foram de 1 h, 4 h e 10 h.

Determinados autores questionam o uso do termo “memória operacional de longa duração” para os resultados obtidos em intervalos acima de segundos. Segundo eles, neste momento o que estaria sendo avaliada seria não mais a memória operacional (restrita a eventos de curto prazo, da ordem de segundos), mas sim uma memória de longo prazo.

No entanto, a memória operacional é melhor definida levando em consideração não sua natureza temporal, mas seu aspecto funcional (Fuster, 1991). Após a realização da primeira parte da sessão (pré-retardo ou primeira corrida), o animal deverá permanecer com a informação ativa (“on line”) sobre os braços já visitados até a realização da segunda parte da sessão (o pós-retardo ou segunda corrida), que poderá ocorrer horas depois. Somente após o término da tarefa é que essa informação será descartada, não influenciando na sessão seguinte. A informação sobre aquela dada sessão não foi, portanto, consolidada. Isso demonstra que testes com retardos de horas podem ser considerados avaliações de memória operacional espacial de duração prolongada (Rodrigues, 2006).

5.3. Sítio neuroanatômico de implantação dos eletrodos

Em primatas, o córtex pré-frontal dorsolateral (CPF_{DL}) é o sítio neuroanatômico de várias funções cognitivas complexas, incluindo a memória operacional (Goldman-Rakic, 1996). Diferentes grupos de pesquisadores se questionavam se haveria uma correspondência funcional entre a parte dorsolateral do CPF de primatas não humanos e o CPF de ratos. Brown e

Bowman (2002), correlacionando os achados de diversas pesquisas envolvendo o CPF de primatas e roedores, sugerem que a parede medial do CPF do rato (CPFm) é uma área não-diferenciada que possuiria as funções cognitivas encontradas no CPFDL de primatas e, portanto, seria útil na investigação dos processos cognitivos pré-frontais.

Ainda, Rose e Woolsey (1948) definem o CPF de roedores como a região que recebe maciças projeções do núcleo dorso medial do tálamo. Neste estudo, após medidas específicas a partir do bregma realizadas na cirurgia estereotáxica e, análise histológicas de fatias dos cérebros dos animais extraídos do Atlas de Paxinos e Watson (1986), observou-se que os eletrodos foram implantados sobre a região do cíngulo anterior dorsal (ou Cg1) e a região pré-límbica (PrL ou Cg3).

Alguns autores consideram apenas a área pré-límbica (PrL ou Cg3) como o verdadeiro CPF de ratos (Condé et al., 1995; Preuss, 1995), por entenderem que essa área seria aquela que recebe o maior contingente de aferências do núcleo dorso medial do tálamo. Entretanto, diversos estudos demonstraram que outras regiões, como a região dorsal do cíngulo anterior (Cg1) e a região do córtex frontal (Fr2) são de fato parte integrante da porção medial do CPF (CPFm), pois também recebem maciças projeções do núcleo dorso medial do tálamo (Groenewegen, 1988; Uylings e Van Eden, 1990; Vertes, 2002; Uylings et al., 2003). Dessa forma, essas regiões tornam-se apropriadas para investigação de funções executivas pré-frontais, como a memória operacional espacial.

Estudos de conexão também contribuem para a semelhança de características entre o CPFDL de primatas e o CPFm de roedores (Uylings et al., 2003). Tanto em roedores quanto em primatas, os circuitos que envolvem áreas do CPF são caracterizados por aferências (“inputs”) do corpo amigdalóide. Em ratos, tanto a parte dorsal do AC (ACd) quanto a região Fr2 do CPF (CPFm) recebem poucas aferências do corpo amigdalóide, o que também acontece com o CPFDL de primatas (Groenewegen et al., 1997 *apud* Rodrigues, 2006).

Portanto, por suas características funcionais pode-se correlacionar o CPFDL de primatas ao CPFm de roedores, o que é de relevância nos estudos de investigação de memória operacional espacial e permite ainda uma extensão dos resultados apresentados neste estudo para espécies superiores como primatas.

5.4. A estimulação cerebral e os processos de aprendizagem e memória

Os dados obtidos em nosso estudo estão de acordo com resultados observados em diversos estudos clínicos que mostraram uma melhora no desempenho de testes de memória operacional em indivíduos submetidos a estimulação transcraniana por corrente contínua (tDCS) anódica do CPF.

Mulquiney et al. (2011) observaram que a tDCS anódica sobre o CPFDL melhorou o desempenho de voluntários saudáveis no teste de memória operacional com letras (*2-back letter working memory paradigm*), utilizado para avaliar a memória operacional. Resultados semelhantes aos encontrados previamente por Fregni et al. 2005, quando avaliaram 15 voluntários submetidos ao teste de memória operacional com letras (*3-back letter working memory paradigm*) e os resultados indicaram que a tDCS anódica no CPFDL esquerdo melhora o desempenho na tarefa de memória operacional quando comparada aos indivíduos controle.

Ainda, em um artigo recém publicado, pesquisadores avaliaram os efeitos da tDCS em voluntários desempenhando testes de memória operacional, bem como a atividade neural adjacente, particularmente avaliando os efeitos da tDCS sobre o CPFDL esquerdo durante o teste “*2-back*” e a atividade neural durante a realização do mesmo. Os resultados mostraram que a tDCS alterou a atividade cortical associada a memória operacional em sincronia com as alterações sistemáticas no desempenho dos indivíduos nos testes, demonstrando os efeitos neuromodulatórios da tDCS sobre a atividade cortical e sua significância funcional (Zaehle et al. 2011).

Semelhante aos efeitos fisiológicos observados em humanos, foi demonstrado em ratos saudáveis que a estimulação cerebral por corrente contínua induz mudanças prolongadas sobre o fluxo sanguíneo cerebral, avaliado por fluxometria a laser com Doppler, sendo essas alterações dependentes da duração e da intensidade da corrente aplicada e possui um efeito polaridade-específico, uma vez que a aplicação da estimulação anódica levou a um aumento enquanto a catódica levou a uma inibição do fluxo sanguíneo cerebral (Wachter et al., 2011).

Ainda, em humanos, a estimulação cerebral afeta os potenciais motores evocados (MEPs) que refletem a modulação da excitabilidade motora, pela facilitação após a estimulação anódica e pela supressão após a estimulação catódica (Nitsche e Paulus, 2000). Experimentalmente, Cambiaghi et al. (2010) demonstraram o mesmo efeito em camundongos saudáveis, nos quais a estimulação anódica aumentou os MEPs, enquanto a estimulação catódica inibiu a atividade motora, validando assim esses ensaios pré-clínicos aplicados em roedores para investigação dos efeitos induzidos pela estimulação cerebral na modulação e plasticidade cerebral, assim como no aprimoramento da técnica para aplicação terapêutica.

Com relação ao efeito da estimulação cerebral utilizando modelos patológicos em ratos, foi observado que a estimulação anódica induz um efeito neuroprotetor em modelo de isquemia cerebral permanente, melhorando o desempenho motor dos animais e reduzindo o dano axonal na cápsula interna do hemisfério infartado, sem interferir com o tamanho da lesão (Nandi et.al. 2008).

Liebetanz et. al. (2006) demonstraram que a estimulação catódica induz efeito anticonvulsivante em um modelo de epilepsia focal induzida por estimulação cortical gradual, sendo que a magnitude e a duração do efeito dependem da duração da estimulação e da intensidade da corrente. Os estudos utilizando estimulação cerebral por corrente contínua em animais demonstram que essa técnica induz efeitos semelhantes aos observados em humanos, que são polaridade e intensidade-dependentes. .

Como citado anteriormente, Takano et al. (2011), observaram utilizando ressonância magnética funcional (fMRI), o aumento da intensidade de sinal no córtex frontal e no núcleo accumbens de ratos após a estimulação cerebral anódica na intensidade de 400 μ A aplicada por 10 minutos na região acima do córtex frontal de ratos anestesiados.

Em nosso estudo, utilizamos a corrente de 400 μ A aplicada acima da duramater para avaliar os efeitos de uma estimulação cerebral mais focalizada e com menor perda de corrente e seus efeitos nas funções cognitivas dos animais, e apesar das diferenças metodológicas do nosso protocolo, os dados encontrados corroboram os resultados dos estudos prévios no que diz respeito a uma melhora no desempenho dos animais submetidos a estimulação epidural na intensidade de 400 μ A por 11 minutos em tarefas relacionadas a memória operacional.

Segundo Andrews et al. (2011), uma hipótese para a melhora no desempenho em testes de memória operacional de indivíduos submetidos a estimulação anódica pode ser relacionada ao mecanismo de LTP. Em uma revisão da literatura, Floel e Cohen sugeriram que a estimulação cortical em combinação com o treinamento da memória, pode otimizar o desempenho via LTP. De fato, sabe-se que a tDCS fortalece as conexões sinápticas induzindo LTP, e os efeitos a longo prazo da técnica dependem de modificações na eficácia dos receptores NMDA (Liebetanz et al., 2002) bem como da síntese de proteínas acompanhada por modificações nos níveis intracelulares de cAMP e Ca^{2+} (Nitsche et al., 2008).

5.4.1. LTP

Entre os vários tipos de plasticidade sináptica que ocorrem no Sistema Nervoso, a Potenciação de Longa Duração (LTP) e a Depressão de Longa Duração (LTD), que são fenômenos caracterizados por aumento ou redução na eficácia da comunicação sináptica, respectivamente, são os principais correlatos moleculares dos processos de aprendizado e memória.

A LTP pode ser definida como um aumento persistente da eficácia sináptica, desencadeado por um estímulo tetânico em uma via sináptica específica. Após uma série de eventos bioquímicos nos terminais pré e/ou pós-sinápticos, esse estímulo promove o aumento da eficiência de transmissão sináptica naquela via, ou mesmo, em uma via associada (Bliss e Collingridge, 1993; Mcnaughton, 1978; Levy e Steward, 1979).

A LTP ocorre em várias áreas do cérebro e pode ser distinguida com base em sua dependência ou não de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA (receptores N-metil-D-aspartato) (Chen e Tonegawa, 1997).

O hipocampo é uma estrutura cortical, envolvida na formação da memória em mamíferos onde primeiro se identificou o fenômeno de LTP. No hipocampo, a indução da LTP somente se realiza quando um estímulo de alta frequência ativa simultaneamente o neurônio pré e pós-sináptico, envolvidos em uma via de transmissão, como postulado por Hebb. Esse tipo de estímulo é necessário para a ativação de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA no neurônio pós-sináptico (Malenka, 1994).

Sabe-se que receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) também localizam-se no neurônio pós-sináptico (Malenka, 1994). Durante a estimulação de baixa frequência, somente os receptores AMPA contribuem para a despolarização do neurônio pós-sináptico. Os receptores NMDA, em tais condições, mantêm-se fechados e impermeáveis à entrada de Ca^{2+} e Na^+ . O estímulo de baixa frequência não é competente para retirar o bloqueio produzido pelo íon magnésio, que, constitutivamente, bloqueia seu canal, mesmo com a ligação do glutamato em seu sítio receptor. O desbloqueio do canal é operado por voltagem. Somente quando o agonista está ligado ao receptor e a célula está suficientemente despolarizada, ele se abre (Malenka, 1994; Collingridge et al., 1991). Portanto, na estimulação de alta frequência, tanto receptores AMPA quanto NMDA estarão ativados e contribuindo para a resposta pós-sináptica, enquanto que, em estímulos de baixa frequência, somente se ativam os receptores AMPA.

Estudos utilizando antagonistas de receptores NMDA mostram um bloqueio na indução da LTP, aumentando, assim, as evidências da participação desses receptores no processo (Collingridge et al, 1990). A aplicação de EGTA (um quelante de Ca^{2+}) no neurônio pós-sináptico inibe a indução da LTP, indicando a importância do Ca^{2+} na iniciação do fenômeno (Schottler et al., 1983). Além disso, técnicas experimentais de imagem, através do uso de corantes especiais, permitem demonstrar o aumento da concentração de Ca^{2+} nos espinhos dendríticos pós-sinápticos, após a indução de LTP (Muller e Connor, 1991).

Além do Ca^{2+} provindo da ativação dos receptores NMDA, a ativação de canais de Ca^{2+} operados por voltagem e de estoques intracelulares de Ca^{2+} , devem contribuir para o alcance da concentração necessária ao disparo da LTP. A liberação de Ca^{2+} , dos estoques intracelulares, seria ativada pelo próprio íon (via receptor NMDA) e por moléculas de IP3 (inositol trifosfato) liberadas durante a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópico - mGlu (Bliss e Collingridge, 1993).

Em resumo, o aumento da resposta pós-sináptica gerada pode ser o resultado da ação final de vários compartimentos:

1. **modificações pré-sinápticas:** na quantidade de L-glutamato liberado por impulso;
2. **modificações pós-sinápticas:** aumento no número de receptores pós-sinápticos ou alterações em suas propriedades funcionais;
3. **alterações extra-sinápticas:** redução na recaptação de L-glutamato pelas células gliais, aumentando a disponibilidade do neurotransmissor;
4. **alterações morfológicas.**

A indução da LTP, no terminal pós-sináptico, envolve uma intrincada cascata de eventos bioquímicos.

Ao longo do processo, as proteínas quinase II dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase A (PKA) estão envolvidas em uma série de reações bioquímicas. As duas primeiras já são conhecidas por serem ativadas de uma maneira dependente de receptor NMDA através de estimulação tetânica (Malenka et al, 1994). A PKA, por sua vez, é ativada na presença de altos níveis de cAMP, gerados pela ação da enzima adenilato ciclase, existentes durante a LTP (Sublette, et al., 1993). Inibidores dessas enzimas são capazes de reduzir e/ou impedir a LTP (Bliss e Collingridge, 1993). O mesmo ocorre em animais que apresentam ausência da expressão do gene para CaMKII (Wang et al., 1992). Esta enzima, quando ativada por Ca^{2+} /calmodulina, se autofosforila, adquirindo atividade permanente, a qual, somada com a de outras quinases, pode explicar a manutenção da LTP por períodos prolongados (Lisman e Goldring, 1988).

Considerando que a LTP tenha um tempo de duração longo, porém variável, tem-se suposto que aquelas formas mais curtas utilizam, para a sua manutenção, proteínas quinases já sintetizadas, enquanto as formas mais longas, envolveriam, além disso, a ativação da expressão gênica dessas enzimas (Bliss e Collingridge, 1993).

A entrada de grandes quantidades de Ca^{2+} via receptor NMDA, além do Ca^{2+} o provindo dos estoques intracelulares e dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem, ativa a calmodulina. Essa proteína que é modulada por Ca^{2+} , interage com a proteína quinase CaMKII, ativando-a. A CaMKII, por sua vez, pode atuar, modificando a cinética de receptores AMPA, aumentando sua condutância ao Na^+ ou sua afinidade pelo L-glutamato, incrementando a resposta pós-sináptica a estímulos subseqüentes e conseqüente LTP (Malenka, 1994).

Outra quinase possível de executar a fosforilação de receptores AMPA é a PKA, visto que esses receptores, em sua seqüência primária, possuem uma série de regiões candidatas a serem sítios de fosforilação da citada enzima (Bliss e Collingridge, 1993). A ação da PKA mantém ativo o inibidor da proteína fosfatase I, sendo um evento importante para a manutenção da LTP, já que a

proteína fosfatase I antagoniza o efeito da LTP, favorecendo a LTD. Isso se dá pela desfosforilação de quinases (Malenka et al., 1994).

Os eventos moleculares, desencadeados pela LTP, podem aumentar o número de receptores AMPA no neurônio pós-sináptico, ativando sua expressão gênica (Seeburgh et al., 1992). Também poderiam modificar o processamento pós-traducional das cadeias polipeptídicas, constituintes do citado receptor, facilitando a produção de um receptor AMPA com cinética mais rápida (Bliss e Collingridge, 1993).

No terminal pós-sináptico, a PKC também pode fosforilar os receptores NMDA, diminuindo sua susceptibilidade ao bloqueio por íons Mg^{2+} (Chen e Huang, 1992). Outras substâncias, como o IP3 e ácido araquidônico (AA), liberadas pela ativação dos receptores mGlu, podem potencializar a função dos receptores NMDA (Attwell, 1992; Markran e Segal, 1992). Essas modificações seriam responsáveis pelo aumento da eficiência de transmissão sináptica em uma determinada via neuronal.

Durante muito tempo, foi discutido se o aumento da eficiência na transmissão sináptica, levada a termo pela LTP, ocorreria apenas no terminal pós-sináptico, ou somente no terminal pré-sináptico. Apesar de ainda haver controvérsias, o mais aceito é que as modificações ocorram em ambos os terminais (Bliss e Collingridge, 1993).

A possibilidade de modificações pré-sinápticas, sugere a existência de mensageiros retrógrados, que, produzidos ao nível pós-sináptico, atingiriam o terminal pré-sináptico, promovendo alterações que levariam à LTP.

Os mensageiros, no terminal pré-sináptico, aumentariam a quantidade de neurotransmissor liberado a cada impulso e também poderiam inibir a recaptação de glutamato em células gliais (Bliss e Collingridge, 1993).

Dois candidatos a mensageiros retrógrados são o óxido nítrico (NO) e o AA.

Suspeita-se que o mensageiro retrógrado aumente a liberação do NT através da manutenção de elevadas concentrações de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico, durante a LTP (Lynch Ma e Voss, 1991). Outra possibilidade seria um maior influxo de Ca^{2+} por potencial de ação (Bliss e Collingridge, 1993) e/ou um aumento da afinidade da maquinaria celular pelo Ca^{2+} (Lynch e Bliss, 1986).

Surpreendentemente, a LTD, como a LTP, também é disparada pela entrada de Ca^{2+} na região pós-sináptica pelo receptor NMDA. A diferença-chave que determina o desencadeamento de um ou outro fenômeno está no nível de ativação do receptor NMDA.

Uma vez que ambos os eventos são dependentes de Ca^{2+} , o que define se uma via sináptica produzirá LTP ou LTD é a frequência do estímulo, e o aumento correspondente da concentração desse íon. Em concentrações baixas de Ca^{2+} haverá LTD, e, em concentrações altas, LTP (Bliss e Collingridge, 1993).

Se após estímulo, altas concentrações de Ca^{2+} se estabelecerem no terminal pós-sináptico, o íon ligado à calmodulina ativará enzima adenilato ciclase (AC). A AC, por sua vez, produzirá grandes quantidades de cAMP, ativando a PKA. Esta última fosforila o inibidor da fosfatase I, impedindo a LTD e facilitando a LTP. No entanto, se a concentração de Ca^{2+} , atingida no terminal, for apenas baixa, o complexo Ca^{2+} e calmodulina ativará a enzima calcineurina.

A calcineurina desfosforila o inibidor da fosfatase I, permitindo que esta atue sobre proteínas como a CaMKII, impedindo a LTP e facilitando a LTD (Malenka, 1994).

5.4.2. A LTP e a Pasticidade sináptica no Neocortex

Plasticidade sináptica com propriedades muito similares as descritas acima para o hipocampo são encontradas no neocórtex e são comumente referidas como plasticidade tipo-LTP (Stagg e Nitsche, 2011).

Por exemplo, a plasticidade associada ao aprendizado motor e que está associada com a reabilitação de lesões induzidas experimentalmente em ratos ocorre em conexões horizontais no córtex motor primário (Stagg e Nitsche, 2011).

A indução de tais processos no neocórtex assim como no restante do cérebro, depende criticamente de mudanças em receptores NMDA de interneurônios glutamatérgicos. Comparados com os mecanismos nas demais regiões cerebrais, estudos com preparações de tecidos, mostram que a LTP neocortical só pode ser induzida de forma robusta reduzindo-se também o tonus local GABAérgico, e a administração de agonistas GABAérgicos antes da estimulação em um estudo com ratos aboliu a indução da LTP (Trepel e Racine, 2000).

Recentemente alguns estudos vêm sendo realizados no intuito de modular os processos cerebrais envolvidos na plasticidade sináptica através da modulação da excitabilidade cortical pela utilização de técnicas de estimulação cerebral de regiões cerebrais, com o objetivo de tratar diversas patologias e melhorar determinadas funções corticais.

Nesta contexto, a estimulação por corrente contínua tem demonstrado a capacidade de modificar o microambiente sináptico, através da modulação da força sináptica dependente de receptor NMDA ou da modulação da atividade GABAérgica. Ou ainda, através da modulação de neurônios córtico-espinhais e intracorticais. Os efeitos desta técnica são similares aos observados pela LTP, como mostrado em um estudo recente realizado com animais onde a utilização da técnica sobre o córtex motor provocou um aumento duradouro nos potenciais pós-sinápticos excitatórios (Brunoni et al., 2011).

Os efeitos da estimulação cerebral por corrente contínua podem ser, em um primeiro momento, divididos em função do momento de aplicação da corrente. Durante o período de aplicação da corrente elétrica se observam efeitos

essencialmente neuromodulatórios. Após cessada a aplicação, seus efeitos são essencialmente neuroplásticos (Brunoni, Pinheiro e Boggio, 2012).

Na primeira fase (neuromodulação propriamente dita), o efeito da estimulação está relacionado a modulação do potencial de repouso da membrana neuronal. Tal efeito, já havia sido descrito nos anos 50 em estudos com estimulação elétrica aplicada sobre o tecido cerebral de animais de diferentes espécies (Brunoni, Pinheiro e Boggio, 2012).

Terzuolo e Bullock (1956) investigaram os efeitos da aplicação de corrente elétrica na modulação do disparo neuronal. Com essa finalidade, os autores mediram os efeitos da estimulação catódica e anódica de células nervosas em crustáceos *Cambarus clarkii* e *Panulirus interruptus*. Os autores verificaram aumento no disparo espontâneo após a estimulação com corrente anódica e redução após a catódica.

Purpura e McMurtry (1964) realizaram estudos com gatos e observaram em células do trato piramidal, os efeitos no disparo espontâneo após a aplicação de corrente contínua anódica ou catódica. A densidade da corrente aplicada variou de 30 a 400 μ A. Os autores verificaram aumento da atividade neuronal espontânea após a passagem de corrente anódica e redução após a catódica.

Na fase moderna e atual dos estudos sobre estimulação cerebral, tais observações passaram a ser investigadas em estudos utilizando-se, concomitantemente com a estimulação cerebral por corrente contínua, drogas bloqueadoras dos canais de sódio e cálcio, assim como drogas agonistas e antagonistas de receptores NMDA. No caso das drogas bloqueadoras de canais de sódio e cálcio, observou-se inibição dos efeitos da estimulação anódica, enquanto bloqueadores pós-sinápticos dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA ou agonistas de receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) não interferiram neste processo, demonstrando que o efeito agudo, periestimulatório, varia de acordo com o estado de polarização da membrana neuronal (Islam, 1995).

Por outro lado, no período pós-estimulatório, as sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas são fundamentais na indução da neuroplasticidade associada

a estimulação cerebral. Estudos subseqüentes observaram que os efeitos de longa duração também dependem de síntese protéica e alterações dos níveis de cálcio e AMPc (Islam 1995).

.Como citado acima, supõe-se que os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos duradouros da estimulação cerebral sejam similares a LTP, forma de neuroplasticidade em que há, essencialmente, facilitação da transmissão sináptica (Nitsche, 2003; Cooke, 2006). Estudos farmacológicos demonstraram que a estimulação cerebral por corrente contínua também atua no ambiente sináptico, alterando a atividade GABAérgica e glutamatérgica (Nitsche 2005). Por exemplo, em um desses estudos, a administração de dextrometorfana, antagonista do receptor NMDA, causou supressão dos efeitos de ambos os tipos de estimulação (anódica e catódica), enquanto o uso de D-ciclosserina, um agonista NMDA, potencializou de maneira seletiva a plasticidade facilitatória após a estimulação. Resultados semelhantes foram demonstrados com GABA-agonistas, como os benzodiazepínicos, os quais aboliram os efeitos excitatórios da estimulação (Trepel e Racine, 2000), sugerindo o papel-chave de ambos na plasticidade induzida por corrente contínua.

A atividade GABAérgica também mostrou influencia na estimulação neuronal. Acredita-se que em um ambiente onde a atividade dos receptores GABAérgicos esteja inibida, a ativação dos receptores glutamatérgicos (NMDA) ocorra de forma mais efetiva. A ativação de receptores NMDA resultaria, portanto, no aumento da concentração intracelular de cálcio no neurônio pós-sináptico. Como citado acima, diferentes níveis de ativação de receptores NMDA resultam em vários níveis de influxo de cálcio. Dessa forma, pequeno influxo de cálcio pós-sináptico levaria a LTD, enquanto influxo mais expressivo acarretaria LTP (Lisman, 2001).

Os efeitos da estimulação podem não estar unicamente relacionados com alterações no potencial de membrana neuronal. Por exemplo, alguns estudos sugerem que a técnica pode alterar a conformação de proteínas transmembrana, o que seria induzido pela exposição ao campo elétrico (Ardolino, 2005).

Devido a isso, publicações mais recentes costumam inferir efeito químico e não químico integrado: aumento da produção de proteínas, aumento do nível intracelular de cálcio, e expressão gênica precoce durante, e após a estimulação (Stag e Nitsche, 2011). Também vale citar os efeitos extra-neuronais causados por essa técnica no sistema nervoso central, como vasodilatação e elevação da temperatura dentro dos limites fisiológicos (Merzagora, 2010).

Portanto, diferentemente de outras técnicas de estimulação, a estimulação por corrente contínua direta não deflagra diretamente potenciais de ação, mas altera o ambiente da rede neuronal, diminuindo ou aumentando a suscetibilidade de disparo do neurônio ou sua resposta diante de impulsos sinápticos aferentes. Assim sendo, os mecanismos de ação desta técnica baseiam-se não apenas em fatores neuronais sinápticos e não-sinápticos, mas também em outros componentes do sistema nervoso central (Brunoni, Pinheiro e Boggio, 2012).

5.5. Segurança do uso da estimulação cerebral por corrente contínua

A maior parte dos estudos sobre o uso da estimulação cerebral tanto em humanos quanto em animais foi desenvolvida utilizando-se a tDCS. Até o momento atual, nenhuma pesquisa clínica apresentou dados de efeitos colaterais produzidos pela tDCS (Nitsche e Paulus, 2004; Nitsche et al., 2003; Boggio, 2006).

Entretanto, critérios sobre a utilização de corrente contínua aplicada sobre o escalpe devem ser investigados e utilizados para garantir a segurança da aplicação.

Alguns elementos e parâmetros relativos à estimulação por corrente contínua devem ser levados em consideração (Boggio, 2006):

1) Intensidade de corrente aplicada: i (mA);

2) Duração da sessão de estimulação: t (seg);

3) Tamanho do eletrodo: A (cm²);

4) Densidade da corrente: i/A (mA/cm²);

5) Carga total aplicada: (i/A)*t

No artigo de Paulus et al. (2003), os autores mencionam que, segundo McCreery et al. (1990), no que tange a tDCS, um bom parâmetro para verificar a segurança da técnica é a densidade de corrente. Segundo McCreery et al. (1990) em estudos com animais, densidades de corrente inferiores a 25mA/cm² não induzem lesões no tecido cerebral, mesmo quando aplicadas por horas e com frequências elevadas.

Em relação ao presente estudo, o valor da densidade da corrente é de 0,20 mA/cm² (i= 0,4 mA e A= 1,96 cm²) ou seja, bem abaixo do valor observado por Yuen et al. (1981).

Nossos cálculos levam em consideração a estrutura circular do eletrodo que utilizamos. Uma vez que:

Área de um círculo = πr^2

Como o raio é ½ do diâmetro, temos que r = 2,5 mm.

Assim, a área seria de 19,63 mm² ou 1,96 cm².

Como i = 400 μ A = 400 x 10⁻³ mA = 0,4 mA

E densidade = i/A = 0,4 mA/1.96 = 0,20 mA/cm² ou 20,37 μ A/mm²

Estudos clínicos de neuroimagem indicaram que tanto a tDCS anódica quanto a catódica (1 mA aplicado por 13 e 9 minutos respectivamente) no córtex motor de voluntários não induziram mudanças estruturais do tecido cerebral nem causaram alterações na barreira hemato-encefálica (Nitsche et al., 2004).

Considerando a segurança da aplicação clínica da técnica, estudos mostram que uma intensidade de estimulação de cerca de 2 mA e duração de 20 minutos é considerada segura (Nitsche et al., 2003, Iyer et al., 2005).

Uma questão levantada no andamento do nosso estudo foi em relação a formação de eletrólise ou modificação protéica nos tecidos cerebrais, uma vez que a corrente foi aplicada diretamente sobre a duramater, o que poderia levar a lesões teciduais. No entanto, essa hipótese foi descartada pela observação comportamental dos animais, que apresentaram uma melhora no desempenho de tarefas cognitivas em relação aos animais que não receberam a estimulação e, principalmente, pela observação histológica da região cerebral estimulada que não mostrou nenhum tipo de lesão cerebral nos animais utilizados no estudo.

É importante lembrar que a estimulação por corrente contínua direta, ao contrário de outros tipos de estimulação cerebral, não induz disparo neuronal de forma direta, e é improvável que os parâmetros normalmente utilizados atinjam níveis de excitotoxicidade, mesmo em protocolos em que a sessão de estimulação seja longa (Nitsche, 2008).

5.6. eDCS - O modelo desenvolvido

O modelo desenvolvido pioneiramente para este estudo por nosso laboratório sob a supervisão da Prof^a Dra Ester Miyuki Nakamura Palacios e em colaboração com o Prof. Dr Felipe Fregni da *Harvard Medical School*, se apresentou como um modelo promissor para a investigação dos efeitos da estimulação por corrente contínua de baixa intensidade sobre o córtex cerebral.

Como em todo estudo pioneiro, foram encontradas várias dificuldades de ordem técnica que nos levaram a busca de meios para aperfeiçoar alguns dos procedimentos utilizados inicialmente. A principal intercorrência encontrada foi a durabilidade das próteses utilizadas para fixação do eletrodo de estimulação.

Em um protocolo piloto, utilizamos parafusos confeccionados em material não condutor com 3 mm de diâmetro desenvolvidos especialmente para nosso laboratório para a fixação da prótese cirúrgica. Contudo, no decorrer do

protocolo, um número considerável de animais perdeu a prótese implantada, o que ocasionou uma perda significativa nos dados que dispúnhamos para as análises estatísticas, impossibilitando algumas análises mais completas de nossos dados, embora nossas observações qualitativas tenham apontado para uma tendência positiva no desempenho dos animais no labirinto radial em tarefas de aprendizagem e memória operacional com o uso da técnica, e para a resposta de várias questões relevantes sobre o aperfeiçoamento de nosso protocolo experimental.

Posteriormente, implementamos uma técnica de implantação do eletrodo de estimulação utilizando um aparelho fotopolimerizador de alta potência. Nesta técnica, após o procedimento cirúrgico padrão, o eletrodo era posicionado na região epidural acima do CPFm do animal e uma resina fotopolimerizável era aplicada sobre o eletrodo e a região craniana adjacente, formando uma prótese aderida ao crânio do animal.

Contudo, os materiais utilizados nesta técnica apresentaram uma certa toxicidade, além de uma baixa durabilidade das próteses, ocasionando uma perda considerável de animais, e a busca de novas alternativas.

Em resposta a tais questões técnicas desenvolvemos a metodologia aplicada no presente trabalho, utilizando um fixador constituído de material plástico como descrito na sessão 3. Esse modelo se mostrou eficiente no que diz respeito a durabilidade das próteses e ausência de danos neuronais, alcançando desta forma, o desenvolvimento do modelo almejado para a investigação da questão proposta, possibilitando o andamento do estudo segundo o delineamento experimental desejado.

Embora diversos estudos clínicos estejam sendo desenvolvidos no intuito de fornecer dados para um maior desenvolvimento do uso da estimulação cerebral, existe uma lacuna no que diz respeito aos estudos com animais.

Ainda, os poucos estudos relacionados ao tema utilizam animais anestesiados submetidos a protocolos agudos e não existe nenhum trabalho na literatura relacionado aos efeitos da estimulação cerebral em processos cognitivos.

Uma vez que vários protocolos clínicos utilizam a técnica de forma contínua para tratar uma série de distúrbios relacionados ao Sistema Nervoso Central é de extrema importância entender os mecanismos envolvidos no processo, bem como melhorar a eficácia das técnicas disponíveis.

O uso de modelos animais na pesquisa científica é uma prática que vem sendo criada e aperfeiçoada ao longo dos tempos para contornar obstáculos de ordem ética e de operacionalização na investigação da origem de doenças ou ainda de novas terapias aplicáveis em humanos. A busca do entendimento de fatores etiológicos, mecanismos e tratamento de diferentes doenças, usando outras espécies animais como modelos, trouxe também a difícil tarefa de extrapolação dos resultados obtidos com esses modelos para os seres humanos. Embora estudos pré-clínicos, incluindo experimentos com animais, sejam críticos para o desenvolvimento de novas terapias aplicadas em humanos, a pesquisa translacional ainda enfrenta uma série de aspectos desafiadores, uma vez que estudos animais e humanos podem diferir no que se refere às características das doenças, definição de resultados (especialmente para pesquisa neurológica, que muitas vezes depende de medidas comportamentais), e hipóteses sobre doses ótimas de segurança e eficácia (Fregni, Boggio e Brunoni, 2012).

Apesar dessas diferenças, os modelos animais oferecem sistemas bem controlados e seguros para se explorar os parâmetros de estimulação testados, bem como os efeitos adversos e limites de segurança dos diferentes tipos de estimulação, além do desenvolvimento de novas técnicas e novas metodologias. Dessa forma, o desenvolvimento de modelos animais é fundamental para a avaliação detalhada e para otimização das tecnologias de neuromodulação para uso em humanos.

Embora os resultados existentes até o momento demonstrem a eficácia dos modelos de neuromodulação em diferentes doenças humanas, uma melhor compreensão dos seus mecanismos ainda é necessária, tornando os estudos experimentais em animais ferramentas úteis para se explorar os efeitos biológicos, incluindo a expressão de neurotransmissores e ativação de vias neuronais, o que será o próximo passo do nosso estudo, uma vez que essas

informações não são obtidas com facilidade na prática clínica. Tais estudos, sem dúvida, fomentarão a pesquisa translacional em neuromodulação e assim contribuirão para o desenvolvimento do campo maximizando sua eficácia.

Por todos esses fatores, nosso estudo surge como uma proposta de extrema importância, despontando como o primeiro de uma série de estudos que serão desenvolvidos por nosso laboratório no intuito de elucidar as questões a cerca do mecanismo de ação da estimulação cerebral, seus efeitos a longo prazo sobre a superfície cortical, as alterações nas sinapses e nos neurônios, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos e seus efeitos em processos cognitivos.

6. CONCLUSÃO

- Os resultados apresentados nesse estudo mostraram a viabilidade de um método de estimulação epidural por corrente contínua utilizando-se eletrodos implantados sobre a dura mater com a finalidade de oferecer uma maior focalização de estimulação e uma menor perda de corrente.
- A estimulação epidural por corrente contínua na intensidade de 400 μ A aplicada sobre o CPFm esquerdo de ratos por 11 minutos antes das sessões de teste, facilitou a memória operacional espacial de longa duração após os retardos de 1 hora, 4 horas e 10 horas avaliada no labirinto radial de 8 braços.
- Estes resultados sugerem que o CPFm, está envolvido nos efeitos de facilitação da eDCS sobre a memória operacional de ratos.
- A estimulação epidural por corrente contínua na intensidade utilizada não provocou a formação de qualquer tipo de lesão na camada de neurônios subjacente ou na região do CPFm esquerdo.
- Os resultados existentes até o momento demonstram a eficácia dos diferentes modelos de neuromodulação em diferentes doenças humanas, porém, uma melhor compreensão dos seus mecanismos ainda é necessária, tornando os estudos experimentais em animais ferramentas úteis para se explorar os parâmetros de estimulação testados, os efeitos adversos e limites de segurança dos diferentes tipos de estimulação, além do desenvolvimento de novas técnicas e novas metodologias.

7. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelovich A, Paylor R, Chen C, Kim JJ, Wehner JM, Tonegawa S. PKC mutant mice exhibit mild learning deficits in spatial and contextual learning. *Cell*, 75: 1263-1271, 1993.

Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology. 6^a ed., McGraw-Hill, Inc., New York, U.S.A., 1997.

Alvarez JA, Emory E. Executive function and the frontal lobes: A meta-analytic review. *Neuropsychology Review*, 16: 17-42, 2006.

Andrews SC, Hoy KE, Enticott PG, Daskalakis ZJ, Fitzgerald PB. Improving working memory: the effect of combining cognitive activity and anodal transcranial direct current stimulation to the left dorsolateral prefrontal cortex. *Brain Stimulation*, 4:84-9, 2011.

Ardolino G, et.al. Non-synaptic mechanisms underlie the after effects of cathodal transcutaneous direct current stimulation of the human brain. *J physiol* 568 (2) 653-663, 2005.

Aujla H, Beninger RJ. Hippocampal-prefrontocortical circuits: Pka inhibition in the prefrontal cortex imparis delayed nonmatching in the radial maze in rats. *Behavioral Neuroscience*, 115: 1204 – 1211, 2001.

Baddeley AD, Logie RH. Working memory: the multiple component model. In: Miyake A, Shah P editors. Models of working memory. *Mechanism of active maintenance and executive control*. New York: Cambridge University Press 28-

61, 1999.

Bashir ZI, Tam B & Collingridge GI. Activation of the glycine site in the NMDA receptor is necessary for the induction of LTP. *Neurosci Lett* 108: 261-266, 1990.

Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW. The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after effects. *J Physiol*, 172:369–382, 1964.

Bliss TYP & Collingridge GL. A synaptic model of memory : long - term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39, 1993.

Blumer D & Benson DF. Personality changes with frontal and temporal lobe lesions. In: Benson, D. F. and Blumer, D. (Eds.), *Psychiatric aspects of neurologic disease* (pp. 151–170). New York: Grune and Stratton, 1995.

Boggio PS. Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre memória operacional e controle motor. 2006. 123f. Tese (Doutorado em Psicologia), USP, São Paulo, 2006.

Boggio PS, Sultani N, Fecteau S, Merabet L, Mecca T, Pascual-Leone A, Basaglia A, Fregni F. Prefrontal cortex modulation using transcranial DC stimulation reduces alcohol craving: A double-blind, sham-controlled study. *Drug Alcohol Depend*, 92:55–60, 2008.

Boggio PS, Zaghi S, Villani AB, Fecteau S, Pascual-Leone A, Fregni F. Modulation of risk-taking in marijuana users by transcranial direct current

stimulation (tDCS) of the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC). *Drug Alcohol Depend*, 112:220-225, 2010.

Brown V, Bowman EM. Rodents model of prefrontal cortical functions. *Trends in Neurosciences*, 25:340-343, 2002.

Brunoni AR, Pinheiro FS; Boggio OS. Estimulação transcraniana por corrente contínua. In FREGNI, F (Org.). Neuromodulação terapêutica: princípios e avanços da estimulação cerebral não invasiva em neurologia, reabilitação, psiquiatria e neuropsicologia. São Paulo: Sarvier, p.65-75, 2012.

Brunoni AR, Nitsche MA, Bolognini N, Bikson M, Wagner T, Merabet L, Edwards DJ, Valero-Cabre A, Rotenberg A, Pascual-Leone A, Ferruci R, Priori A, Boggio PS, Fregni F. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): Challenges and futures directions. *Brain Stimulation*, ARTICLE IN PRESS, 2001.

Cambiaghi M, Velikova S, Gonzalez-Rosa JJ, Cursi M, Comi G, Leocani L. Brain transcranial direct current stimulation modulates motor excitability in mice. *Eur. J. Neurosci*, 31:704–709, 2010.

Carter CS, Segalowitz SJ, Van Den Wildenberg WPM, Ridderinkhof KR. Neurocognitive mechanisms of cognitive control: The role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. *Brain and Cognition*, 56: 129-140, 2004.

Chen C, Tonegawa S. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci*, 20:157-84, 1997.

Chen L; Huang LYM. Protein kinase C reduces Mg⁺⁺ block of NMDA-receptors channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356: 521-523, 1992.

Chetkovich DM, Gray R, Johnston D; Sweatt JD. N-Methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca⁺⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6467-6471, 1991.

Cooke SF; BlissTV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129(Pt7): 1659-1673, 2006.

Cummings JL. Frontal subcortical circuits and human behaviour. *Archives of Neurology*, 50: 873 – 80, 1993.

Cummings JL. Anatomic and behavioral aspects of frontal subcortical circuits. In: Grafman J, Holyoak KJ & Boller F. (Eds.), Structure and functions of the human prefrontal cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 769, 1–13, 1995.

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins T. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28:771-784, 2004.

Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda AM, Damasio AR. The return of Phineas Gage: Clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264, 1102-1105, 1994.

Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF & Collingridge GL. GABA_B autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* 349: 609-611, 1991.

Delatour B, Gisquet-Verrier P. Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory? *Behavioral Neuroscience*, 113:941-995, 1999.

D'Esposito M, Ballard D, Aguirre GK, & Zarahn E. Human prefrontal cortex is not specific for working memory: a functional MRI study. *Neuroimage*, 8(3), 274-282, 1998.

Duffy JD & Campbell JJ. The regional prefrontal syndromes: a theoretical and clinical overview. *J Neuropsychiatr*, 6: 379-87, 1994.

Duke LM & Kaszniak AW. Executive functions in degenerative dementias: A comparative review. *Neuropsychology Review* 10: 75-99, 2000.

Erhart EA, Neuroanatomia. 4. Ed. Atheneu Editora São Paulo S.A, 1972

Floel A, Cohen LG. Contribution of noninvasive cortical stimulation to the study of memory functions. *Brain Res Rev*; 53:250-259, 2007.

Floresco SB, Phillips AG. Delay-dependent modulation of memory retrieval by

infusion of a dopamine D₁ agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 115(4), 934-939, 2001.

Fregni F, Boggio OS, Nitsche M, Berman F, Antal A, Feredoes E, Marcolin MA, Rigonatti SP, Silva MTA, Paulus W, Pascual-Leone A. Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Exp Brain Res*, 166: 23–30, 2005^a.

Fregni F, Boggio PS, Mansur CG, Wagner T, Ferreira M J, Lima MC, et. al. Transcranial direct current stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neuroreport*, 16(14), 1551–1555, 2005^b.

Fregni, F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJ, Rocha RR, Natale L, et. al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, 54(12), 3988–3998, 2006^a.

Fregni, F, Boggio PS, Nitsche MA, Marcolin M A, Rigonatti S P, & Pascual-Leone A. Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. *Bipolar Disorders*, 8(2), 203–204, 2006^b.

Fregni F, Boggio PS, Nitsche MA, Rigonatti SP & Pascual-Leone A. Cognitive effects of repeated sessions of transcranial direct current stimulation in patients with depression. *Depression and Anxiety*, 23(8), 482–484, 2006^c.

Fregni F, Thome-Souza S, Nitsche MA, Freedman SD, Valente KD, Pascual-Leone A. A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*, 47:335–42, 2006^d.

Fregni F, Boggio PS, Santos MC, Lima M, Vieira AL, Rigonatti SP, et. al. Non invasive cortical stimulation with transcranial direct current stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21(10):1693–702, 2006^e.

Fregni F, Liebetanz D, Monte-Silva KK, Oliveira MB, Santos AA, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Guedes RCA. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression, *Exp. Neurol.* 204, pp. 462–466, 2007.

Fritsch R, Reis J, Martinowick K, Schambra HM, Ji Y, Cohen LG, Lu B. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron*, 66: 198-204, 2010.

Funahashi, S. Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience*, 139, 251-261, 2006.

Fuster, JM. Network memory. *Trends Neurosci*, 20, 451-459, 1997.

Fuster JM. Cross - modal and cross-temporal association in neurons of frontal cortex. *Nature*, 405: 347-351, 2000a.

Fuster JM. Executive frontal functions. *Experimental Brain Research*, 133: 66-70, 2000b.

Fuster JM. The prefrontal cortex – an update: time is of the essence. *Neuron*, 30: 319-333, 2001.

Fuster JM. Frontal lobe and cognitive development. *Journal of Neurocitology*, 31: 373 – 385, 2002.

Gagliardo A, Mazzotto M, Divac I. Memory of radial maze behavior in pigeons after ablations of the presumed equivalent of mammalian prefrontal cortex. *Behavioral Neuroscience*, 111: 955-962, 1997.

García-Moreno LM, Expósito J, Sanhueza C, Angulo MT. Actividad prefrontal y alcoholismo de fin de semana em jóvenes. *Adicciones*, 20 (3): 271-280, 2008.

George MS, Aston-Jones G. Noninvasive techniques for probing neurocircuitry and treating illness: vagus nerve stimulation (VNS), transcranial magnetic stimulation (TMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS). *Neuropsychopharmacology*, 35(1):301-316, 2010.

Goldman-Rakic P. Circuitry of primate prefrontal cortex and regulation of behaviour by representational memory. In *Handbook of Physiology: the Nervous System*(vol 5). Edited by Plum F, Mountcastle V: American Physiological Society, 373-417, 1987.

Goldman-Rakic PS. Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14: 477 – 485, 1995.

Goldman-Rakic, PS; Muly, EC; Williams, GV. D₁ receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res Rev* 31, 295-301, 2000.

Grafman J & Litvan I. Recognizing the importance of deficits in executive functions. *Lancet* 354: 1921–1923, 1999.

Grant SGN, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*, 258: 1903-1910, 1992.

Gusmão S, Ribas GC, Silveira RL, Tazinaffo U. Localização dos sulcos e giros da face súpero-lateral do cérebro na tomografia computadorizada e na ressonância magnética. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v. 59, n. 1, Mar. 2001.

Islam N. Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain. *Res 684 (2)* 206-208, 1995.

Jerusalinsky D, Qillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I. Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behavioral and Neural Biology*, 61: 107-109, 1994.

Jodar-Vicente M. Funciones cognitivas del lóbulo frontal. *Revista de Neurología*, 39, 178-182, 2004.

Jonides J, Smith EE, Koeppe RA, Awh E, Minoshima S & Mintun MA. Spatial working memory in humans as revealed by PET. *Nature* 363: 623–625, 1993.

Jouandet ML & Gazzaniga MS. Cortical field of origin of the anterior commissure of the rhesus monkey. *Experimental Neurology*, 66: 381-397, 1979.

Kolb B. Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. *Brain Research Reviews*, 8: 65 – 98, 1984.

Levy WB & Steward O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Res* 175: 233-245, 1979.

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*, 125:2238-2247, 2002.

Liebetanz D, Fregni F, Monte-Silva KK, Oliveira MB, Amâncio-dos-Santos A, Nitsche MA, et al. After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. *Neurosci Lett*, 398(1–2):85–90, 2006^a.

Liebetanz D, Klinker F, Hering D, Koch R, Nitsche MA, Potschka H, et al. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. *Epilepsia*, 47:1216–24, 2006^b.

Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, König F, Paulus W, & Nitsche MA. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clinical Neurophysiology*, 120(6), 1161–1167, 2009.

Lisman JE & Goldring MA. Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca⁺⁺/Calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5320-5324, 1988.

Lisman JE. Three Ca²⁺ levels affect plasticity differently: the LTP zone, the LTD zone and no man's land. *J Physiol* 532(2):285, 2001.

Lyer MB, Mattu U, Grafman J, Lomarev M, Sato S, Wassermann EM. Safety and cognitive effect of frontal DC brain polarization in healthy individuals. *Neurology*, 64:872–5, 2005.

Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G & Schottler F. Intracellular injection of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305:719-721, 1983.

Lynch MA & Bliss TYP. On the mechanism of enhanced release of [C14]-glutamate in hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 369: 405-408, 1986.

Lynch MA & Voss KL. Presynaptic changes in the long-term potentiation : elevated synaptosomal calcium concentration and basal phosphoinositide turnover in dentate gyrus. *J Neurochem* 56: 113-118, 1991.

Luria AR. Fundamentos de Neuropsicologia. *Editora da USP*, São Paulo, 1981.

Machado, A.B.M. Neuroanatomia funcional. 3ª ed., Livraria Atheneu Editora, São Paulo, 2000.

Malenka RC. Synaptic plasticity in the hippocampus : LTP and LTD. *Cell* 78: 535-538, 1994.

Malloy PF; Richardson ED. Assessment of frontal lobe functions. In: Salloway SP, Malloy PF & Duffy JD. (Eds.), *The frontal lobes and neuropsychiatric illness* (pp. 125–137). Washington, DC, US: American Psychiatric Publishing, Inc, 2001.

Maren S; Baudry M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: Relationships to learning and memory. *Neurobiology of learning and memory*, 63: 1-18, 1995.

Markran H; Segal M. The inositol 1,4,5-trisphosphate pathway mediates cholinergic potentiation of rat hippocampal neuronal responses to NMDA. *J Physiol (Lond)* 447:513-533, 1992.

Martinez JL; Derrick BE. Long-Term potentiation and learning. *Annu.Rev.Psychol*, 47: 173-203, 1996.

Mazur RF, Ignacio SA, Ferronato T, Koerich G, Vieira S. Avaliação da qualidade dos aparelhos fotopolimerizadores da clínica odontológica da PUC-PR. *Ibero-americana de Odontologia Estética & Dentística*, v. 3, p. 160-8, 2004.

Mcnaughton BL, Douglas RM, Goddard GV. Synaptic enhancement in fascia dentata : cooperativity among coactive afferents. *Brain Res* 15: 277-294, 1978.

McMinn, RMH.. Atlas Colorido de Anatomia Humana. São Paulo: Manole, 1990.

Merzagora AC et.al. Prefrontal hemodynamic changes produced by anodal direct current stimulation. *Neuroimage* 49(3) 2304-2310, 2010.

Miler B, Sarantis M, Traynelis SF & Attwell D. Potentiation of the NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature* 355: 722-725, 1992.

Mottaghy FM, Krause BJ, Kemna LJ, Topper R, Tellmann L, Beu M, Pascual-Leone A, & Muller-Gartner HW. Modulation of the neuronal circuitry subserving working memory in healthy human subjects by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Neurosci Lett*, 280(3), 167-170, 2000.

Müller M & Connor JA. Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca⁺⁺ responses. *Nature* 354: 73-76, 1991.

Mulquiney PG, Hoy KE, Daskalakis ZJ, Fitzgerald PB. Improving working memory: Exploring the effect of transcranial random noise stimulation and transcranial direct current stimulation on the dorsolateral prefrontal cortex. *Clinical Neurophysiology*. Article in press, 2011.

Nakamura-Palacios EM, Benevides MCA, Zago-Gomes MP, Oliveira RWD, Vasconcelos VF, Castro LNP, Silva MC, Ramos P, Fregni F. Auditory event-related potentials (P3) and cognitive changes induced by frontal direct current stimulation in alcoholics according to Lesch alcoholism typology. *Internacional Journal of Neurophychopharmacology* pp1-16, 2011

Nakamura EM, Da Silva EA, Concílio GV, Wilkinson DA, Masur J. Reversible effects of acute and long-term administration of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. *Drug and Alcohol Depend*, 28: 167 – 75, 1991.

Nakamura-Palacios EM, Roelke CE. Effects of acute ou daily administration of diazepam on spatial learning and working memory. *Drug and Alcohol Depend*, 46: 181 – 90, 1997.

Nakamura-Palacios EM. Working Memory and Prefrontal Cortex and Their Relation with the Brain Reward System and Drug Addiction. In: LEVIN, ES (Org.). *Working Memory: Capability, Developments and Improvement Techniques*. New York: NOVA Publishers, p. 109-140, 2011.

Nandi d; Jenkinson N; Stein J; AzizT. The pedunculo pontine nucleus in parkinson's disease: primate studies. *Br J Neurosurg* 22 (Suppl1): S4-8, 2008.

Nitsche, MA & Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology* 57, 1899–1901, 2001.

Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J. Physiol*, 553: 293-301, 2003.

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 Clin Neurophysiol*, 56, 255–276, 2003.

Nitsche MA, Niehaus L, Hoffmann KT, et al. MRI study of human brain exposed to weak direct current stimulation of the frontal cortex. *Clin Neurophysiol*, 115:2419-2423, 2004.

Nitsche MA, Doemkes S, Jarakose T, Antal A, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, Paulus W. Shaping the effects of Transcranial Direct Current Stimulation of the human motor cortex. *J Neurophysiol* , 97, 3109-3117, 2007.

Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, Paulus W, Hummel F, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A. Transcranial direct current Stimulation: state of the art 2008. *Brain Stimul*, 1:206–23, 2008.

Oliveira MG, Kireeff W, Hashizume LK, Bueno OF, Masur J. Ethanol decreases choice accuracy in a radial maze delayed test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 23 (6-7): 547 – 553, 1990.

Olton DS, Collinson C, Werz MA. Spatial memory and radial arm maze performance of rats. *Learning and motivation*, 8: 289 – 314, 1977.

Olton DS. Mazes, Maps, and Memory. *American Psychologist*, 34 (7): 583 – 597, 1979.

Phillips AG, Ahn S, Floresco SB. Magnitude of dopamine release in the medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *The Journal of Neuroscience*, 24 (2): 547 – 553, 2004.

Powell, KB; Voeller, KS. Prefrontal executive function syndromes in children. *J Child Neurol*, 19, 785-797, 2004.

Priori, A. Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged noninvasive modulation of brain excitability. *Clin. Neurophysiol.* 114:589–95, 2003.

Purpura, DP, & McMurtry, JG. Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *Journal of Neurophysiology*, 28, 166–185, 1995.

Reymann KG, Davies SN, Matthies H, Kase H & Collingridge GL. Inhibitors of calmodulin and protein Kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 461:388-392, 1998.

Rodrigues LCM. Envolvimento do sistema dopaminérgico frontal nos efeitos do Delta-9-tetrahydrocannabinol sobre a memória operacional de ratos. 2006. 207f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), UFES, Vitória, 2006.

Sauseng P, Klimesch W, Doppelmayr M, Hanslmayr S, Schabus M & Gruber W R. Theta coupling in the human electroencephalogram during a working memory task. *Neurosci Lett*, 354: 123-126, 2004.

Sbordone RJ. The executive functions of the brain. In: Groth-Marnat, G. (Ed.), *Neuropsychological assessment in clinical practice: A guide to test interpretation and integration* (pp. 437–456). New York, NY, US: John Wiley & Sons, Inc, 2000.

Scktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik M & Sublette E. Persistent activation of the isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8342-8346, 1993.

Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S & Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in α -Calcium-Calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257: 201-206, 1992.

Smith, ED, Jonides, J. Storage and executive processes in the frontal lobes. *Sci* 283, 1657-1661, 1999.

Solinas M, Thiriet N, Chauver C, Jaber M. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Progress in Neurobiology*, 92: 572-592, 2010.

Sommer B, Koller M, Sprengel R & Seeburgh PH. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gate channels. *Cell* 67: 11-19, 1992.

Stagg CJ, Nitsche MA. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *The Neuroscientist*. 17(1): 37-53, 2011.

Stuss DT & Benson DF. Neuropsychological studies of the frontal lobes. *Psychological Bulletin*, 95(1), 3-28, 1984.

Stuss DT, Levine B, Alexander MP, Hong J, Palumbo C, Hamer L, Murphy KJ & Isukawa D. Wisconsin Card Sorting Test performance in patients with focal frontal and posterior brain damage: Effects of lesion location and test structure on separable cognitive processes. *Neuropsychologia* 38: 388–402, 2000.

Takano Y, Yokawa T, Masuda, A Niimi, J Tanaka S, Hironaka N. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci Lett*, 491 (1), 40-43, 2011.

Tekin S, Cummings JL. Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry. An update. *Journal of Psychosomatic Research*, 53: 647 – 654, 2002.

Trepel C, Racine RJ. GABAergic modulation of neocortical long-term potentiation in the freely moving rat. *Synapse* 35(2):120–8, 2000.

Utz KS, Dimova V, Oppenlander K, & Kerkhoff G. Electrified minds: Transcranial direct current stimulation (tDCS) and galvanic vestibular stimulation (GVS) as methods of non-invasive brain stimulation in neuropsychology—a review of current data and future implications. *Neuropsychologia* 48, 2789–2810, 2010.

Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B. Do rats have prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 146: 3 – 17, 2003.

Vertes RP. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J Comp Neurol* 442:163–87, 2002.

Wagner T, Valero-Cabre´ A, Pascual-Leone A. Noninvasive human brain stimulation. *Annu Rev Biomed Eng* 9:527–565, 2007.

Wang, XJ. Discovering spatial working memory fields in prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 93, 3027-3028, 2005.

Watcher D, Wrede A; Schulz-Schaeffer W; Taghizadeh-Waghef A; Nitsche MA et.al. Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. *Exp Neurol* 227:322-327, 2011.

Wood, JN; Grafman, J. Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. *Nat Rev Neurosci* 4, 139-147, 2003.

Yuan, K; Steedle, J; Shavelson, R; Alonzo, A; Oppezzo, M. Working memory, fluid intelligence, and science learning. *Educ Res Rev* 1, 83-98, 2007.

Zaehle T, Sandmann P, Thorne JD, Jäncke L, Herrman CS, Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates working memory performance: combined behavioural and electrophysiological evidence. *BMC Neuroscience* 12:2, 2011