

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

**NATÉRCIA CARVALHAL ALVES**

**MODULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA PELA  
MEMANTINA NA MEMÓRIA OPERACIONAL  
ESPACIAL EM RATOS SOB ESTIMULAÇÃO  
EPIDURAL CORTICAL POR CORRENTE CONTÍNUA  
DE BAIXA INTENSIDADE**

**VITÓRIA**

**2013**

**NATÉRCIA CARVALHAL ALVES**

**MODULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA PELA MEMANTINA NA  
MEMÓRIA OPERACIONAL ESPACIAL EM RATOS SOB  
ESTIMULAÇÃO EPIDURAL CORTICAL POR CORRENTE CONTÍNUA  
DE BAIXA INTENSIDADE**

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<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ester Miyuki Nakamura Palacios

VITÓRIA

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL  
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU  
ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE  
CITADA A FONTE.

Espaço reservado aos dados internacionais de catalogação, elaborados pela  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo.

**NATÉRCIA CARVALHAL ALVES**

**MODULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA PELA MEMANTINA NA MEMÓRIA  
OPERACIONAL ESPACIAL EM RATOS SOB ESTIMULAÇÃO EPIDURAL  
CORTICAL POR CORRENTE CONTÍNUA DE BAIXA INTENSIDADE**

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.

Aprovada em 3 de maio de 2013.

---

**Profª Drª Ester Miyuki Nakamura Palacios - Orientadora - UFES**

---

**Profª Drª Ângela Cristina do Valle – USP**

---

**Profª Drª Livia Carla de Melo Rodrigues – UFES**

---

**Profª Drª Ivanita Stefanon**  
**Coordenadora do PPGCF - UFES**

Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

A gratidão é a mais distinta forma de correspondência ao amparo e colaboração recebidos, sobretudo em momentos difíceis. Em retribuição, agradeço:

Aos meus pais e irmãos, pelos exemplos e incentivo. Ao Tiago, agradeço imensamente por tudo.

À orientadora professora Ester, pela dedicação e ensinamentos.

Ao Rodrigo e à Alice, pelo auxílio ímpar.

Ao Timóteo, Alcioni e filhos, pela força e carinho.

À Clarinha, por ter me proporcionado tantas alegrias nesse período, nas raras horas dos fins de semana.

À Sony de Freitas Itho, pela generosidade e reconhecimento do meu trabalho desde a minha graduação em Farmácia e Bioquímica e que me deixou lisonjeada em junho de 2012.

Ao Willyan e ao Marcelo, pela garantia na condução de um estudo duplo-cego.

À banca examinadora deste trabalho, professoras Ângela e Livia, pelas importantes contribuições.

Aos funcionários do Biotério Central da UFES, João, Marildo e Erly, por sempre terem me auxiliado quando precisei.

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imuno-histoquímica da UFES, pelas análises histológicas.

Aos ratos Wistar, heróis anônimos, mal sabem o quanto contribuem para a saúde humana.

A Deus, por me vivificar.

## RESUMO

Paradigmas de estimulação elétrica cerebral tornaram-se uma ferramenta potencial na neuromodulação cognitiva da aprendizagem e da memória. A investigação em modelos animais translacionais no esclarecimento dos mecanismos subjacentes à neuroplasticidade faz-se necessária. A atividade de neurônios do córtex pré-frontal (CPF) é considerada como o correlato celular da memória operacional, definida como o processo cognitivo de retenção e manipulação de informações, a serviço da compreensão, raciocínio e planeamento. Tarefas com retardos no labirinto radial de oito braços (LR-8) são paradigmas estabelecidos para estudos da memória operacional espacial e da ativação pré-frontal subjacente. A memantina, um antagonista de moderada afinidade de receptores NMDA (NMDAR), foi utilizada para investigar a modulação glutamatérgica da memória operacional espacial em ratos, sob estimulação epidural cortical por corrente contínua de baixa intensidade (eDCS) no CPF medial (CPFm) esquerdo. Ratos Wistar machos, previamente treinados no LR-8 ( $n = 50$ ), foram submetidos à cirurgia de implante de eletrodo epidural (5 mm de diâmetro) sobre o CPFm esquerdo. O desempenho dos animais foi avaliado em tarefas de memória operacional espacial, em retardos de 4 e 10 h, com (eDCS) e sem (*Sham*) estimulação elétrica epidural ativa (400  $\mu$ A, 10 min, catodo de 50 mm de diâmetro, 5 min antes da tarefa) e sob os efeitos agudos de salina ou memantina nas doses de 0,32, 1,0 ou 3,2 mg/kg, administradas semirrandomicamente, 30 min antes das tarefas. O grupo eDCS cometeu significativamente menos erros de desempenho nos retardos de 10 h ( $1,46 \pm 0,27$ ), sob salina, em comparação ao grupo *Sham* ( $2,53 \pm 0,40$ ), pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Similarmente, nos retardos de 4 h, o mesmo efeito da eDCS foi observado entre subgrupos com baixo desempenho basal ( $> 2$  erros cometidos, sob salina), eDCS ( $2,53 \pm 0,31$ ) e *Sham* ( $3,71 \pm 0,47$ ), sendo estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Mann-Whitney. A memantina prejudicou o desempenho dos animais *Sham* com melhor desempenho basal, em perfil dose-resposta em U invertido, com ápice na dose de 1 mg/kg ( $1,91 \pm 0,41$ ), sendo estatisticamente significativa pelo teste de Friedman seguido pelo *post-hoc* de Dunn ( $p < 0,05$ ), em relação à salina ( $0,36 \pm 0,15$ ). Por outro lado, a memantina tendeu a facilitar o desempenho dos animais *Sham* com pior desempenho basal nos retardos de 4 h. No subgrupo eDCS de melhor desempenho, a memantina apresentou uma propensão a aumentar os erros no pós-retardo de 4 h. Por outro lado, no subgrupo eDCS de pior desempenho, a interação entre a memantina e a eDCS facilitou a memória operacional espacial, sendo estatisticamente significativa pelo teste de Friedman seguido pelo *post-hoc* de Dunn ( $p < 0,05$ ) na dose de 3,2 mg/kg ( $0,96 \pm 0,31$ ), em relação à salina ( $2,57 \pm 0,30$ ). A eDCS no CPFm esquerdo facilitou o desempenho da memória operacional espacial e atenuou o efeito de prejuízo da memória produzido pela memantina. Os dados sugerem um envolvimento da mediação glutamatérgica pelos NMDARs na eDCS, entretanto, não parece ser um mecanismo único e é sugerido um sinergismo entre a eDCS e a memantina.

Palavras-chave: Córtex pré-frontal, estimulação elétrica epidural, labirinto radial, memantina, memória operacional, neuromodulação.

## ABSTRACT

Electrical brain stimulation paradigms are lately becoming a potential tool in cognitive neuromodulation of learning and memory. The translational research in animal models for elucidating the mechanisms underlying neuroplasticity is necessary. The neuronal activity in the prefrontal cortex (PFC) has been considered as the cellular correlate of working memory, defined as the cognitive process of retention and manipulation of information in the service of understanding, reasoning and planning. Delayed tasks in the eight-arm radial maze (RAM) are well established paradigms for spatial working memory studies. Memantine, an antagonist with moderate affinity of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors (NMDAR), was used in the present study to investigate the glutamatergic modulation of spatial working memory in rats under epidural direct current stimulation (eDCS) over the left medial PFC (mPFC). Male Wistar rats previously trained in the RAM ( $n = 50$ ) underwent surgery for epidural electrode implant (5.0 mm diameter) over the left mPFC. The animals' performance was evaluated in 4-h and 10-h delayed tasks in the RAM, with (eDCS) and without (Sham) active epidural electric stimulation (400  $\mu$ A, 10 min, cathode 50 mm diameter, 5 min before the task) combined with acute ip administrations of saline or memantine at doses of 0.32, 1.0 or 3.2 mg/kg, semi-randomly administered 30 min before the tasks. The eDCS group significantly committed fewer errors in the 10-h delay performance ( $1.46 \pm 0.27$ ), under saline, compared to Sham group ( $2.53 \pm 0.40$ ) ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). Similarly, in the 4-h delayed task, eDCS decreased significantly the number of errors in animals with poor performance at baseline ( $> 2$  errors under saline), eDCS ( $2.53 \pm 0.31$ ) and Sham ( $3.71 \pm 0.47$ ) ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). Memantine at the dose of 1.0 mg/kg ( $1.91 \pm 0.41$ ) significantly impaired the 4-h post-delay performance of Sham animals with good baseline performance under saline treatment ( $0.36 \pm 0.15$ ) ( $p < 0.05$ , Friedman test followed by Dunn's post-hoc), whereas memantine tended to improve the performance of animals with poor baseline performance but at non-statistically significant manner. In the eDCS subgroup of good baseline performance, memantine showed a propensity to increase the number of errors in 4-h post-delay performance, but the eDCS in animals with poor baseline performance combined with memantine, notably at the dose of 3.2 mg/kg ( $0.96 \pm 0.31$ ), significantly improved the 4-h post-delay performance when compared to saline ( $2.57 \pm 0.30$ ) ( $p < 0.05$ , Friedman test followed by Dunn's post-hoc). Thus, the eDCS over the mPFC facilitated the long-term component of spatial working memory performance alone and also facilitated the improving effects of memantine in animals with poor baseline performance. The data suggest that eDCS involves NMDAR in its facilitatory effects on spatial working memory in a certain extent and depending on the baseline performance. Because of the mild interaction observed, NMDAR mediation does not seem to be a single glutamatergic mechanism. Thus, the involvement of other glutamatergic receptors in the eDCS effects on working memory has to be addressed in future investigations.

Keywords: epidural electrical stimulation, memantine, neuromodulation, prefrontal cortex, radial maze, working memory.

## FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Modelo esquemático simplificado da administração tradicional das técnicas de Estimulação Magnética Transcraniana e de Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua de Baixa Intensidade.	3
<b>Figura 2</b> – Circuito elétrico esquemático da ETCC.	4
<b>Figura 3</b> – Plasticidade sináptica no hipocampo.	13
<b>Figura 4</b> – Imagens de ressonância magnética cerebral, exibindo a sequência de maturação da substância cinzenta sobre a superfície cortical, dos 5 aos 20 anos de idade.	20
<b>Figura 5</b> – Demarcações corticais segundo o mapa citoarquitetônico de Brodmann.	23
<b>Figura 6</b> – Divisão neuroanatômica do córtex pré-frontal humano pelo mapa citoarquitetônico de Brodmann.	24
<b>Figura 7</b> – Diagrama esquemático da diferenciação sub-regional do córtex pré-frontal do rato.	29
<b>Figura 8</b> – O ciclo percepção-ação.	34
<b>Figura 9</b> – Diagrama esquemático simplificado dos sinais de entrada e saída das sub-regiões do córtex pré-frontal.	36
<b>Figura 10</b> – Processo esquemático representativo de uma tarefa de memória operacional espacial pelo paradigma do labirinto radial de oito braços.	41
<b>Figura 11</b> – Diagrama esquemático simplificado de uma sinapse glutamatérgica tripartite e a sinalização de $Ca^{2+}$ no hipocampo.	42
<b>Figura 12</b> – Diagrama esquemático do receptor NMDA.	44
<b>Figura 13</b> – Processo esquemático simplificado da indução da LTP dependente de receptores NMDA.	47
<b>Figura 14</b> – Fórmula estrutural da memantina.	51
<b>Figura 15</b> – Diagrama esquemático do delineamento experimental.	59
<b>Figura 16</b> – Diagrama esquemático dos procedimentos conduzidos em uma sessão de retardo prolongado.	60
<b>Figura 17</b> – Fotografias do labirinto radial de oito braços, evidenciando os distintos estímulos visuais externos na sala de experimentação.	62
<b>Figura 18</b> – Fotografias representativas das etapas da cirurgia de implante do eletrodo de estimulação epidural cortical.	67

<b>Figura 19</b> – Fotografias representativas da estimulação epidural.	69
<b>Figura 20</b> – Fotografias dos procedimentos de confirmação da passagem da corrente elétrica de 400 $\mu$ A através do catodo e no animal.	70
<b>Figura 21</b> – Diagrama esquemático do aproveitamento dos animais.	75
<b>Figura 22</b> – Média de erros $\pm$ e.p.m. nas sete últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8.	77
<b>Figura 23</b> – Média de tempo $\pm$ e.p.m. nas sete últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8.	78
<b>Figura 24</b> – Média de erros $\pm$ e.p.m. nas sete últimas sessões de treinamento na fase V (aprendizagem) no LR-8.	80
<b>Figura 25</b> – Média de tempo $\pm$ e.p.m. nas quatro últimas sessões de treinamento na fase V (aprendizagem) no LR-8.	81
<b>Figura 26</b> – Média de erros $\pm$ e.p.m. nos pós-retardos de 4 h e de 10 h, nos grupos <i>Sham</i> e eDCS, sob a administração IP de salina.	83
<b>Figura 27</b> – Média de erros $\pm$ e.p.m. nos pós-retardos de 4 h nos subgrupos de melhor e de pior desempenho, sob a administração IP de salina.	84
<b>Figura 28</b> – Média de erros $\pm$ e.p.m. nos pós-retardos de 4 h nos grupos <i>Sham</i> e eDCS, sob a administração IP de salina e memantina (mg/kg).	86
<b>Figura 29</b> – Média de erros $\pm$ e.p.m. nos pós-retardos de 4 h nos subgrupos de melhor e pior desempenho, sob a administração IP de salina e memantina (mg/kg).	87
<b>Figura 30</b> – Média de erros $\pm$ e.p.m. nos pós-retardos de 10 h, nos grupos <i>Sham</i> e eDCS, sob a administração IP de salina e memantina (mg/kg).	89
<b>Figura 31</b> – Fotomicrografias ópticas obtidas a partir de secções coronais (20 $\mu$ m) da região subjacente ao eletrodo de estimulação de cérebros de um rato submetido à estimulação epidural cortical por corrente contínua de 400 $\mu$ A (eDCS) e de outro sob procedimento <i>sham</i> ( <i>Sham</i> ), na coloração de Nissl.	91
<b>Figura 32</b> – Diagrama esquemático das variações das magnitudes de densidade de corrente ( $A/m^2$ ) em cada tecido na ETCC.	106
<b>Figura 33</b> – Processo esquemático simplificado que explica o mecanismo de ação da memantina na doença de Alzheimer, baseada na hipótese do sinal-ruído.	113

## TABELAS

**Tabela 1** – Média dos pesos corporais (g)  $\pm$  e.p.m. dos animais ao longo das fases de treinamento no LR-8 e o seu percentual em relação à média do peso inicial. 76

**Tabela 2** – Média de tempo (s)  $\pm$  e.p.m. nos pré e pós-retardos de 4 h e 10 h nos grupos e subgrupos, sob a administração IP de salina. 85

**Tabela 3** – Média de tempo (s)  $\pm$  e.p.m. nos pré e pós-retardos de 4 h, nos grupos e subgrupos, sob a administração IP de salina ou memantina. 88

**Tabela 4** – Média de tempo (s)  $\pm$  e.p.m. nos pré e pós-retardos de 10 h, nos grupos *Sham* e eDCS, sob a administração IP de salina ou memantina. 90

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMPAR</b>	Receptor $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-metil-4-isoxazolpropiônico
<b>AMPc</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AP5</b>	Ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico
<b>AP7</b>	Ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico
<b>Arc</b>	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>BART</b>	Tarefa de risco do balão analógico
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>CaMKII</b>	Proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina
<b>CCA</b>	Córtex cingulado anterior
<b>c-fos</b>	Proto-oncogene c-fos
<b>Cg1</b>	Área 1 do cingulado anterior
<b>COF</b>	Córtex orbitofrontal
<b>CPF</b>	Córtex pré-frontal
<b>CPF DL</b>	Córtex pré-frontal dorsolateral
<b>CPFm</b>	Córtex pré-frontal medial
<b>CREB</b>	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
<b>eDCS</b>	Estimulação epidural cortical por corrente contínua de baixa intensidade
<b>EEG</b>	Eletroencefalograma
<b>EMT</b>	Estimulação Magnética Transcraniana
<b>EMTr</b>	Estimulação Magnética Transcraniana repetitiva

<b>epm</b>	Erro padrão da média
<b>ERK</b>	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
<b>ETCC</b>	Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua de Baixa Intensidade
<b>GABA<sub>B</sub></b>	Receptor B do ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>IP</b>	Injeção Intraperitoneal
<b>KAR</b>	Receptor do ácido 2-carboxi-4-(1-metiletetil)-3-pirrolidinacético
<b>LR-8</b>	Labirinto radial de oito braços
<b>LTD</b>	Depressão de longa duração
<b>LTP</b>	Potenciação de longa duração
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>mGluR</b>	Receptor glutamatérgico metabotrópico
<b>MK-801</b>	Maleato de (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5,10-imina ou dizocilpina
<b>mTOR</b>	Alvo da rapamicina de mamíferos
<b>NMDAR</b>	Receptor N-metil-D-aspartato
<b>PCP</b>	Fenciclidina
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase
<b>PPSE</b>	Potencial pós-sináptico excitatório
<b>SNARE</b>	Receptor solúvel de ligação à N-etilmaleimida
<b>TrkB</b>	Receptor tirosina quinase B
<b>VGLUT</b>	Transportador vesicular de glutamato
<b>Wnt</b>	Wingless-type MMTV integration site family
<b>zif268</b>	Zinc-finger protein 268

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Técnicas neuromoduladoras de estimulação cerebral</b>	<b>2</b>
1.1.1	<i>Aplicações clínicas</i>	5
1.1.2	<i>Segurança</i>	7
1.1.3	<i>Parâmetros da neuroestimulação: a contribuição de modelos experimentais</i>	9
<b>1.2</b>	<b>Bases fisiológicas da estimulação cerebral não invasiva: plasticidade sináptica e modulação glutamatérgica</b>	<b>11</b>
<b>1.3</b>	<b>Neuromoduladores</b>	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Neurociência translacional: da pesquisa básica experimental ao tratamento clínico</b>	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Córtex pré-frontal</b>	<b>19</b>
1.5.1	<i>Divisão neuroanatômica funcional do córtex pré-frontal</i>	21
1.5.1.1	<i>Projeções e convergência de informações no córtex pré-frontal</i>	27
1.5.2	<i>Divisão sub-regional do córtex pré-frontal do rato</i>	28
1.5.3	<i>Funções do córtex pré-frontal</i>	30
1.5.3.1	<i>Córtex pré-frontal medial</i>	34
<b>1.6</b>	<b>Memória operacional</b>	<b>37</b>
1.6.1	<i>Paradigma do labirinto radial de oito braços</i>	40
<b>1.7</b>	<b>Sistema glutamatérgico</b>	<b>41</b>
1.7.1	<i>Função glutamatérgica na aprendizagem e na memória</i>	45
1.7.2	<i>Antagonistas do receptor NMDA</i>	49
1.7.2.1	<i>Memantina</i>	50
<b>2</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>56</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais</b>	<b>58</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento experimental</b>	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>Memória operacional espacial: labirinto radial de oito braços</b>	<b>60</b>
4.3.1	<i>Equipamento</i>	60
4.3.2	<i>Aquisição da tarefa de memória operacional espacial</i>	63
<b>4.4</b>	<b>Cirurgia estereotáxica</b>	<b>65</b>

<b>4.5</b>	<b>Estimulação epidural cortical de corrente contínua de baixa intensidade - eDCS</b> .....	68
<b>4.6</b>	<b>Administrações da memantina</b> .....	71
<b>4.7</b>	<b>Análise histológica</b> .....	71
<b>4.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	72
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	74
<b>5.1</b>	<b>Pesos corporais</b> .....	75
<b>5.2</b>	<b>Aprendizagem</b> .....	76
5.2.1	<i>Fase IV</i> .....	76
5.2.2	<i>Fase V</i> .....	79
5.2.3	<i>Fase VI</i> .....	82
5.2.3.1	Efeitos da eDCS sobre o desempenho da memória operacional espacial no LR-8: administrações de salina.....	82
5.2.3.2	Retardos de 4 h.....	85
5.2.3.3	Retardos de 10 h.....	88
<b>5.3</b>	<b>Análise histológica</b> .....	90
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	92
<b>6.1</b>	<b>Avaliação dos efeitos da eDCS sobre a memória operacional espacial</b> .....	93
<b>6.2</b>	<b>Avaliação dos efeitos da memantina sobre a memória operacional espacial</b> .....	93
<b>6.3</b>	<b>Avaliação dos efeitos da memantina sobre a eDCS na memória operacional espacial</b> .....	94
<b>6.4</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	95
6.4.1	<i>Memória operacional espacial pelo paradigma do LR-8</i> .....	95
6.4.1.1	Memória operacional espacial: correlatos anatomofuncionais.....	98
6.4.2	<i>Anestesia</i> .....	102
6.4.3	<i>A eDCS</i> .....	103
6.4.4	<i>Randomizações</i> .....	108
6.4.5	<i>Administrações da memantina</i> .....	108
<b>6.5</b>	<b>Efeitos cognitivos da memantina</b> .....	110
<b>6.6</b>	<b>Neuromodulação cognitiva da estimulação cerebral não invasiva</b> .....	115
<b>6.7</b>	<b>Limitações do estudo</b> .....	119
<b>6.8</b>	<b>Perspectivas futuras</b> .....	120
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	122
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	124

# *1. Introdução*

## 1.1 Técnicas neuromoduladoras de estimulação cerebral

Paradigmas de estimulação elétrica cerebral têm recebido interesse crescente como ferramentas moduladoras da excitabilidade cortical e do comportamento em uma amplitude de ensaios clínicos e condições experimentais. A estimulação cerebral abrange técnicas invasivas (estimulação cerebral profunda), semi-invasivas (epidurais) e não invasivas (transcranianas), voltadas à reativação de estruturas hipoativas, inibição de estruturas hiperativas, aprimoramento do processo natural de reorganização cortical ou modulação da sincronização das atividades oscilatórias em circuitos córtico-subcorticais (STAGG; NITSCHKE, 2011).

Uma variedade de técnicas de estimulação cerebral possui finalidades terapêuticas, incluindo a estimulação magnética transcraniana (EMT), a estimulação transcraniana por corrente contínua de baixa intensidade (ETCC), a estimulação epidural cortical por corrente contínua de baixa intensidade e a estimulação cerebral profunda. Adiante serão apresentadas as duas técnicas não invasivas mais amplamente empregadas, a EMT e a ETCC.

A técnica da EMT utiliza o princípio da indução eletromagnética para induzir correntes elétricas no cérebro (Figura 1). Um campo magnético pulsado é focado sobre o tecido cortical e, através de uma bobina portátil posicionada acima da cabeça do indivíduo, transpassa o couro cabeludo intacto e induz um campo elétrico indolor no cérebro (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).

Essas correntes induzidas podem ser de magnitude suficiente para despolarizar neurônios, e quando ocorre a aplicação repetitiva e coordenada dessas correntes (estimulação magnética transcraniana repetitiva - EMTr), elas são capazes de modular a excitabilidade cortical, diminuindo-a ou aumentando-a, dependendo dos parâmetros utilizados, para além da duração do período de estimulação (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).

Neuroestimuladores magnéticos consistem em dois componentes principais: um sistema capacitor de alta tensão e uma bobina de estimulação magnética que produz campos pulsados de 1-4 Tesla de intensidade, com duração de aproximadamente 1 ms para estimuladores de pulso único e de 0,25 ms para estimuladores rápidos. Em estimuladores repetitivos, o circuito essencial continua o mesmo, exceto por modificações no sistema de comutação para permitir taxas de pulso de muitas vezes por segundo (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).

A bobina serve como a fonte eletromagnética durante a estimulação (Figura 1). O desenho da bobina é criticamente importante; o seu formato influencia diretamente a distribuição da corrente induzida e, deste modo, o sítio de estimulação (COHEN *et al*, 1989). As bobinas mais comuns disponíveis comercialmente possuem formato em oito, diâmetros variáveis de 4 a 9 cm, com espirais de cobre firmemente enroladas, protegidas em molde plástico e dotadas de um sistema de resfriamento intermitente para prevenir o aquecimento (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).

A EMTr ativa conexões tanto excitatórias quanto inibitórias de áreas circunscritas corticais (HALLETT, 2007), com axônios sendo possivelmente o sítio primário de ativação (ROTEM; MOSES, 2008).

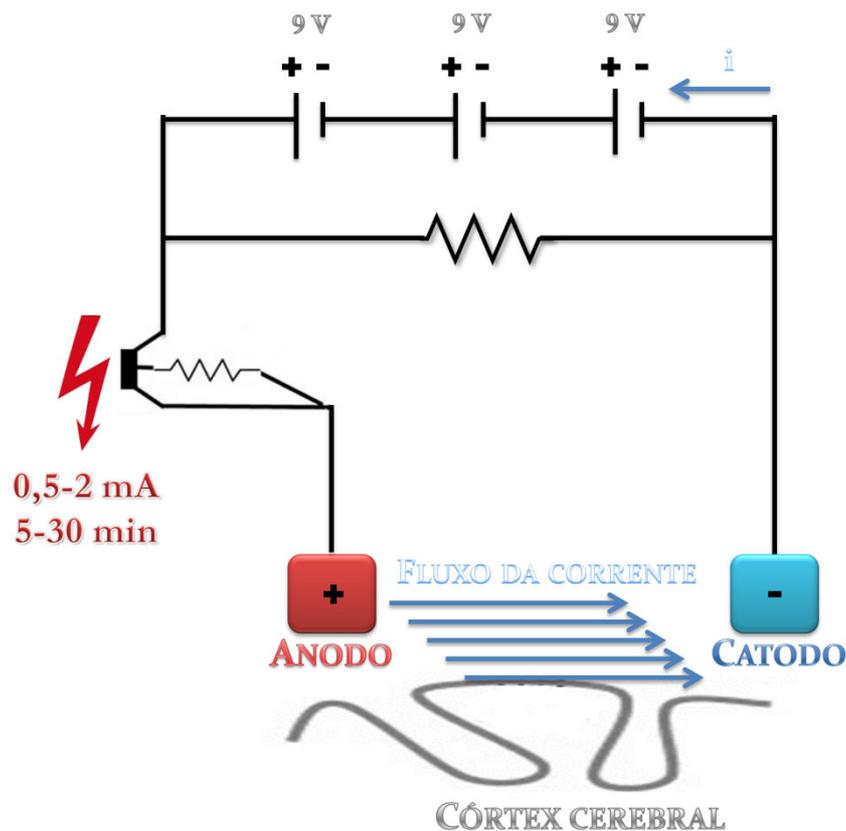
O limiar para a indução de alterações na excitabilidade cortical é uma função complexa da intensidade, frequência e duração da EMTr. A EMTr de alta frequência ( $\geq 5$  Hz) aumenta a excitabilidade cortical humana e a EMTr de baixa frequência (1 Hz) tem o efeito oposto (ZIEMANN, 2004; ZIEMANN *et al*, 2008).



**Figura 1** – Modelo esquemático simplificado da administração tradicional das técnicas de Estimulação Magnética Transcraniana (EMT), à esquerda, através de uma bobina em oito, conectada a um sistema capacitor e de Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua de Baixa Intensidade (ETCC), à direita, por meio de um par de eletrodos (catodo e anodo), conectados a um estimulador de corrente elétrica.

A ETCC (Figuras 1 e 2) é um processo contínuo de condução ôhmica, aplicada em correntes de intensidade constante, invariáveis com o tempo, com rampa apenas no início da

estimulação (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007). A técnica da ETCC (PRIORI, 2003) envolve a aplicação de correntes elétricas diretas de baixa intensidade (0,5-2 mA), diretamente sobre o escalpo intacto, por um curto período de tempo (5-30 min). A estimulação é fornecida por um par de eletrodos (dimensões de 3,5 a 35 cm<sup>2</sup> ou de menos de 12 mm de diâmetro para a ETCC de alta definição), conectados a um estimulador que gera um campo elétrico indolor e modulador da atividade neuronal, de acordo com os parâmetros adotados na aplicação (BRUNONI *et al*, 2012; WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).



**Figura 2** – Circuito elétrico esquemático da ETCC. O equipamento constitui-se em um gerador de corrente elétrica ajustável em intensidade e tempo de aplicação. A fonte é fornecida por três pilhas de 9 V cada, ligadas em série. Nota-se que a corrente flui no tecido do eletrodo positivo (anodo) ao negativo (catodo). Geralmente, a corrente contínua aplicada é de 0,5-2 mA e a duração da sessão é de 5-30 min.

Os eletrodos para a ETCC estão disponíveis comercialmente, mas podem ser esponjas cobertas com gel condutor ou embebidas em solução salina. No circuito elétrico, uma fonte de corrente direta é colocada em série com os eletrodos e um potenciômetro para ajustar a corrente constante (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).

A ETCC polariza o potencial de membrana neuronal, no entanto, é insuficiente por si só para provocar potenciais de ação. Muitos estudos utilizando modelos animais sugerem que a ETCC de polaridade catódica reduz as taxas de disparo neuronal espontâneo, enquanto a de polaridade anódica tem o efeito oposto (BINDMAN; LIPPOLD; REDFEARN, 1964; CREUTZFELDT; FROMM; KAPP, 1962).

### 1.1.1 Aplicações clínicas

Um crescente número de estudos tem mostrado que as técnicas neuromoduladoras de estimulação cerebral poderiam ser utilizadas como um tratamento substitutivo para a farmacoterapia, em pacientes com baixa tolerância ou refratários à medicação, ou ainda, como um tratamento adjuvante (BRUNONI *et al*, 2012). Os mínimos efeitos adversos, o baixo custo e a não invasividade tornam a ETCC uma estratégia atraente para atuar em sinergismo com os efeitos de outros tratamentos. Acredita-se que as aplicações terapêuticas das técnicas neuromoduladoras de estimulação cerebral tendem a crescer, diante dos progressivos resultados clínicos, aliados ao desenvolvimento tecnológico (BIKSON *et al*, 2012).

A ETCC anódica diminuiu a sintomatologia depressiva (COSTAIN; REDFEARN; LIPPOLD, 1964), enquanto a estimulação catódica reduziu sintomas maníacos (CARNEY, 1969). Essas foram algumas das primeiras tentativas para tratar distúrbios neuropsiquiátricos com a ETCC.

Posteriormente, foi visto um cenário de redescoberta e de aperfeiçoamento da neuromodulação pela estimulação cerebral. Por conseguinte, a ETCC foi capaz de tratar os déficits de atenção visuoespaciais em pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) que sofriam de negligência (SPARING *et al*, 2009), habilidades em afasia vascular (MONTI *et al*, 2008), memória de reconhecimento na doença de Alzheimer (FERRUCCI *et al*, 2008), além de benefícios na reabilitação motora (WILLIAMS; IMAMURA; FREGNI, 2009), dor crônica (O'CONNELL *et al*, 2011), depressão (FREGNI *et al*, 2007; RIGONATTI *et al*, 2008), desejo pelo álcool (BOGGIO *et al*, 2008), dependência química (FEIL; ZANGEN, 2010) e em muitos outros processos patológicos (NITSCHKE *et al*, 2008).

Considerando-se que a aprendizagem e a memória demandam alterações funcionais corticais que envolvem modulações na excitabilidade, a indução de alterações neuroplásticas pela estimulação de corrente direta de baixa intensidade tornou-se uma ferramenta potencial para

modular esses processos (NITSCHKE *et al*, 2003). De fato, foi mostrado em algumas experiências iniciais que os processos de aprendizagem são influenciados pela estimulação por corrente direta: no macaco, a estimulação anódica do córtex pré-frontal dorsolateral (CPFDL) aprimorou o desempenho em uma tarefa com retardo, ao passo que a estimulação catódica da mesma região agravou o desempenho (ROSEN; STAMM, 1972).

Os efeitos facilitatórios comportamentais da ETCC têm sido observados em indivíduos saudáveis quanto ao aprendizado motor implícito (NITSCHKE *et al*, 2003), aprendizagem probabilística (KINCES *et al*, 2004), detecção de ameaças (CLARK *et al*, 2010), memória operacional (FREGNI *et al*, 2005; OHN *et al*, 2008), percepção (ANTAL *et al*, 2004) e linguagem (FERTONANI *et al*, 2010; IYER *et al*, 2005).

Um crescente número de estudos tem mostrado que a estimulação cerebral não invasiva pode facilitar diferentes formas de aprendizado, incluindo motor (ANTAL *et al*, 2004; GALEA; CELNIK, 2009; NITSCHKE *et al*, 2003; REIS *et al*, 2009), proficiência numérica (COHEN-KADOSH *et al*, 2010) e gramatical (VRIES *et al*, 2010). Adicionalmente, a ETCC tem sido utilizada para aprimorar a memória declarativa (BOGGIO *et al*, 2009; MARSHALL *et al*, 2004) e a linguagem (FLOEL *et al*, 2008).

A técnica semi-invasiva da estimulação epidural cortical crônica de áreas motoras ou sensoriais tem sido um recurso no tratamento das síndromes dolorosas refratárias (CANAVERO; BONICALZI, 2002; TSUBOKAWA *et al*, 1991), na adjuvância da recuperação do AVC (BROWN *et al*, 2006) e dos distúrbios motores, como na doença de Parkinson (PRIORI; LEFAUCHEUR, 2007). Adicionalmente, em estudo de Nahas *et al* (2010), três de cinco pacientes com implantes epidurais de estimulação crônica e intermitente da área pré-frontal obtiveram remissão de um quadro depressivo refratário.

Em 1970, foi mostrado por Pfurtscheller (apud NITSCHKE *et al*, 2003) que a polarização transcraniana poderia afetar padrões do eletroencefalograma (EEG) e potenciais evocados em nível cortical e, portanto, tende a ser considerada efetiva. Atualmente, para uma compreensão dinâmica do funcionamento cerebral humano, tem sido associada a estimulação cerebral com o imageamento da área estimulada, como a combinação com a ressonância magnética funcional (CLARK *et al*, 2010; KEESER *et al*, 2011; PASCUAL-LEONE *et al*, 2011), ou ainda, em associação com análises da atividade elétrica cerebral espontânea, como o EEG e registros de potenciais evocados (PASCUAL-LEONE *et al*, 2011). De fato, Nakamura-Palacios *et al* (2011) encontraram um aumento da média de amplitude da onda P3, potencial

cognitivo relacionado a evento, em pacientes alcoolistas após a ETCC. Conjuntamente, essas associações fornecem informações em tempo real sobre o estado da atividade cortical, sua conectividade funcional e como a estimulação cerebral interfere nesses processos e, em reciprocidade, elas também têm contribuído para a inovação tecnológica da neuromodulação cerebral (BIKSON *et al*, 2012; TAKANO *et al*, 2011).

### 1.1.2 Segurança

A ETCC tem sido realizada em milhares de indivíduos (controles saudáveis e populações de pacientes) e eventos adversos graves não ocorreram (BRUNONI *et al*, 2012). Além das centenas de estudos realizados com a ETCC com finalidades diversas, investigações específicas acerca da sua segurança e toxicidade foram também conduzidas. Poreisz *et al* (2007) conduziram um amplo estudo retrospectivo, em que buscaram eventos adversos em 567 sessões de ETCC. Um ligeiro prurido sob o eletrodo, cefaléia transitória, fadiga e náuseas foram descritos em uma minoria de casos, sendo que a maioria desses efeitos não diferiu do placebo (POREISZ *et al*, 2007).

Estudos detalhados para avaliar a segurança da ETCC não encontraram nenhuma evidência de dano neuronal avaliado pela dosagem da enolase sérica neurônio-específica (NITSCHKE; PAULUS, 2001; NITSCHKE *et al*, 2003a), edema, perturbações na barreira hematoencefálica ou alterações cerebrais detectáveis pela ressonância magnética por imagem (NITSCHKE *et al*, 2004), ou efeitos autonômicos considerados clinicamente significativos (RAIMUNDO; URIBE; BRASIL-NETO, 2012). Nenhum registro patológico eletroencefalográfico foi notado, nem prejuízos relevantes no desempenho de testes neuropsicológicos, após a estimulação do lobo frontal com intensidades de corrente de até 2 mA por 20 min (IYER *et al*, 2005).

Considera-se importante que a intensidade da corrente e a duração do estímulo não devam exceder os limites de segurança conhecidos (NITSCHKE *et al*, 2003b). Nitsche *et al* (2003b) reuniram parâmetros relevantes, testados experimentalmente em estudos anteriores (AGNEW; MCCREERY, 1987; MCCREERY *et al*, 1990; YUEN *et al*, 1981), para determinar os limites de segurança da estimulação elétrica repetitiva:

- Densidade de corrente (A/cm<sup>2</sup>):

$$\frac{\text{intensidade de estimulação (A)}}{\text{tamanho do eletrodo (cm}^2\text{)}}$$

- Carga total (C/cm<sup>2</sup>):

$$\frac{\text{intensidade de estimulação (A)}}{\text{tamanho do eletrodo (cm}^2\text{)}} \times \text{duração total da estimulação (s)}$$

A duração total da estimulação é calculada pela multiplicação da duração de cada pulso pela sua quantidade.

- Carga por fase (μC):

$$\text{intensidade da estimulação (A)} \times \text{duração de um pulso único (}\mu\text{s)}$$

- Densidade de carga (μC/cm<sup>2</sup>):

$$\frac{\text{intensidade de estimulação (A)}}{\text{tamanho do eletrodo (cm}^2\text{)}} \times \text{duração de um pulso único (}\mu\text{s)}$$

Por exame desses parâmetros, Nitsche *et al* (2003b) destacaram que é essencial perceber que os parâmetros de carga por fase e a densidade de carga aplicam-se apenas se a estimulação repetitiva de alta frequência é administrada. Essa é a razão pela qual a densidade de carga e a carga por fase não são aplicáveis para a ETCC, pois apenas um estímulo contínuo é fornecido em uma sessão inteira de ETCC (NITSCHKE *et al*, 2003b). Desse modo, os parâmetros densidade de corrente e carga total são mais adequados para avaliar a segurança da ETCC.

Yuen *et al* (1981) detectaram danos neuronais em uma carga total de 216 C/cm<sup>2</sup> e, posteriormente, McCreery *et al* (1990) apontaram que densidades de corrente abaixo de 25 mA/cm<sup>2</sup> não induzem lesões cerebrais. Em ratos, Liebetanz *et al* (2009) utilizaram uma montagem semelhante à utilizada na ETCC e lesões cerebrais só foram encontradas em densidades de corrente superiores a 14,29 mA/cm<sup>2</sup>, de corrente catódica, aplicada por mais de 10 min. Por outro lado, protocolos de ETCC em humanos geram densidades médias de corrente de 0,05 mA/cm<sup>2</sup> (STAGG; NITSCHKE, 2011).

Segundo Brunoni *et al*, (2012), entre os critérios de exclusão para a estimulação cerebral não invasiva, incluem a presença de condições médicas que podem agravar-se com a estimulação, tais como a epilepsia não controlada, embora convulsões epiléticas não tenham sido observadas num estudo piloto em pacientes com epilepsia (FREGNI *et al*, 2006). Ainda, os indivíduos não devem possuir implantes metálicos próximos aos eletrodos (BRUNONI *et al*, 2012).

### 1.1.3 Parâmetros da neuroestimulação: a contribuição de modelos experimentais

A frequência, intensidade e polaridade da estimulação governam a eficácia das técnicas. A amplitude do pulso, a montagem unicefálica ou bicefálica, a distância entre os eletrodos e a sua área são outros fatores interferentes (NITSCHKE *et al*, 2008). Variações na condutividade dos tecidos ou na distância entre a região de interesse e o eletrodo podem influenciar os resultados (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007). Em particular, a espessura da camada de líquido cefalorraquidiano influencia a distribuição do campo elétrico na estimulação transcraniana (MANOLA *et al*, 2005; SLUTZKY *et al*, 2010). Dessa forma, a estimulação cortical pode ativar ou inibir a atividade de circuitos córtico-subcorticais e os parâmetros interferentes devem ser controlados para garantir a eficácia da técnica.

Teoricamente, mesmo dentro das limitações tecnológicas e de segurança, há um conjunto praticamente infinito de variações de parâmetros possíveis. Isto provê uma flexibilidade excepcional da estimulação elétrica transcraniana, mas também apresenta um desafio para os pesquisadores e clínicos na determinação da dose ótima para aplicações específicas (PETERCHEV *et al*, 2012).

Na ETCC, os eletrodos são geralmente posicionados de acordo com o sistema internacional 10-20 do EEG e a natureza dos efeitos depende da posição do “eletrodo de referência” (também denominado eletrodo de retorno) e da distância entre o par de eletrodos, o que afeta a direção do fluxo de corrente e o campo elétrico relativo à orientação neuronal no espaço (NITSCHKE; PAULUS, 2000). No entanto, o termo “eletrodo de referência” pode ser problemático, especialmente para montagens bicefálicas, porque o eletrodo “referência” não é inerte e pode obviamente influenciar a atividade neuromodulatória (BRUNONI *et al*, 2012).

Estudos em animais mostraram que a estimulação anódica foi significativamente diferente da catódica, em elevar o sinal de diversas medidas, como a atividade cerebral avaliada pela imagem por ressonância magnética funcional (TAKANO *et al*, 2011), o fluxo sanguíneo cerebral (WACHTER *et al*, 2011), a excitabilidade do córtex motor (BEN TAIB; MANTO, 2009; CAMBIAGHI *et al*, 2010) e a velocidade da depressão cortical alastrante (FREGNI *et al*, 2007; LIEBETANZ *et al*, 2006a). Em geral, a ETCC de polaridade anódica aumenta a facilitação cortical e diminui a inibição cortical, enquanto a ETCC de polaridade catódica tem efeitos opostos (BINDMAN; LIPPOLD; REDFEARN, 1964; CREUTZFELDT; FROMM; KAPP, 1962; PURPURA; MCMURTRY, 1965).

A combinação da intensidade da corrente, área e tamanho da área estimulada, além da duração da estimulação, são parâmetros relevantes que descrevem a intensidade da estimulação e, portanto, controlam a eficácia da técnica (AGNEW; MCCREERY, 1987). No entanto, ressalta-se que cargas diferentes combinadas com períodos distintos de estimulação, mas com idêntica carga total, podem resultar em efeitos qualitativamente contrários: uma estimulação intensa e curta pode induzir despolarização supralimiar, enquanto uma estimulação fraca e prolongada pode não provocar potenciais de ação de um dado neurônio, ambas resultando em idênticas cargas totais (NITSCHKE *et al*, 2003a, 2003b).

Outro parâmetro relevante para alcançar os efeitos intencionais da estimulação – mais provavelmente por determinar a população neuronal estimulada – é a direção do fluxo da corrente, definida pelas posições dos eletrodos e a polaridade (NITSCHKE *et al*, 2003a, 2003b). Não obstante, a densidade da corrente sob o eletrodo não é homogênea, mas tende a concentrar-se próxima às suas margens, especialmente ao longo das bordas mais próximas do outro eletrodo (MIRANDA; FARIA; HALLETT, 2009).

Além disso, foi mostrado que populações neuronais diferentemente orientadas foram influenciadas de forma distinta por uma direção constante de fluxo de corrente (CREUTZFELDT *et al*, 1964; PURPURA; MCMURTRY, 1965), o que sugere fortemente que a relação da direção do fluxo de corrente e a orientação neuronal são cruciais para a eficácia da estimulação (NITSCHKE *et al*, 2003a, 2003b). Essa heterogeneidade pode ocorrer entre neurônios situados nos giros e nos sulcos (CREUTZFELDT; FROMM; KAPP, 1962). Dados de modelagem mostraram que a corrente elétrica pode concentrar-se na borda dos giros (DATTA *et al*, 2009). Ainda, a morfologia das células nervosas pode ser crucial na determinação dos efeitos observados da ETCC *in vivo* (TERZUOLO; BULLOCK, 1956).

Em 1975, Dymond, Coger e Serafetinides sugeriram que aproximadamente 45 % da corrente aplicada atravessa o tecido cerebral. Este achado equiparou-se ao predito por Rush e Driscoll (1968), que utilizaram um modelo de tanque eletrolítico composto de uma fração de um crânio humano suspenso em um fluido e também outro modelo menos realista, composto por três esferas concêntricas, ambos com resultados concordantes, que posteriormente inspiraram a modelagem da ETCC (MIRANDA; LOMAREV; HALLET, 2006). Miranda, Lomarev e Hallet (2006) sugeriram que apenas cerca de 10 % da corrente de 2 mA sobre o escalpo atingem o córtex.

Quanto à intensidade da corrente, Takano *et al* (2011) mostraram a efetividade da ETCC anódica na ativação de áreas corticais e realizaram o mapeamento por ressonância magnética funcional. Uma corrente de 400  $\mu$ A sobre o córtex frontal de ratos por 10 min aumentou significativamente a ativação neuronal no córtex frontal e *nucleus accumbens*.

Finalmente, a EMT e a ETCC tradicionais têm certas limitações. Estas incluem focalidade, profundidade e controle da localização alvo. Para a ETCC, investigadores propuseram modelos computadorizados para sobrepor campos e alcançar focalidade aumentada, como a ETCC de alta definição (BIKSON *et al*, 2012). Para a EMT, focalidade aumentada tem sido explorada, por exemplo, com as modelagens da bobina (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).

Quanto aos efeitos, em comparação com a EMT, que utiliza os potenciais evocados motores para reproduzir a sua sensibilidade, não há um equivalente prático semelhante para a titulação da ETCC (BRUNONI *et al*, 2012). Adicionalmente, devido às variabilidades inter e intraindividuais, a dosagem da estimulação não determina totalmente o resultado biológico ou o terapêutico, tal como ocorre em abordagens farmacológicas (PETERCHEV *et al*, 2012).

Em suma, face à diversidade de parâmetros influenciadores dos efeitos buscados, interpretações heurísticas devem ser evitadas para se alcançar a reprodutibilidade dos resultados clínicos. Nesse contexto, a fim de aprimorar o uso clínico racional da estimulação transcraniana, os estudos de modelagem, aliados a modelos animais de neuromodulação, são necessários para avaliar a segurança do estímulo, a eficácia do tratamento clínico e para o desenvolvimento das próximas abordagens e tecnologias da estimulação cerebral.

## **1.2 Bases fisiológicas da estimulação cerebral não invasiva: plasticidade sináptica e modulação glutamatérgica**

Paralelamente à expansão das aplicações das técnicas neuromoduladoras de estimulação cerebral, os seus mecanismos ainda permanecem um tópico de investigação.

A ETCC não elicia potenciais de ação, mas sim modula a atividade neuronal espontânea dependente da polaridade da corrente aplicada e do potencial de repouso da membrana neuronal, resultando em alterações imediatas nas taxas de disparo corticais (BINDMAN; LIPPOLD; REDFEARN, 1964; CREUTZFELDT; FROMM; KAPP, 1962). A estimulação

promove alterações sustentadas na excitabilidade cortical por algumas horas após o término da estimulação, se a corrente for aplicada por pelo menos alguns minutos (NITSCHKE; PAULUS, 2000; NITSCHKE *et al*, 2003).

Curiosamente, a estimulação elétrica cortical modula não apenas a atividade neuronal, mas também oscilações neuronais, como sugerido pela evidência de que uma rede de neurônios fortemente acoplados pode ser mais sensível à uma fraca corrente aplicada do que neurônios isolados (FROHLICH; MCCORMICK, 2010). Outros estudos revelaram que seus efeitos não são unicamente atribuídos a fenômenos elétricos, desde que a inativação cortical intermitente por resfriamento ou a aplicação de KCl não os eliminam (GARTSIDE, 1968a) e dependem da síntese proteica (GARTSIDE, 1968b).

Finalmente, campos elétricos constantes influenciam vários tecidos (vasos, tecido conjuntivo) e mecanismos fisiopatológicos (inflamação, migração celular, motilidade vascular); além disso, os seus efeitos são detectados em várias estruturas celulares (citoesqueleto, mitocôndria, membrana) (BRUNONI *et al*, 2012).

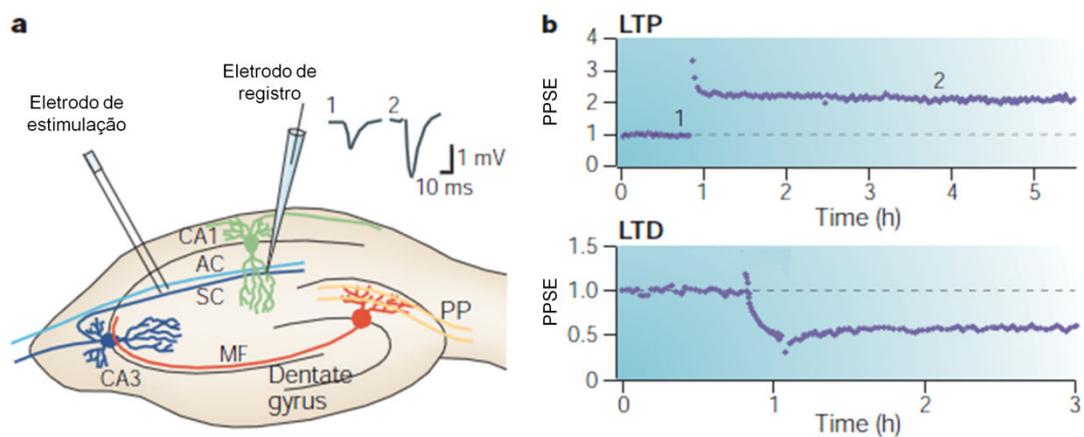
Além dos efeitos locais nas áreas sob os eletrodos, a ETCC afeta a atividade e a excitabilidade generalizada de áreas difusas corticais e subcorticais (LANG *et al*, 2005), o que pode representar a conectividade funcional das áreas circunscritas sob os eletrodos (KEESER *et al*, 2011). Essas evidências sugerem que os efeitos da estimulação por corrente direta são específicos a uma área, mas não limitados a ela; efeitos em áreas cerebrais remotas ocorrem mais provavelmente através de redes de circuitos interneuronais (LEFAUCHEUR, 2008).

Estudos em modelos animais corroboram a sustentação dos efeitos observados em humanos. Nekhendzy *et al* (2004), Liebetanz *et al* (2006b) e Wachter *et al* (2011) relataram pós-efeitos com duração de até 50, 60 e 30 min, respectivamente. A sustentação dos efeitos funcionais e clínicos da estimulação cerebral não invasiva é principalmente devido à promoção de processos de neuroplasticidade.

De fato, uma notável propriedade das sinapses é a sua capacidade de alterar a eficiência estrutural e funcional da transmissão de informações, diante de demandas intrínsecas ou ambientais (CARONI; DONATO; MULLER, 2012). A plasticidade sináptica envolve uma alteração na força da transmissão sináptica, que pode ser medida de várias maneiras, como por exemplo, pelas variações dos potenciais pós-sinápticos excitatórios (PPSE) (MALENKA; BEAR, 2004). A plasticidade sináptica pode ocorrer em um único neurônio, ou em uma

população de neurônios (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; LUSCHER *et al*, 2000). Por outro lado, a plasticidade estrutural envolve a formação ou a eliminação de espinhas dendríticas, botões axonais ou contatos sinápticos (CARONI; DONATO; MULLER, 2012). Também inclui rearranjos estruturais em uma escala maior, como mudanças nas arborizações axonais ou dendríticas (LAMPRECHT; LEDOUX, 2004). Em conjunto, a neuroplasticidade envolve o enfraquecimento, fortalecimento ou a “poda” de sinapses pré-existentes, além da formação de novas sinapses (CARONI; DONATO; MULLER, 2012; LAMPRECHT; LEDOUX, 2004). Ela nos permite estocar e utilizar grandes quantidades de informação na forma de comportamentos e memórias conscientes (CARONI, DONATO E MULLER, 2012; COLLINGRIDGE; ISAAC; WANG, 2004).

Desde o trabalho pioneiro de Hebb em 1949, muitos mecanismos de modulação da força sináptica foram apresentados (MALENKA; BEAR, 2004). Um deles, a LTP (potenciação de longa duração), primeiro demonstrada experimentalmente em 1973 por Bliss e Lomo, caracteriza-se por um aumento de longa duração na força sináptica que é causado por um breve período de atividade neuronal coordenada (Figura 3), é de particular interesse, pois permite a modulação da força sináptica por horas, ou mesmo dias e, portanto, foi postulada como um provável correlato eletrofisiológico para a formação de memórias (ANDERSON; LOMO, 1966; BLISS; LOMO, 1973; LAMPRECHT; LEDOUX, 2004).



**Figura 3** – Plasticidade sináptica no hipocampo. **a** Diagrama esquemático de uma preparação obtida a partir do hipocampo de um roedor, mostrando as principais vias excitatórias (AC: via associativa / comissural, MF: fibras musgosas, PP: via perfurante, SC: colaterais de Schaffer). Típicos posicionamentos dos eletrodos para estudar a plasticidade sináptica nas sinapses, em SC e AC. São mostrados registros dos potenciais pós-sinápticos excitatórios (PPSE) antes (1) e após (2) a estimulação. **b** Registros do curso temporal das alterações do PPSE na LTP (inclinação ascendente, estimulação de 100 Hz, por 1 s) e na LTD (inclinação descendente, estimulação de 1 Hz, por 15 min). Os números (1 e 2) indicam os momentos ilustrados em (a). Adaptado de Collingridge, Isaac e Wang (2004), sob permissão.

A LTP e sua antítese, a LTD (depressão de longa duração), têm sido as formas de plasticidade sináptica mais intensivamente investigadas e extensivamente estudadas no hipocampo (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993) e no neocórtex (FELDMAN, 2009).

A neuroplasticidade parece formar a base fisiológica dos processos cognitivos, tais como a aprendizagem e a memória (LAMPRECHT; LEDOUX, 2004). Além disso, está envolvida em doenças neuropsiquiátricas e processos de neuroreabilitação, como a reorganização das redes neurais na esquizofrenia ou a reaprendizagem das funções motoras após o AVC (CRAMER *et al*, 2011).

A LTP é um processo dependente de cálcio e pode ser classicamente induzida pelo influxo de cálcio através da ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) (MALENKA; BEAR, 2004). O aumento da concentração de cálcio intraneuronal ocorre após a aplicação de corrente anódica (ISLAM *et al*, 1995) e provavelmente provoca alterações na eficácia sináptica (MALENKA; BEAR, 2004). Um meio alternativo para o influxo de cálcio pós-sináptico é através da ativação de canais de cálcio voltagem-dependentes, que também têm sido implicados na indução da LTP (WESTENBROEK; AHLJANIAN; CATTERALL, 1990).

A propriedade da estimulação cerebral não invasiva de induzir a plasticidade tem fornecido um novo cenário para examinar o funcionamento cortical e possivelmente modular a plasticidade disfuncional patológica (NATHAN *et al*, 2011). Há evidências consistentes de que os efeitos dessas técnicas são em grande parte resultantes de mecanismos do tipo LTP e do tipo LTD (THICKBROOM, 2007; WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007). A similaridade de efeitos da ETCC anódica com aqueles observados na LTP foi mostrada por um estudo conduzido em preparações de fatias do córtex motor de camundongo, com a aplicação de correntes diretas (FRITSCH *et al*, 2010). Foi observado um aumento duradouro nos PPSEs, dependente de NMDAR e também dependente do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da ativação do seu receptor, tirosina quinase B (TrkB) (FRITSCH *et al*, 2010).

Especificamente, o limiar para a indução da LTP ou LTD é flexível e dependente do histórico recente da atividade pós-sináptica: alta atividade aumenta o limiar para a LTP e, concomitantemente, diminui o limiar para a LTD, enquanto a atividade baixa tem efeitos opostos (ABRAHAM, 2008). Considera-se que essa flexibilidade decorre de uma regulação homeostática para permitir a estocagem de informações e prevenir a excitotoxicidade pela

saturação da LTP ou da LTD (ABRAHAM, 2008). Esse controle pertence à teoria da metaplasticidade homeostática e a primeira descrição formal dos seus fenômenos foi estabelecida por Abraham e Bear (1996) que a caracterizaram como a plasticidade da plasticidade sináptica, ou seja, uma alteração duradoura na capacidade dos neurônios ou sinapses de gerar a plasticidade sináptica.

A metaplasticidade é muitas vezes consequente de “silenciosas” alterações moleculares, por não afetar a neurotransmissão basal, todavia, é manifestamente expressa na facilitação ou na prevenção de alterações plásticas em resposta à atividade sináptica. Hipotetiza-se que a modulação desses mecanismos proporciona uma nova dimensão terapêutica que poderia fornecer vantagens em face da direta indução ou prevenção da plasticidade sináptica (NATHAN *et al*, 2011).

Na metaplasticidade, as sinapses podem ser mais permissivas à plasticidade após um estímulo pré-condicionante (*priming*) ter alterado cascatas de sinalização moleculares específicas; esta mudança pode, por exemplo, resultar na fosforilação aumentada de receptores AMPA (AMPA) intracelulares ou extrassinápticos que lhes permitem ser inseridos em membranas pós-sinápticas, quando surge um estímulo apropriado (ABRAHAM, 2008).

Iyer, Schleper e Wassermann (2003) foram os primeiros a demonstrar que efeitos *priming* podem ser observados no córtex motor humano. Esse estudo mostrou que 10 min de estimulação *priming*, na forma de EMTr sublimiar de 6 Hz, aumentou a resposta do tipo LTD por um período subsequente de EMTr depressora de 1 Hz. A resposta do tipo LTD foi medida como uma depressão de longo prazo (> 60 min) da amplitude do potencial evocado motor (IYER; SCHLEPER; WASSERMANN, 2003). Cheeran *et al* (2010) citaram um protocolo que consiste em 10 min de ETCC catódica, administrada inicialmente para reduzir a excitabilidade cortical motora, seguido por um curto período de EMTr sublimiar de 1 Hz. A EMTr subliminar de 1 Hz isoladamente é insuficiente para induzir quaisquer pós-efeitos mas, quando pré-condicionada por ETCC catódica, gera facilitação do córtex motor, uma resposta metaplástica (CHEERAN *et al*, 2010).

Os resultados expostos indicam que o estado prévio de uma área cortical particular pode influenciar a forma pela qual a estimulação cerebral não invasiva modula a excitabilidade.

A indução da plasticidade no neocórtex, assim como em outras áreas cerebrais, é especialmente dependente de alterações em NMDARs de interneurônios glutamatérgicos (ARONIADOU; KELLER, 1995; CASTRO-ALAMANCOS *et al*, 1995).

Nesse contexto, Liebetanz *et al* (2002) investigaram o envolvimento dos canais de sódio e dos NMDARs na ETCC por meio da carbamazepina e do dextrometorfano, respectivamente. A carbamazepina só foi capaz de remover os efeitos anódicos, enquanto o dextrometorfano foi capaz de bloquear os efeitos do tipo LTP e do tipo LTD observados após a ETCC tanto anódica quanto catódica. Esses achados sugerem que a despolarização da membrana pode ser um mecanismo para a indução dos efeitos anódicos e os NMDARs podem ser prováveis candidatos para a indução da plasticidade sináptica. Usando a flunarizina, um bloqueador de canais de cálcio, a carbamazepina e o dextrometorfano, as contribuições de cada canal nos efeitos da ETCC foram investigadas (NITSCHKE *et al*, 2003c). Os resultados apresentaram que efeitos de curta duração da ETCC são causados pela polarização da membrana, enquanto os efeitos de longa duração podem ser resultantes da função dos NMDARs e podem também depender dos níveis de concentração intracelulares de cálcio (NITSCHKE *et al*, 2003c). Em contraste, a D-cicloserina, um agonista parcial NMDAR, aumentou a duração, mas não a magnitude dos efeitos tardios à ETCC anódica, mas teve pouco efeito sobre a ETCC catódica (NITSCHKE *et al*, 2004a).

Em um estudo que empregou espectroscopia de ressonância magnética, Stagg *et al* (2009) observaram decréscimos dos níveis de GABA após a ETCC tanto catódica quanto anódica e também redução da atividade neuronal glutamatérgica após a ETCC catódica. Posteriormente, Clark *et al* (2011) corroboraram o estudo anterior, em que maior atividade glutamatérgica foi observada em área abaixo do eletrodo anódico, sem elevações significativas em regiões homólogas no hemisfério contralateral.

Além disso, em ratos, a estimulação anódica modificou os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e aumentou os níveis intracelulares de cálcio (ISLAM *et al*, 1995), bem como a expressão de genes precoces; estes últimos mostraram-se dependentes de NMDAR (HATTORI; MORIWAKI; HORI, 1990).

Assim, em humanos, bem como em animais, a estimulação por corrente direta é capaz de elicitar mudanças duradouras na excitabilidade cortical. Estas alterações podem estar relacionadas com os NMDARs. A manipulação farmacológica de outros sistemas

neurotransmissores também interfere nos efeitos da estimulação cerebral, como será tratado a seguir.

### 1.3 Neuromoduladores

A plasticidade neocortical pode ser modulada por uma série de substâncias neuroquímicas denominadas neuromoduladores. Estes constituem um grupo heterogêneo indutor de pouca ou nenhuma mudança na atividade basal neocortical, mas potenciam ou atenuam respostas evocadas por outra substância neurotransmissora (BARCHAS *et al*, 1978; STAGG; NITSCHKE, 2011). A participação dos neuromoduladores nas mudanças sinápticas em longo prazo é criticamente dependente da sua concentração, da atividade fásica, dos subtipos de receptores e de seus locais de ação (STAGG; NITSCHKE, 2011) e a investigação dos seus efeitos pode ser conduzida por agentes farmacológicos.

Adiante serão apresentadas investigações farmacológicas nos sistemas neurotransmissores dopaminérgico, colinérgico, serotoninérgico, adrenérgico e gabaérgico que podem modular a plasticidade induzida pela estimulação não invasiva. A modulação pelo sistema glutamatérgico foi abordada no tópico anterior.

*Sistema dopaminérgico.* Para o sistema dopaminérgico, a plasticidade gerada pela ETCC é modulada de forma complexa, dependente da dose e do subtipo de receptor. O aumento do tônus dopaminérgico pela L-DOPA provocou reversão do aumento da excitabilidade após a ETCC anódica, o que resultou em mudanças de mesma direção e magnitude similares à ETCC catódica, além de prolongar a plasticidade inibitória (KUO; PAULUS; NITSCHKE, 2008). O agonista de receptores D<sub>2</sub> / D<sub>3</sub> ropinirol, aplicado em doses altas ou baixas, prejudicou a plasticidade (MONTE-SILVA *et al*, 2009). Contudo, doses médias de agentes dopaminérgicos D<sub>2</sub> não afetaram a plasticidade, independentemente do protocolo de neuromodulação realizado (MONTE-SILVA *et al*, 2009). Além disso, a abolição consistente da plasticidade pelo bloqueio seletivo dos receptores D<sub>2</sub> por meio da sulpirida ou do haloperidol mostra que a atividade dopaminérgica é uma condição necessária para induzir a plasticidade no córtex motor humano (NITSCHKE *et al*, 2006, 2009; MONTE-SILVA *et al*, 2011). Assim, a influência da atividade dopaminérgica resulta em efeitos não lineares sobre a plasticidade, que dependem da dosagem, do protocolo de indução de plasticidade e do equilíbrio da ativação de receptores D<sub>1</sub> versus D<sub>2</sub>.

*Sistema colinérgico.* A ativação colinérgica global (receptores muscarínicos e nicotínicos) pelo inibidor da colinesterase rivastigmina aboliu a plasticidade do tipo LTP induzida pela ETCC anódica (KUO *et al*, 2007).

*Sistema serotoninérgico.* Uma única dose do inibidor da recaptação da serotonina citalopram aumentou a magnitude e a duração dos efeitos do tipo LTP induzida pela ETCC anódica, enquanto foi capaz de converter a plasticidade do tipo LTD induzida pela ETCC catódica, em plasticidade do tipo LTP (NITSCHKE *et al*, 2009a).

*Sistema adrenérgico.* Os pós-efeitos da ETCC anódica foram prolongados na presença de anfetaminas, mas somente na ausência de dextrometorfano, o que sugere um envolvimento do sistema adrenérgico na modulação da plasticidade dependente de NMDAR (NITSCHKE *et al*, 2004b). Além disso, os pós-efeitos da ETCC anódica foram consideravelmente reduzidos pela adição de propranolol (NITSCHKE *et al*, 2004b).

*Sistema gabaérgico.* Lorazepam, um modulador positivo alostérico do receptor GABA<sub>A</sub>, não modificou os efeitos da plasticidade do tipo LTD induzida pela ETCC, enquanto reduziu a plasticidade do tipo LTP na fase inicial após a ETCC anódica, mas aumentou e prolongou a plasticidade do tipo LTP na fase tardia (NITSCHKE *et al*, 2004c).

Do ponto de vista clínico, esses resultados mostram que a farmacoterapia e a neuromodulação não invasiva podem interagir, o que pode ser um viés quando se estudam amostras clínicas que receberam as duas intervenções.

#### **1.4 Neurociência translacional: da pesquisa básica experimental ao tratamento clínico**

A estimulação elétrica transcraniana de baixa intensidade tem um enorme potencial clínico, diante da sua comprovada eficácia, facilidade de uso, natureza não invasiva, aparente segurança, seu modo *sham*, além da possibilidade de combinação com outras terapias. A ETCC, por exemplo, poderá se tornar uma valiosa terapia adjuvante na neuroreabilitação cognitiva (NAKAMURA-PALACIOS *et al*, 2011), motora (EDWARDS, 2009) e visual (PLOW *et al*, 2011), ainda que sejam necessários mais estudos básicos e clínicos para a padronização de protocolos terapêuticos.

Avanços na investigação científica em modelos animais e celulares, aliados a estudos clínicos, são imprescindíveis para esclarecer os substratos moleculares envolvidos nos efeitos das técnicas neuromoduladoras de estimulação cerebral de baixa intensidade. Futuramente, instrumentos inovadores poderão ser capazes de identificar subgrupos de pacientes biologicamente distintos, o que permitirá personalizar e aumentar a eficácia das terapias de estimulação cerebral. Desse modo, a pesquisa translacional, ou seja, protocolos em animais experimentais que fornecem subsídios teóricos para a melhor condução de estudos clínicos e para a investigação dos mecanismos subjacentes à neuroplasticidade, faz-se necessária.

Em particular, os mecanismos subjacentes aos efeitos da estimulação cortical relatados até agora não são bem compreendidos. A relação dose-resposta da modulação glutamatérgica nesses mecanismos ainda permanece lacunar.

Além disso, investigações neurofisiológicas, comportamentais, bioquímicas e genômicas são relevantes para a compreensão das influências da estimulação cerebral em estudos em animais e humanos. Isso pode fornecer bases sobre os mecanismos neurobiológicos subjacentes à neuroplasticidade e permitir a personalização de futuras aplicações clínicas.

### **1.5 Córtex pré-frontal**

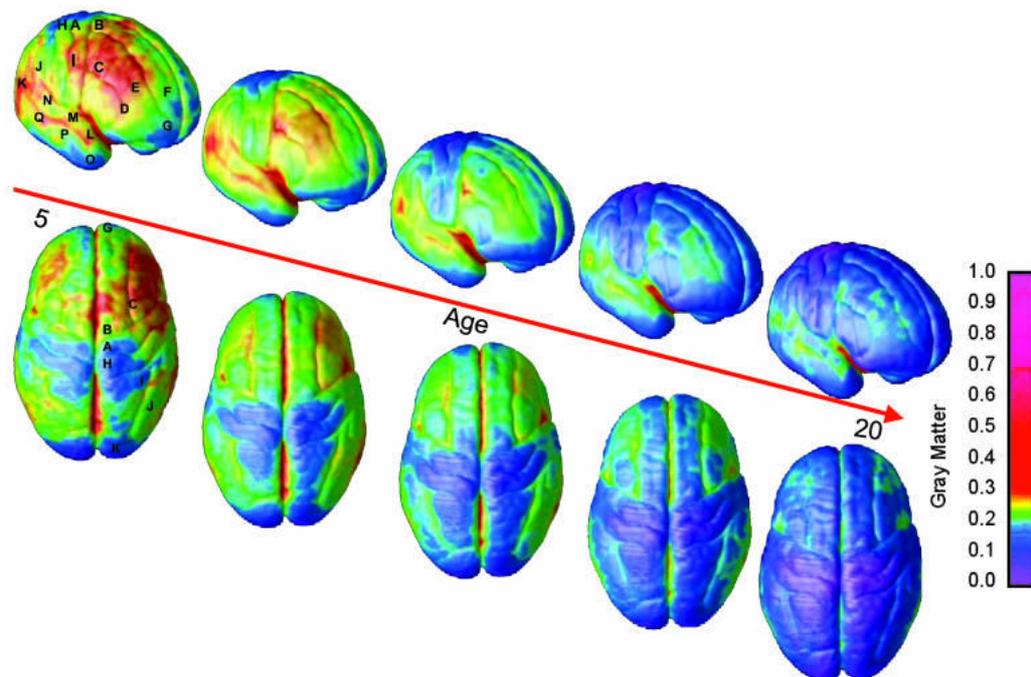
O córtex pré-frontal (CPF) permite o direcionamento de pensamentos e ações de acordo com as intenções do organismo, selecionando ações consistentes com os objetivos e o contexto (FUSTER, 2001). No CPF integram aferências de múltiplas áreas córtico-subcorticais e são agregados processos mentais envolvidos na aquisição de conhecimento e compreensão, incluindo lembrança, julgamento, concentração e solução de problemas, que são funções de elevada complexidade abrangendo a linguagem, a imaginação, a percepção, a aprendizagem, o raciocínio e o planejamento (FUSTER, 2001; NAKAMURA-PALACIOS, 2011; WOOD; GRAFMAN, 2003). Segundo Fuster (2001), o CPF constitui o nível mais alto da hierarquia cortical dedicada à percepção e à ação.

Sob a perspectiva evolutiva, na medida em que o córtex cerebral torna-se progressivamente maior, a sua porção frontal passa a ocupar em torno de um terço do cérebro humano (MCBRIDE; ARNOLD; GUR, 1999), exercendo um controle muito maior sobre as várias funções cerebrais e mostrando que a evolução do CPF é paralela à evolução da cognição

(JONES, 2002). O CPF humano não é necessariamente maior que de outros primatas (SEMENDEFERI *et al*, 2002), mas suas conexões são provavelmente mais sofisticadas e complexas (WOOD; GRAFMAN, 2003).

No homem, o CPF é claramente um córtex de maturação tardia (HUTTENLOCHER; DABHOLKAR, 1997). A maturação cortical ocorre em sentido caudal-rostral, da porção medial para a lateral, de modo que o CPF é a última porção a se desenvolver e não atinge a plena maturidade até a adolescência, continuando a amadurecer até em torno dos 30 anos de idade (SOWELL *et al*, 1999). Isto pode estar subjacente à melhora das habilidades cognitivas complexas em função da idade (FUSTER, 2001).

Gogtay *et al* (2004) realizaram um estudo prospectivo em crianças e adolescentes e analisaram a evolução temporal do desenvolvimento da substância cinzenta cortical, por meio de escaneamentos de ressonância magnética (Figura 4). Os resultados revelaram que os córtices de associação de ordem superior só amadurecem depois dos córtices somatossensoriais e visuais de ordem inferior e as áreas cerebrais filogeneticamente mais antigas amadurecem mais cedo do que as mais novas (GOGTAY *et al*, 2004).



**Figura 4** – Vistas lateral direita e superior de imagens de ressonância magnética cerebral, exibindo a sequência de maturação da substância cinzenta sobre a superfície cortical, dos 5 aos 20 anos de idade. A barra lateral mostra uma representação de cores em unidades de volume de substância cinzenta. Extraído de Gogtay *et al* (2004), sob permissão.

Fatores externos, como o abuso de álcool e outras drogas, podem prejudicar a maturação e o funcionamento do CPF (KOOB; VOLKOW, 2010; NAKAMURA-PALACIOS, 2011). Disfunções neuroplásticas no CPF são evidentes em desordens como esquizofrenia, transtorno bipolar, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, doença de Alzheimer e autismo (GOTO; YANG; OTANI, 2010).

### *1.5.1 Divisão neuroanatômica funcional do córtex pré-frontal*

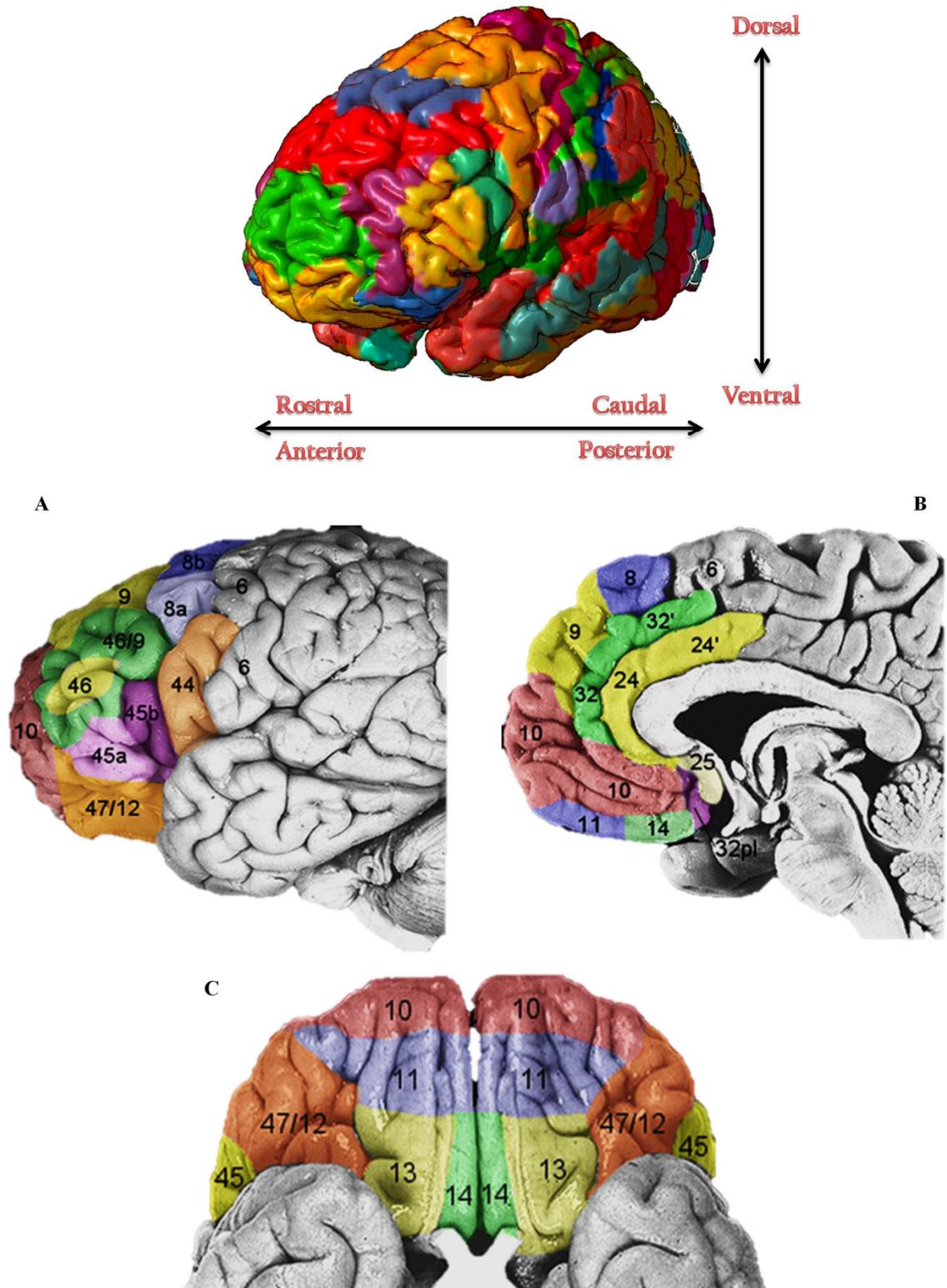
Para melhor compreensão das funções do CPF, serão consideradas as orientações (Figuras 5 e 6): rostral e caudal; medial e lateral; dorsal e ventral; esquerda e direita e subdivisões específicas (córtex pré-frontal dorsolateral, córtex orbitofrontal e córtex cingulado anterior).

Segundo Badre (2008), há uma hierarquia rostro-caudal no CPF. A porção mais rostral encontra-se temporalmente distante do evento final e processa as representações mais abstratas e complexas, enquanto a projeção caudal do CPF, temporalmente próxima do evento final, processa ações mais concretas.

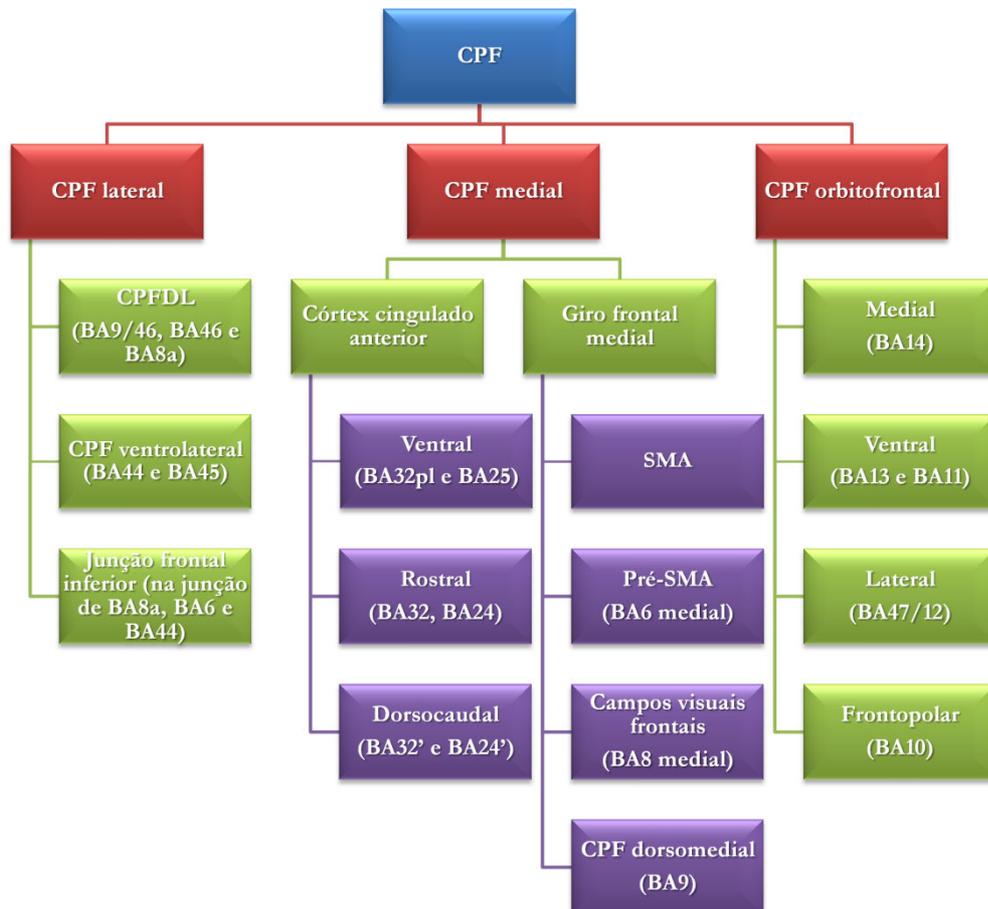
As funções do CPF podem ser também compreendidas pelas suas conexões com outras regiões do cérebro em uma orientação lateral ou medial (WOOD; GRAFMAN, 2003). Segundo Wood e Grafman (2003), o CPF ventromedial tem conexões recíprocas com a amígdala, associadas ao processamento emocional, ao hipocampo, relacionado com a memória e áreas temporais de associação, relacionadas com o processamento sensorial de alta complexidade, bem como com o CPFDL. O CPF ventromedial, portanto, suporta funções que envolvem a integração de informações entre emoção, memória e estímulos ambientais (WOOD; GRAFMAN, 2003), ou seja, influências guiadas pela emoção na seleção da ação (RIDDERINKHOF *et al*, 2004). Lesões frontais mediais comumente levam à perda da espontaneidade e dificuldade na iniciação de movimentos e fala (VERFAELLIE; HEILMAN, 1987). Adicionalmente, pacientes com lesões nessas áreas são geralmente apáticos e incapazes de sustentar a atenção (FUSTER, 2001). Em contraste, o CPF lateral e suas conexões processam a integração temporal das informações para a realização de estratégias prospectivas (FUSTER, 2001).

Quanto à orientação dorsal e ventral do CPF, Smith e Jonides (1999) sugeriram que o CPF é organizado pela modalidade das informações que processa. O armazenamento da informação de ordem espacial (“Onde?”) parece ser representado mais dorsalmente, enquanto as

características dos objetos (“O quê?”) ativaria regiões mais ventrais (SMITH; JONIDES, 1999). Também parece estar organizado por processamento de funções (BADRE, 2008), sendo que as regiões ventrolaterais processam operações de complexidade de primeira ordem relativas às propriedades dos itens (por exemplo, “Qual é a cor?”) e as regiões dorsolaterais proveriam a manipulação ativa destas informações armazenadas, processando operações de complexidade de segunda ordem relativas às categorias de itens (por exemplo, “Esta cor combina com qual?”).



**Figura 5** – Demarcações corticais segundo o mapa citoarquitetônico de Brodmann. Acima, imagem em 3D das áreas de Brodmann, por Mark Dow (sob permissão). Abaixo, destaque para as áreas de Brodmann do córtex pré-frontal, em perspectiva lateral (A), medial (B) e ventral (C), adaptado de Ridderinkhof *et al* (2004), sob permissão.



**Figura 6** – Divisão neuroanatômica do córtex pré-frontal humano pelo mapa citoarquitetônico de Brodmann, segundo Ridderinkhof *et al* (2004). BA44 e BA45 do CPF ventrolateral correspondem ao *pars opercularis* e *pars triangularis* do giro frontal inferior, respectivamente; BA47/12 do CPF orbitofrontal lateral corresponde ao *pars orbitalis* do giro frontal inferior. Embora o córtex cingulado anterior seja uma zona de transição entre o córtex límbico e frontal, os autores o incluíram devido às suas funções no controle cognitivo em redes frontais. BA: área de Brodmann; CPF: córtex pré-frontal; CPF DL: córtex pré-frontal dorsolateral e SMA: área motora suplementar.

Finalmente, a lateralidade pode ser constatada a partir de observações em que o hemisfério esquerdo (CPF DL esquerdo) está relacionado com a organização da resposta em processos executivos, com menor capacidade de armazenamento de itens em comparação com o hemisfério direito (CPF DL direito), que é reservado à manutenção de informações e armazenamento de mais de três itens (VOLLE *et al*, 2005). De fato, um dos aspectos mais desconcertantes do controle cognitivo é a sua capacidade de armazenamento severamente limitada (COWAN, 2001).

Cummings (1993) sugeriu a existência de três circuitos fronto-subcorticais originários no CPF: CPF DL, córtex orbitofrontal (COF) e córtex cingulado anterior (CCA). Lesões em cada um desses circuitos produzem um distúrbio comportamental distinto: lesões no CPF DL estão

relacionadas à síndrome disexecutiva, lesões do COF à desinibição e no CCA à apatia (CUMMINGS, 1993; FUSTER, 2001).

No CPFDL ocorrem conexões recíprocas com áreas associadas com o controle motor (gânglios da base, córtex pré-motor, córtex motor suplementar), com áreas que monitoram o desempenho (CCA) e com o processamento sensorial de alta complexidade (áreas de associação, córtex parietal) (WOOD; GRAFMAN, 2003). O CPFDL e as suas conexões sustentam o controle, a regulação e a integração das atividades cognitivas (WOOD; GRAFMAN, 2003). Fuster (2001) propôs que o CPFDL é crítico na integração temporal do comportamento, mantendo o contexto para um objetivo, seja no comportamento, raciocínio ou discurso. Medeia a atenção, controla a distratibilidade, provê flexibilidade mental e está envolvido na fluência verbal e não-verbal (POWELL; VOELLER, 2004). Especificamente, sua capacidade de manipular representações visuoespacialmente dispostas possibilita a avaliação e o ajuste da compreensão causal para servir as necessidades de curto e longo prazo (BARBEY; KRUEGER; GRAFMAN, 2009).

Portanto, lesões no CPFDL caracterizam-se pela síndrome disexecutiva: uma incapacidade para manter a flexibilidade, com um comportamento rígido e perseverante, estratégias organizacionais pobres para as tarefas de aprendizagem e anormalidades na programação motora, exibindo deficiências na alternância de movimentos em tarefas motoras sequenciais (CUMMINGS, 1993; FUSTER, 2001).

O COF é definido como a área do CPF que recebe projeções do núcleo medial magnocelular do tálamo mediodorsal (KRINGELBACH, 2005). O COF deve ser considerado no contexto das suas extensas relações recíprocas com estruturas límbicas, autonômicas e outras áreas neocorticais (FUSTER, 2001). Suas conexões com o hipocampo e a amígdala fornecem ao COF o acesso a processos mnemônicos e emocionais, agregando a experiência e os sinais corporais à tomada de decisão, por exemplo (KRINGELBACH, 2005). Esta é a base para a hipótese do marcador somático que propõe que os sinais de respostas regulatórias, destinados à manutenção da homeostase, são essenciais para os cenários comportamentais sócio-emocionais (DAMASIO, 1996). Dessa forma, o COF parece ser especialmente importante para o processamento, avaliação e filtragem (inibição) de informações emocionais e autonômicas e mostra que a emoção pode ter uma profunda influência sobre as funções cognitivas (FUSTER, 2001; KRINGELBACH, 2005). Adicionalmente, ele atua na modulação do comportamento social, incluindo aspectos de empatia, moralidade e autocontrole

(POWELL; VOELLER, 2004), além de estar envolvido na vinculação do alimento e outros tipos de recompensa à experiência hedônica (KRINGELBACH, 2005).

A síndrome orbitofrontal é caracterizada por mudanças marcantes na personalidade (CUMMINGS, 1993; FUSTER, 2001), como foi descrita no caso de Phineas Gage (HARLOW, 1848). A desinibição comportamental é evidenciada, podendo estar associada à euforia, irritabilidade e transtorno de atenção (FUSTER, 2001). Pode ocorrer imitação automática de gestos de outras pessoas ou a utilização de objetos no ambiente por imitação, refletindo a dependência de estímulos ambientais (CUMMINGS, 1993). Também se tornou claro que o COF está envolvido nos transtornos depressivos (DREVETS, 2001) e na adição (VOLKOW; LI, 2004).

O CCA envia e recebe projeções de praticamente todas as áreas do CPF (RIDDERINKHOF *et al.*, 2004). O CCA rostral e o dorsocaudal conectam-se com o CPFDL (KOSKI; PAUS, 2000). O CCA ventral conecta-se com o COF ventral, uma conexão implicada no controle da respiração, pressão sanguínea e outras funções autonômicas (BARBAS; PANDYA, 1989). O CCA rostral possui densas conexões recíprocas com o COF ventromedial e o COF frontopolar (ÖNGÜR; PRICE, 2000). O CCA está envolvido na regulação do sistema nervoso autônomo, orientação de respostas compensatórias, detecção de conflitos, ativação adicional do alerta (“*arousal*”) para atender e resolver conflitos, iniciação, monitoramento e manutenção de comportamentos e é crítico na atenção, emoção e motivação (POWELL; VOELLER, 2004). Desse modo, o CCA monitora o seu próprio comportamento e guia respostas compensatórias (POWELL; VOELLER, 2004). O CCA é requisitado em tarefas que exigem esforço sustentado e atenção concentrada (POSNER *et al.*, 1988). Tal evidência levou à formulação de um “sistema atencional anterior” (POSNER; PETERSEN, 1990), em que o CCA é um componente essencial.

A síndrome do cingulado anterior é tipicamente caracterizada por apatia e desatenção, enquanto grandes lesões bilaterais provocam mutismo acinético (CUMMINGS, 1993; FUSTER, 2001).

Dado o exposto, embora as divisões neuroanatômicas do CPF pareçam ter funções específicas, interpretações frenológicas reducionistas devem ser evitadas, a fim de se compreender a articulação entre elas e subsequentes coativações nas múltiplas funções cognitivas.

### 1.5.1.1 Projeções e convergência de informações no córtex pré-frontal

Todas as áreas do CPF são densamente interconectadas entre níveis corticais e subcorticais (MILLER; COHEN, 2001), como seria exigido para uma área cerebral responsável pela orquestração do comportamento adaptativo. As subdivisões do CPF têm padrões de conexões parcialmente únicos, ainda que por vezes sobreponíveis, o que sugere as especializações sub-regionais (MILLER; COHEN, 2001).

Conexões do tronco encefálico, diencéfalo e sistema límbico transmitem ao CPF informações sobre o ambiente interno, o nível de excitação e o contexto emocional (FUSTER, 2001). A maioria das aferências tálamo-corticais origina-se do núcleo mediodorsal (BARBAS; HENION; DERMON, 1991) e termina na camada IV do CPF (GIGUERE; GOLDMAN-RAKIC, 1988). Há também aferências ao CPF provenientes dos núcleos talâmicos pulvinar, ventral anterior, intralaminar e da linha média (BARBAS; HENION; DERMON, 1991), e projetam-se para as camadas I e V do CPF. Em contrapartida, o CPF também se projeta para o tálamo, principalmente a partir da camada VI, embora algumas células da camada V estejam envolvidas (GIGUERE; GOLDMAN-RAKIC, 1988).

Projeções corticoestriatais são topograficamente organizadas, mas há certas sobreposições provenientes de diferentes sub-regiões pré-frontais, o que sugere uma integração de informações (KHAN; MULY, 2011). As sub-regiões do CPF enviam e recebem conexões altamente organizadas com os gânglios da base, através de alças córtico-estriato-pálido-tálamo-corticais e córtico-pálido-nigro-tálamo-corticais (GROENEWEGEN; WRIGHT; UYLINGS, 1997).

Há projeções recíprocas dopaminérgicas mensencefálicas envolvendo a área tegmental ventral, proporcionando uma via potencial para o CPF regular diretamente sua provisão dopaminérgica (KHAN; MULY, 2011). De fato, o CPF pode controlar praticamente todas as estruturas subcorticais, pela modulação de sistemas colinérgicos, dopaminérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos, através de uma projeção glutamatérgica direta, ou inibindo as mesmas estruturas, pela ativação de interneurônios locais gabaérgicos (FUSTER, 2001).

Como córtex associativo multimodal, o CPF recebe amplas projeções corticais (KHAN; MULY, 2011). Citam-se as áreas corticais temporais inferiores e parietais posteriores, associadas com o reconhecimento de objetos e o processamento visuoespacial, respectivamente (VAN ESSEN; ANDERSON; FELLEMAN, 1992). Essas duas vias visuais

terminam no CPF ventrolateral e CPFDL, respectivamente (KHAN; MULY, 2011). O CPF não está conectado com córtices primários sensoriais ou motores (FUSTER, 2001), mas tem amplas conexões com áreas pré-motoras que, por sua vez, enviam projeções para o córtex motor primário e a medula espinhal (RIDDERINKHOF *et al*, 2004).

Cada uma das três principais regiões pré-frontais (Figura 6) conecta-se com ela própria e com as outras duas (JACOBSON; TROJANOWSKI, 1977). Algumas das conectividades corticocorticais do CPF é inter-hemisférica e quase todas são recíprocas (CAVADA; GOLDMAN-RAKIC, 1989). Um aspecto do circuito pré-frontal intrínseco é a interação entre interneurônios inibitórios gabaérgicos que influenciam a resposta de neurônios de projeção piramidais excitatórios (KHAN; MULY, 2011).

### *1.5.2 Divisão sub-regional do córtex pré-frontal do rato*

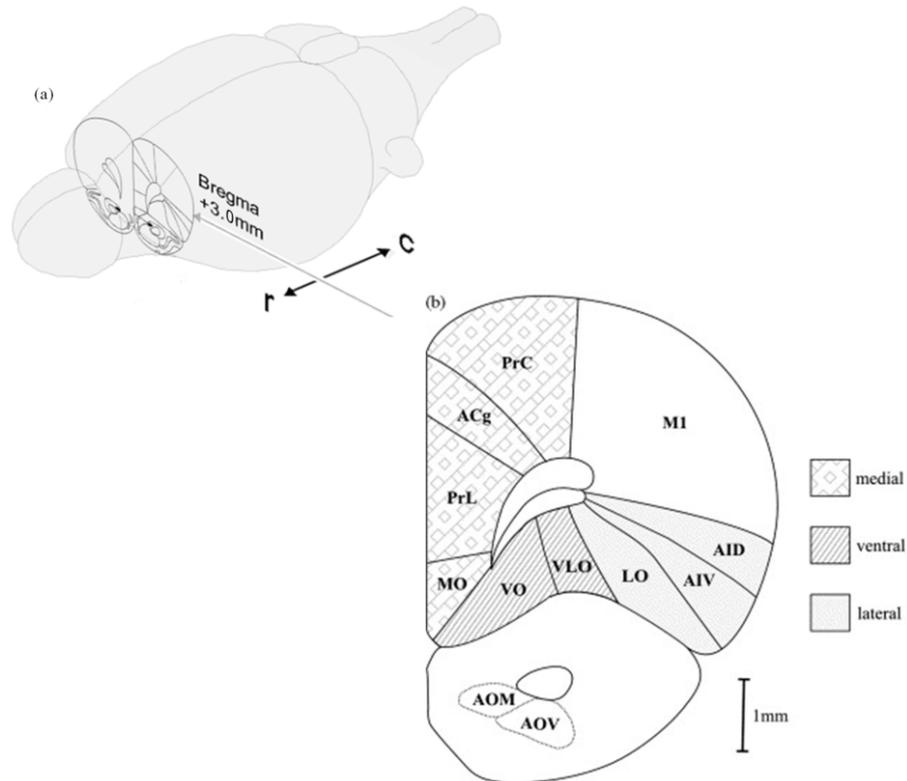
Assim como em pesquisas com seres humanos e primatas não humanos (WISE, 2008), a especialização regional do CPF em ratos permanece uma área de intenso debate (CAMPBELL; HODOS, 1970; KESNER; CHURCHWELL, 2011). O rato pode ser adequado para estudos das funções subjacentes ao CPF e esses modelos podem ser benéficamente utilizados no contexto de abordagens translacionais, embora se reconheça que as diferenças interespecies são uma condição implícita de estudos comparativos (KESNER; CHURCHWELL, 2011).

Campbell e Hodos (1970) sugerem que é possível avaliar homologias entre ratos, primatas não humanos e seres humanos, baseadas na citoarquitetura, na presença ou não de uma camada granular, projeções e alterações eletrofisiológicas do CPF em tarefas comportamentais, bem como mudanças de comportamento após lesões do CPF.

Baseando-se na citoarquitetura, o CPF do rato não possui uma camada granular e, portanto, possui apenas o córtex agranular (carece da camada IV). O mesmo córtex agranular é encontrado em macacos e seres humanos mas, em adição, há camada granular (WISE, 2008). Wise (2008) propõe que a proeminente camada granular corresponde a uma evolução cortical que passou a dominar o lobo frontal dos primatas.

As sub-regiões do CPF do rato (Figura 7), organizadas com base na citoarquitetura e conectividade, são basicamente constituídas pelas porções medial (córtex pré-central, córtex

cingulado anterior, córtex pré-límbico, córtex orbital medial), ventral (córtex orbital ventral, córtex orbital ventrolateral) e lateral (córtex orbital lateral, córtex insular agranular ventral, córtex insular agranular dorsal) (DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004).



**Figura 7** – Diagrama esquemático da diferenciação sub-regional do córtex pré-frontal do rato. Em (a), desenho do cérebro do rato, em secção coronal (Bregma 3.0 mm), adaptado de Swanson (1998). Em (b), secção coronal unilateral, com destaque para as subdivisões do córtex pré-frontal do rato, em medial (PrC: córtex pré-central, ACg: córtex cingulado anterior, PrL: córtex pré-límbico, MO: córtex orbital medial), ventral (VO: córtex orbital ventral, VLO: córtex orbital ventrolateral) e lateral (LO: córtex orbital lateral, AIV: córtex insular agranular ventral, AID: córtex insular agranular dorsal), extraído de Dalley, Cardinal e Robbins (2004), sob permissão.

É possível assumir que existem componentes homólogos sub-regionais do CPF entre ratos e seres humanos (KESNER; CHURCHWELL, 2011). Segundo Kesner e Churchwell (2011), para a região dorsal medial, incluindo os córtices pré-central e cingulado anterior, as regiões homólogas foram classificadas como áreas 6 e 24 de Brodmann, respectivamente. Para o CPF ventral medial, incluindo as áreas pré-límbica e infralímbica bem como os córtices orbitais mediais, as regiões homólogas foram rotuladas como área 32 de Brodmann (córtex pré-límbico) e área 25 de Brodmann (córtex infralímbico). Para o CPF lateral, que inclui os córtices insular agranular dorsal e ventral e os orbitais laterais, as regiões homólogas foram

classificadas como áreas 13 e 14 de Brodmann. Finalmente, para o CPF ventral, que inclui os córtices orbitais ventral e ventrolateral, foram classificados como área 11 de Brodmann.

É evidente que o CPF de roedores não fornece nem a complexidade anatômica nem cognitiva existente em cérebros de humanos ou de primatas não humanos. Ele fornece um sistema mais simples para o estudo, enquanto sustenta muitas características complexas que são de interesse para a compreensão das bases neurobiológicas dos processos cognitivos (KESNER; CHURCHWELL, 2011).

### *1.5.3 Funções do córtex pré-frontal*

O CPF não é crítico para a realização de comportamentos simples e automáticos, como a tendência à orientação automática a um som ou movimento inesperado. Esses comportamentos são inatos ou podem desenvolver-se gradualmente com a experiência como mecanismos aprendidos (MILLER; COHEN, 2001; RIDDERINKHOF *et al*, 2004). Todavia, são comportamentos inflexíveis, não demandam atenção, são reações ditas estereotipadas e resistem à generalização para novas situações (RIDDERINKHOF *et al*, 2004). Quando a ação é flexível, planejada e ativamente selecionada em direção a um objetivo, ou quando o comportamento é guiado por representações internas de regras, metas ou intenções, o CPF é requisitado (DIAMOND, 2013; FUSTER, 2001; MILLER; COHEN, 2001; NAKAMURA-PALACIOS, 2011; POSNER; PETERSEN, 1990; RIDDERINKHOF *et al*, 2004; WOOD; GRAFMAN, 2003).

Desde os primeiros relatos dos efeitos de lesões no lobo frontal, tem sido sugerida a sua função na atenção e no controle do comportamento (BIANCHI, 1922 apud MILLER; COHEN, 2001; FERRIER, 1876 apud MILLER; COHEN, 2001). Pacientes com lesões no CPF raramente exibem sintomas evidentes relacionados com a função mnemônica ampla ou inteligência (JONES, 2002). O comportamento impulsivo, inadequado ou desorganizado é uma marca da disfunção do CPF nos seres humanos (HARLOW, 1848; CUMMINGS, 1993; FUSTER, 2001).

Desse modo, o CPF deve ser posicionado em um contexto crucial na orquestração do comportamento adaptativo, nomeadamente por meio do seu envolvimento nas funções executivas. Os principais processos que definem as funções executivas incluem o controle

inibitório, a atenção seletiva, a memória operacional e a flexibilidade cognitiva (DIAMOND, 2013; HOFMANN; SCHMEICHEL; BADDELEY, 2012; KESNER; CHURCHWELL, 2011). Adicionalmente, funções executivas de nível superior incluem o raciocínio, a resolução de problemas e o planejamento (DIAMOND, 2013). A resolução de problemas e o raciocínio (ou também denominado inteligência fluida) envolvem a habilidade de se conduzir relações abstratas subjacentes a analogias, incluindo o raciocínio lógico indutivo e dedutivo (DIAMOND, 2013).

O controle inibitório é postulado como um dos mecanismos pelos quais o CPF exerce seus efeitos coordenados em processos subsidiários para aprimorar o comportamento (HOFMANN; SCHMEICHEL; BADDELEY, 2012; RIDDERINKHOF *et al*, 2004), como na memória operacional. O controle inibitório inclui o controle da atenção, do comportamento, dos pensamentos e emoções, com foco na execução do que é mais adequado ou necessário (DIAMOND, 2013; HOFMANN; SCHMEICHEL; BADDELEY, 2012). O controle inibitório da atenção proporciona a atenção seletiva, com supressão da atenção a estímulos interferentes e indesejados, além da resistência a representações mentais prepotentes, denominada inibição cognitiva (DIAMOND, 2013).

A tomada de decisão é resultante da integração entre informações mnemônicas, da experiência, afetivas e motivacionais que selecionam a resposta após a resolução da concorrência entre as informações disponíveis (WOOD; GRAFMAN, 2003). Os principais processos constituintes do controle cognitivo envolvidos na tomada de decisão e dependentes do CPF são: o comportamento dirigido a um alvo, a inibição cognitiva, o monitoramento do desempenho e o aprendizado guiado pela recompensa (HOFMANN; SCHMEICHEL; BADDELEY, 2012; RIDDERINKHOF *et al*, 2004).

No comportamento dirigido a um alvo, é importante que haja um meio de monitorar continuamente o progresso, sobretudo em uma perspectiva evolutiva. Especificamente, se é detectado um erro de desempenho, ou se o alvo não é alcançado, vias de *feedback* podem ser ativadas, resultando em uma flexibilidade cognitiva de forma que oriente a mudança para uma estratégia alternativa, ou que se proceda um aprimoramento no controle (MILLER; COHEN, 2001). Dessa forma, o CPF deve manter a sua atividade de forma robusta à interferência das distrações até que um objetivo seja alcançado, mas também ser suficientemente flexível para atualizar suas contingências, quando necessário (HOFMANN; SCHMEICHEL; BADDELEY, 2012; MILLER; COHEN, 2001).

Nesse cenário, não é surpreendente que a plasticidade e a supramodalidade sejam também características do CPF. Quando um sucesso procede a um comportamento, sinais de reforço seletivamente fortalecem os padrões neurais de atividade que predizem a recompensa e que orientam o comportamento necessário para alcançá-lo (MILLER; COHEN, 2001; RIDDERINKHOF *et al*, 2004). Com a reverberação dessas vias pela repetição do comportamento, a representação cortical pré-frontal é modificada em favor do aprendizado.

A supramodalidade é conferida pelo fato de que o CPF recebe sinais de todas as modalidades sensoriais processadas por outras redes primárias e também informações sobre o estado emocional e autonômico internos relacionados às memórias relevantes de eventos anteriormente consolidados e armazenados (POWELL; VOELLER, 2004). Tipicamente, o planejamento ocorre em antecipação ao comportamento que ele governa (MILLER; COHEN, 2001; SAKAI, 2008). Para isso, a supramodalidade do CPF permite a integração de associações de aprendizagem, regras e contingências, entre estímulos, memórias e comportamentos, por vezes separados temporalmente, mas seus padrões de atividade são requisitados e mantidos ativamente para representar um pensamento, uma decisão ou uma ação dirigida a um objetivo (SAKAI, 2008). Durante essa manutenção ativa, são pré-ativadas modalidades sensoriais, bem como sistemas responsáveis pela execução da resposta, como representações corticais motoras, a avaliação emocional, dentre outros, mesmo antes da execução da resposta, pelo tempo que essas representações são exigidas (CURTIS; LEE, 2010; SAKAI, 2008).

A capacidade de suportar a atividade sustentada em face da interferência é uma das características distintivas do CPF. Atividade neuronal sustentada no CPF foi primeiramente relatada por Fuster e Alexander (1971) e Kubota e Niki (1971) e evidências subsequentes foram relatadas (CURTIS; LEE, 2010).

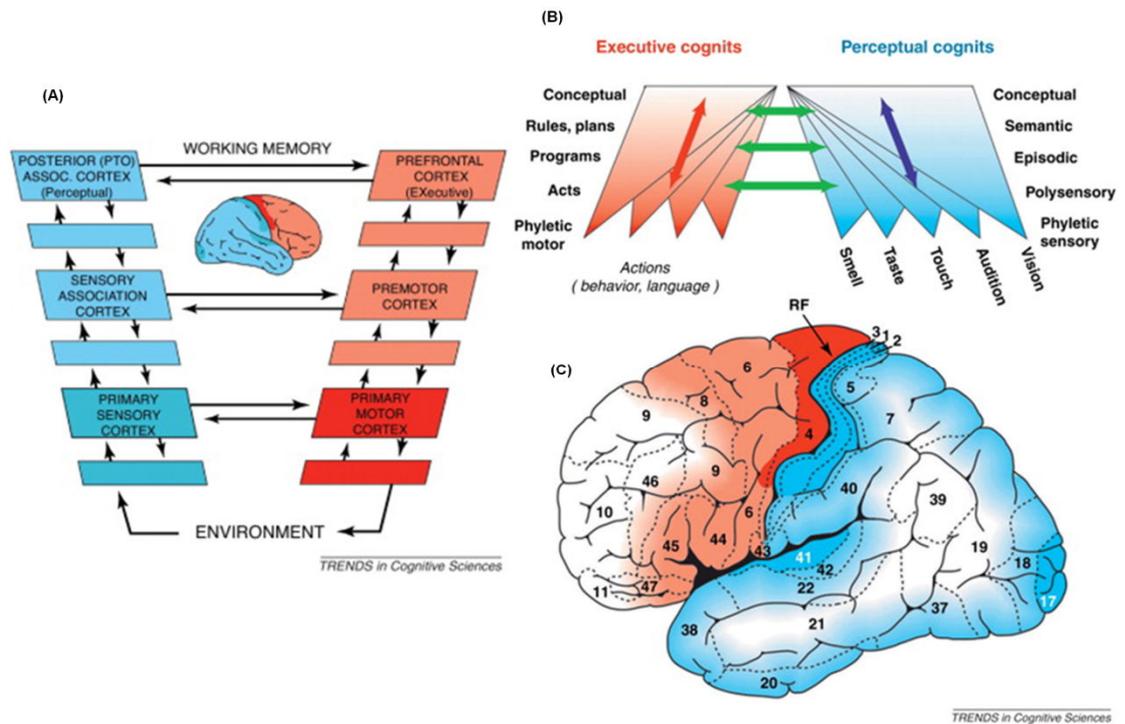
A literatura empírica acerca do CPF é dominada por teorias explicativas do seu funcionamento. A seguir, será abordado o modelo hierárquico do ciclo percepção-ação (FUSTER, 2001).

Jakob von Uexküll – o teórico do *Umwelt* – descreveu o ciclo sensório-motor através do qual um animal modifica o ambiente, modificando assim a sua própria percepção do ambiente, o que leva a outra ação sobre o ambiente, e assim por diante, até que um determinado objetivo seja alcançado (UEXKÜLL, 1926 apud FUSTER; BRESSLER, 2012). No animal primitivo, este ciclo é circular, com *feedback* interno limitado entre as eferências motoras e os receptores

sensoriais (FUSTER; BRESSLER, 2012). Em organismos mais complexos, como no homem, esse *feedback* ocorre em vários níveis de percepção e ação. O ciclo sensorio-motor primitivo, portanto, foi substituído, por um ciclo hierárquico de percepção-ação no homem, que inclui estruturas mais avançadas filogeneticamente e ontogeneticamente, incluindo o CPF (FUSTER, 2001, 2004).

O ciclo percepção-ação (FUSTER, 2001) é um princípio biológico básico que regula as relações funcionais do organismo com o seu ambiente por meio de interações circulares contínuas entre o ambiente e os processos perceptuais orientados para a ação (Figura 8). Ações automáticas e bem ensaiadas em resposta a estímulos simples são integradas em níveis corticais baixos do ciclo, em áreas sensoriais posteriores e em áreas motoras. Comportamento mais complexo, guiado por estímulos mais complexos e temporalmente remotos, exige a integração de níveis corticais mais elevados de hierarquias perceptuais (córtex de associação parieto-occipito-temporal) e executivas (CPF). Adicionalmente, o processamento flui com *feedback* bidirecional em todos os níveis. Assim, em níveis corticais, a informação flui de forma circular através de uma série de áreas organizadas hierarquicamente e conexões que constituem o ciclo percepção-ação (FUSTER, 2001, 2004, 2009; FUSTER; BRESSLER, 2012).

Fuster (2001, 2004) propõe que o CPF organiza temporalmente o comportamento e propõe mecanismos para o monitoramento, memória e seleção atencional que prioriza metas e garante que as sequências comportamentais sejam realizadas na ordem correta (controle *top-down*). Para cumprir esta função, o CPF manipula os itens na memória com a finalidade de planejar, organizar e processar a informação necessária para gerar pensamentos ou ações futuras. Adicionalmente, Fuster (2009) postula que no córtex, tal como no restante do cérebro, não há “sistemas de memória”, mas sim uma memória de sistemas. Segundo ele, todos os sistemas corticais têm a sua própria memória, indissociável das operações que executam. O substrato para o processo é inseparável do substrato para a representação (FUSTER, 2009). Fuster aprimorou o seu modelo teórico e propôs que a essência do mecanismo é a ativação de “cognitos” (*cognits*) perceptuais e executivos, que consistem em redes corticais interativas, distribuídas e sobrepostas que representam unidades de memória ou conhecimento (FUSTER, 2009; FUSTER; BRESSLER, 2012) (Figura 8).



**Figura 8** – O ciclo percepção-ação. (A) Paradigma do ciclo percepção-ação no córtex do primata. Retângulos vazios representam subáreas ou áreas intermediárias. As setas indicam a direção das conexões anatomicamente verificadas. Setas maiores, em sentido horário, constituem as principais ligações de processamento funcionais do ciclo, através das hierarquias perceptuais e executivas. Setas menores, em sentido anti-horário, constituem *feedback* córtico-cortical interno. A seta em sentido horário e o *feedback* de reentrada entre os córtices pré-frontal e posterior de associação (PTO: parieto-occipito-temporal), no topo do ciclo, envolvem os córtices em funções cognitivas integrativas, como a memória operacional. (B e C) Organização hierárquica de cognitos no córtex cerebral. Cognitos perceptuais são organizados hierarquicamente entre áreas sensoriais primárias (azul) e o córtex de associação posterior (branco) por ordem de categoria de memória perceptual. Cognitos executivos são organizados hierarquicamente entre o córtex motor primário (vermelho) e o córtex pré-frontal (branco), por ordem de categoria de memórias executivas. (B) Ordem hierárquica de cognitos perceptuais e executivos. Setas bidirecionais indicam a conectividade córtico-cortical: perceptual (azul escuro), executiva (vermelho), e perceptual-executiva (verde). Os triângulos invertidos simbolizam a divergência de conexões e o tamanho aumentado de cognitos com a ordem hierárquica ascendente. (C) Vista lateral do hemisfério esquerdo, com os mapeamentos de Brodmann. RF: fissura rolândica. Extraído de Fuster e Bressler (2012), sob permissão.

### 1.5.3.1 Córtex pré-frontal medial

Evidências acumuladas inserem o córtex pré-frontal medial (CPFm) no monitoramento de conflitos (BOTVINICK; COHEN; CARTER, 2004), detecção de erros (HOLROYD; COLES; NIEUWENHUIS, 2002), controle executivo (RIDDERINKHOF *et al*, 2004), aprendizagem guiada por recompensa (RUSHWORTH *et al*, 2011), tomada de decisão (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012) e memória (BONTEMPI *et al*, 1999).

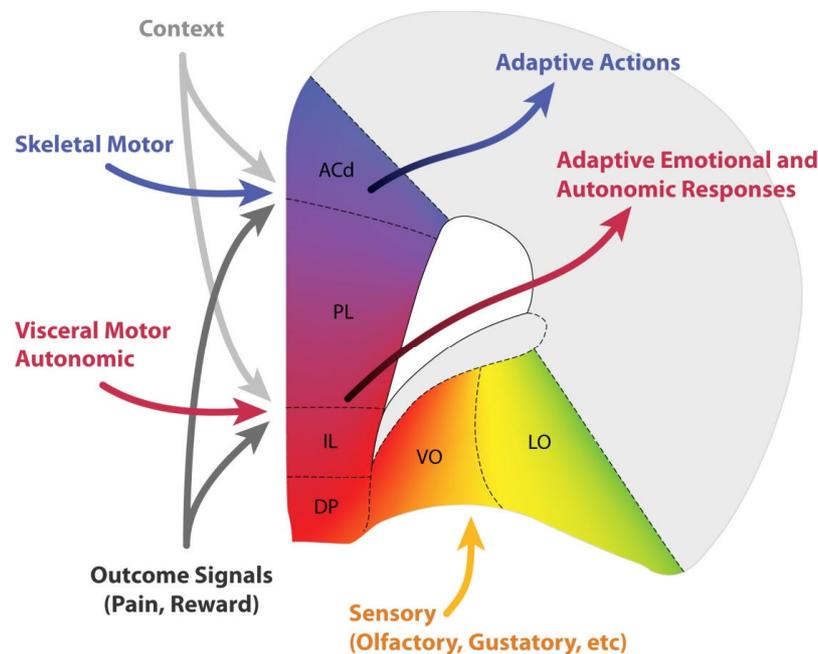
Euston, Gruber e McNaughton (2012) propõem que a função do CPFm é a de realizar associações entre contextos e eventos e selecionar as correspondentes respostas adaptativas, com subsequente aprendizado. Assim, o envolvimento ubíquo do CPFm tanto na memória e na tomada de decisão pode ser devido ao fato de que muitas tarefas implicam a capacidade de recordar a melhor ação em um determinado lugar e tempo (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012). Todavia, o que diferencia o CPFm de outras áreas do córtex não é a sua capacidade mnemônica, provavelmente compartilhada por outras áreas corticais, mas sim o seu envolvimento particular na orientação do comportamento adaptativo, promovido pelas suas exclusivas aferências e eferências (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; FUSTER, 2001).

Adicionalmente, o CPFm é fortemente modulado por eventos motivacionalmente salientes, positivos e negativos. No CPFm do roedor, os neurônios são capazes de alterar suas taxas de disparo na presença da recompensa ou da sua expectativa (PRATT; MIZUMORI, 2001). Similarmente ao restante do CPF, há um gradiente dorsoventral no CPFm do roedor, onde regiões ventrais, incluindo os córtices pré-límbico ventral e infralímbico, são especializados no controle autonômico e emocional e as regiões dorsais, incluindo o CCA e o córtex pré-límbico dorsal, são especializados no controle de ações (GABBOTT *et al*, 2005; HEIDBREDEDER; GROENEWEGEN, 2003). De fato, com base na sua conectividade, o CPFm ventral tem sido caracterizado como o “córtex visceral motor” (NEAFSEY *et al*, 1993).

O CPFm ventral está fortemente interligado com áreas insulares anteriores, conhecidas por estarem envolvidas na interocepção (ALLEN *et al*, 1991) e na percepção à dor (JASMIN *et al*, 2004). O CPFm ventral comunica-se com o hipotálamo, o qual medeia a homeostasia e coordena sistemas autonômicos e endócrinos (SAPER, 2003). Outra conexão proeminente é com a substância cinzenta periaquedutal, uma região envolvida na agressão, no comportamento defensivo e na modulação da dor (NELSON; TRAINOR, 2007). O CPFm ventral também fornece uma eferência cortical para a habênula lateral, envolvida em respostas aprendidas relacionadas à dor, estresse, ansiedade e recompensa (HIKOSAKA, 2010). Finalmente, o CPFm ventral tem ligações recíprocas com uma variedade de sistemas neuromoduladores, incluindo a rafe dorsal, a área tegmental ventral e o *locus coeruleus* (ITO; SUGIMOTO, 2010; KRANZ; KASPER; LANZENBERGER, 2010; MAIER; WATKINS, 2005; SCHULTZ, 2001).

As conexões do CPFm dorsal são semelhantes aos do CPFm ventral, exceto que o CPFm dorsal tem uma conectividade menos densa com centros emocionais e autonômicos e conectividade mais intensa com áreas motoras e pré-motoras (GABBOTT *et al*, 2005; HEIDBREder; GROENEWEGEN, 2003). O CPFm dorsal em ratos também projeta-se diretamente para a medula espinhal (GABBOTT *et al*, 2005).

Euston, Gruber e McNaughton (2012) sugerem que as aferências ao CPFm correspondem aos contextos (tempo, espaço, emoção) e eventos, enquanto suas eferências são respostas adaptativas preditoras dos resultados mais favoráveis numa dada situação (Figura 9). Sinais de *feedback* de resultados podem induzir mudanças sinápticas por meio de aprendizagem reforçada (HOLROYD; COLES; NIEUWENHUIS, 2002). Alternativamente, é sugerido que o CPFm compara os resultados reais com os previstos e calcula o grau de violação da expectativa, ou seja, a “surpresa”, igualmente convergindo à aprendizagem no CPFm (ALEXANDER; BROWN, 2011).



**Figura 9** – Diagrama esquemático simplificado dos sinais de entrada e saída das sub-regiões do córtex pré-frontal. O CPF medial integra e manipula os eventos e o contexto e seleciona a resposta mais adaptativa, que pode ser uma ação ou resposta emocional. Um conjunto separado de aferências fornece informações sobre os resultados das ações, que modulam a plasticidade. Todas as áreas frontais são fortemente interconectadas, o que significa que as informações sobre as ações, emoções e estímulos estão disponíveis para todas as áreas pré-frontais. ACd: cingulado anterior dorsal, PL: córtex pré-límbico, IL: córtex infralímbico, DP: córtex peduncular dorsal, VO: córtex orbital ventral e LO: córtex orbital lateral. Extraído de Euston, Gruber e McNaughton (2012), sob permissão.

Dado o exposto, o CPFm provavelmente manipula os estímulos que mapeiam o contexto e eventos e seleciona ações apropriadas, sob um controle *top-down*, em face da experiência adquirida (MILLER; COHEN, 2001).

## 1.6 Memória operacional

A memória operacional ou memória de trabalho refere-se à habilidade em manter um conjunto de informações ativas (“*online*”), querem elas sejam novas e/ou resgatadas de armazenamentos prévios, manipulando-as de forma a empregá-las para regular e/ou expressar um comportamento, um pensamento ou uma emoção (GOLDMAN-RAKIC, 1996; NAKAMURA-PALACIOS, 2011). Esse conceito difere de uma obsoleta definição de memória operacional como uma memória de curto prazo, ou seja, como apenas uma unidade de armazenamento temporário de informações, para uma definição mais complexa, envolvendo múltiplos subsistemas cognitivos (BADDELEY, 2003; YUAN *et al*, 2006) ou uma coleção de processos cognitivos (FLORESCO; PHILLIPS, 2001).

Primeiramente proposta por Miller, Galanter e Pribram (1960), a memória operacional envolve reter e manipular informações transitoriamente, quando já não perceptualmente presentes, a serviço da compreensão, raciocínio e planejamento (GOLDMAN-RAKIC, 1996). Ela abrange funções de armazenamento e processamento, frequentemente envolvidas em tarefas cognitivas cotidianas de várias etapas, com resultados intermediários que precisam ser retidos temporariamente (GOLDMAN-RAKIC, 1996). Aritmética mental, planejar uma sequência no jogo de xadrez, considerar alternativas, incorporar novas informações no pensamento e relacioná-las entre itens ou ideias, são exemplos de tarefas dependentes da memória operacional (DIAMOND, 2013; GOLDMAN-RAKIC, 1996).

Baddeley e Hitch (1974) propuseram um modelo multicomponente guiado por um componente mestre, o “executivo central”, concebido como um sistema de controle de capacidade atencional limitada, responsável pela manipulação da informação e pelo controle de dois sistemas subordinados: a “alça fonológica” e o “bloco de anotações visuoespaciais”, com a capacidade de armazenar informações relativas à linguagem (incluindo ensaio subvocal) e visuoespaciais, respectivamente, em estoques separados (FUNAHASHI, 2006; REPOVŠ; BADDELEY, 2006). Assim, a memória operacional estende analogia ao “bloco de anotações” ou esboço para incluir o armazenamento, ensaio e coordenação de informações

temporalmente distintas, mas interdependentes. Posteriormente, o “*buffer* episódico” foi proposto como um adendo ao modelo (BADDELEY, 2000). O *buffer* episódico é assumido como um armazenamento temporário e de capacidade mnemônica limitada, capaz de codificação multidimensional e que permite a ligação da informação para criar episódios integrados (BADDELEY, 2000).

Enquanto tal processamento mnemônico pode vir à tona durante a cognição de alto nível, isto é claramente relevante não só para o homem e primatas não humanos, mas também para espécies de ramos diferentes da cadeia evolutiva (JONES, 2002). Entretanto, o modelo de Baddeley e Hitch (1974) não é perfeitamente aplicável a roedores, diante da ausência de um sistema de processamento de representações linguísticas atribuíveis à alça fonológica.

Embora haja um certo consenso acerca dos dois sistemas subordinados citados, há um desacordo quanto à existência de um componente executivo central na sua estrutura (YUAN *et al*, 2006). Enquanto alguns pesquisadores aceitam a sua existência, outros não adotam a noção de um componente unitário de controle. Engle, Kane e Tuholski (1999) argumentaram que a atenção controlada é responsável pela função executiva. Em contraste, Barnard (1999) argumentou que a memória operacional envolve uma arquitetura multiprocessado que realizaria a função de controle executivo.

Em habilidades cognitivas complexas, o executivo central parece ser envolvido principalmente como uma fonte de controle atencional, permitindo o foco da atenção, a divisão da atenção entre tarefas concorrentes, estratégias de recuperação e como um componente de comutação atencional (DIAMOND, 2013; REPOVŠ; BADDELEY, 2006).

O modelo apresentado de Baddeley e Hitch (1974) como um sistema de múltiplos subsistemas cognitivos iniciou a era da decomposição da memória operacional em diferentes componentes (YUAN *et al*, 2006). Tal abordagem corrobora achados em primatas não humanos que indicam a possibilidade da existência de múltiplos domínios de memória operacional, com os seus próprios mecanismos de processamento especializado e de armazenamento (GOLDMAN-RAKIC, 1996).

A incorporação do *buffer* episódico permitiu explicar algumas variabilidades individuais quanto à capacidade de armazenamento (BADDELEY, 2001). O *buffer* episódico é capaz de integrar dados de fontes diversas, transformando-os em códigos multimodais (BADDELEY, 2000). Essa interface temporária entre sistemas mnésicos e perceptivos contribuiu para a

denominação de *buffer*, sendo também episódico devido ao fato da integração dos estímulos em episódios complexos (BADDELEY, 2000). Dessa forma, a memória operacional pode requisitar a memória de longo prazo, com o *buffer* episódico acessível à consciência (KHAN; MULY, 2011). De fato, Ericsson e Delaney (1999) empregaram o termo “memória operacional de longo prazo” para enfatizar a sua estreita relação com a memória de longo prazo.

A memória operacional é limitada em sua capacidade de armazenamento que pode ser tão reduzida quanto  $4 \pm 1$  itens, quando não são relacionáveis entre si (COWAN, 2001). Entretanto, segundo Motes e Rypma (2010), quando a informação a ser lembrada excede o limite de capacidade, processos executivos de memória operacional podem ser acionados para reorganizar os códigos de memória, permitindo o armazenamento e o gerenciamento de informações com maior conteúdo. Há de fato evidências de que tarefas cognitivas com demanda de memória superior a quatro ou cinco itens requisitam o CPFDL direito (VOLLE *et al*, 2005).

O *buffer* episódico, por sua vez, complementa essa definição com os processos de *binding* e *chunking* (BADDELEY, 2001). O *binding* explica o efeito da similaridade visual de itens verbais na sua memorização (LOGIE *et al*, 2000), enquanto o *chunking* refere-se à integração de unidades de informação, de modo a criar aglomerados maiores baseados na relação semântica, permitindo economia na demanda cognitiva de armazenamento. O *chunking* pode esclarecer o fenômeno da superioridade na memorização de frases, em comparação com palavras isoladas, em que os itens recuperados adicionalmente na primeira condição não poderiam ser explicados por uma codificação puramente fonológica, mas adviriam da ligação à memória de longo prazo, possibilitando a agregação da informação em unidades maiores (BADDELEY, 2000, 2001; REPOVŠ; BADDELEY, 2006).

Ainda que a decomposição da estrutura da memória operacional pelo modelo de Baddeley e Hitch (1974) tenha fornecido uma imagem detalhada do seu funcionamento, trata-se de um modelo meramente conceitual e não baseado na estrutura (YUAN *et al*, 2006). Por outro lado, evidências acumuladas convergem no sentido de que a memória operacional é um produto de interações sustentadas entre a regulação cortical pelo controle *top-down* atencional e representações neurais perceptuais, conceituais, linguísticas, afetivas, dentre outras (RISSMAN; WAGNER, 2012). Esse controle permite a manipulação, o processamento e a recuperação de memórias que são convertidas em uma ação adequada e efetiva após

intervalos curtos (segundos) ou longos (minutos a horas) em tarefas experimentais em animais (FLORESCO; PHILLIPS, 2001; FUNAHASHI, 2006) e no homem (BADDELEY, 2012).

A memória operacional pode ser avaliada experimentalmente, em tarefas em que um estímulo é apresentado e em seguida removido, durante um intervalo variável (geralmente referido como “retardo”), quando o indivíduo deve manter ativa a informação do estímulo anteriormente apresentado ou da sua localização, para posteriormente orientar a sua resposta (SEAMANS; YANG, 2004). Uma característica crucial das tarefas com retardo é a necessidade da atualização constante das informações a cada resposta emitida (GOLDMAN-RAKIC, 1990). Funahashi, Bruce e Goldman-Rakic (1989) encontraram atividade mnemônica persistente em neurônios no CPFDL durante o período de retardo em primatas não humanos. Esse achado tem sido amplamente corroborado por estudos eletrofisiológicos, de lesão e de imagem funcional, com evidências de que o CPF é fundamental para o desempenho da memória operacional (KHAN; MULY, 2011).

A atividade de neurônios do CPF pode então ser considerada como o correlato celular da memória operacional (GOLDMAN-RAKIC, 1990). Assim, as tarefas com retardos foram estabelecidas como paradigmas de escolha para estudos da memória operacional e da ativação pré-frontal subjacente (WANG, 2005). Ademais, tanto em animais experimentais quanto no homem, a acuidade e o tempo de resposta podem ser medidos em tarefas de alta ou baixa demanda de memória operacional e o seu desempenho é considerado um indicador indireto da integridade das funções frontais (GOLDMAN-RAKIC, 1990).

### *1.6.1 Paradigma do labirinto radial de oito braços*

Ratos experimentais podem ser treinados para aprender tarefas que exigem a integração de estímulos temporalmente separados que se tornam mutuamente dependentes, no contexto de regras experimentalmente impostas (JONES, 2002). Nesse contexto, a memória operacional pode ser testada por meio do paradigma do labirinto radial de oito braços (LR-8). Olton e Samuelson (1976) foram os pioneiros na proposição desse instrumento como modelo eficaz na avaliação da memória operacional espacial em roedores. Desde então, tem sido largamente utilizado na investigação dos efeitos de drogas e da funcionalidade pré-frontal sobre a aprendizagem e memória (OLTON, 1987; NAKAMURA *et al*, 1991; NAKAMURA-PALACIOS; ROELKE, 1997).

Nesse paradigma, a memória operacional espacial (Figura 10) é tipicamente avaliada em uma tarefa em que um estímulo é apresentado (quatro braços do LR-8 aleatoriamente escolhidos) e, em seguida, removido, durante um retardo variável. Após o retardo, o estímulo inicial é reapresentado, associado a outro estímulo (todos os braços do LR-8 tornam-se disponíveis) e a informação ativamente mantida deve ser recuperada, a fim de orientar a resposta (seleção dos quatro braços restantes). O animal é recompensado ao responder corretamente, devendo, portanto, distinguir os dois estímulos. A demanda de memória é uma função do atraso entre o pré e o pós-retardo: quanto mais longo o período, mais difícil torna-se a retenção da informação.

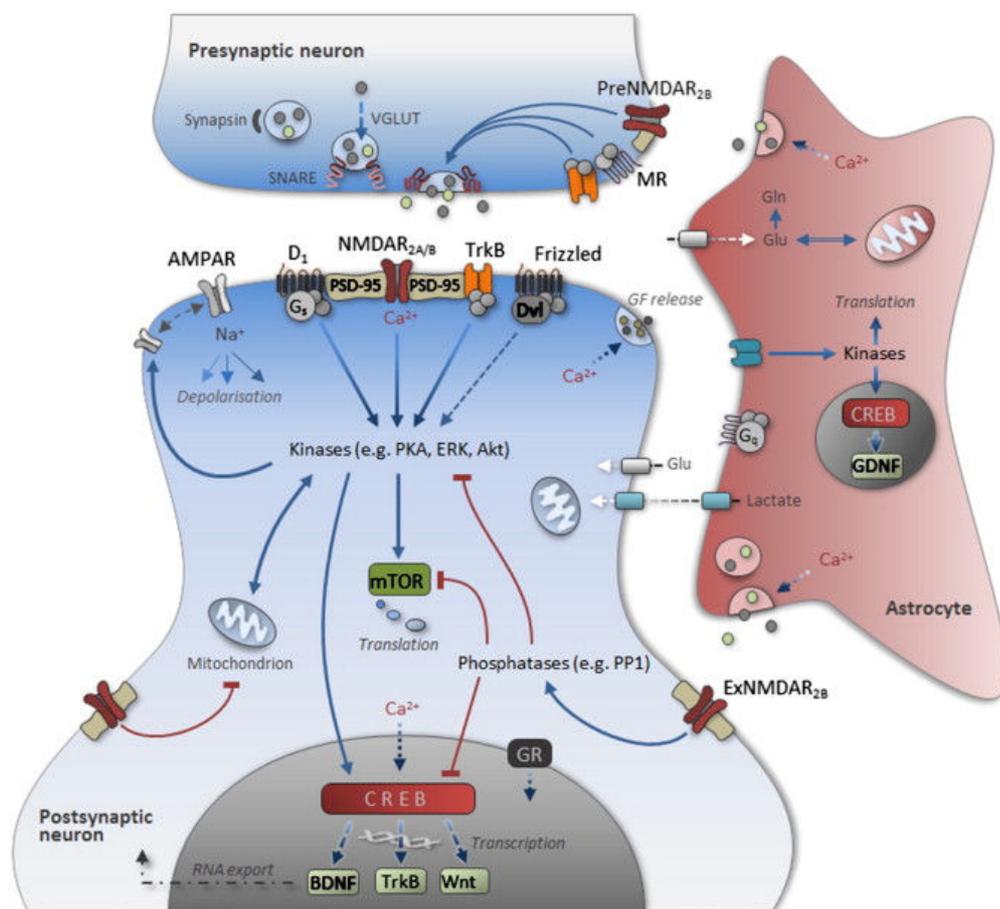


**Figura 10** – Processo esquemático representativo de uma tarefa de memória operacional espacial pelo paradigma do labirinto radial de oito braços.

### 1.7 Sistema glutamatérgico

O glutamato é sintetizado *de novo* a partir da glicose e da glutamina, fornecida por células gliais, sendo então envolvido em vesículas sinápticas, por transportadores vesiculares do glutamato (VGLUT) (Figura 11). Proteínas do complexo SNARE medeiam a interação e a fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica. Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato pode ligar-se aos seus receptores e deflagrar várias respostas, incluindo a despolarização da membrana, a ativação de cascatas de segundos mensageiros, a modulação da síntese proteica local e, eventualmente, a expressão gênica. O glutamato pode ser eliminado da sinapse, por meio de transportadores de aminoácidos excitatórios em células vizinhas gliais e, em menor grau, em neurônios. O sequestro do glutamato por astrócitos, por meio de transportadores de alta afinidade astrocitários, atenua o potencial neurotóxico do

glutamato. No astrócito, o glutamato é convertido em glutamina pela glutamina sintetase. A glutamina, que não é neuroexcitatória, é então liberada para o meio extracelular e transferida por transportadores específicos para o terminal pré-sináptico, para a conversão em glutamato, pela glutaminase, completando um ciclo que é acoplado ao metabolismo de glicose. Portanto, o ciclo glutamato-glutamina é o principal mecanismo de finalização da neurotransmissão glutamatérgica, em uma sinapse tripartite (MAGISTRETTI, 2006; MARSDEN, 2013; POPOLI *et al*, 2012).



**Figura 11** – Diagrama esquemático simplificado de uma sinapse glutamatérgica tripartite e a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  no hipocampo. AMPAR: receptor AMPA; Akt: proteína quinase B; BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro; CREB: proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc; D1: receptor de dopamina tipo 1; Dvl: proteína “dishevelled”; ERK: quinase regulada por sinais extracelulares; ExNMDAR: NMDAR extrassináptico; GDNF: fator neurotrófico derivado da glia; GF: fator de crescimento; Gln: glutamina; Glu: glutamato; GR: receptor de glicocorticoide; MR: receptor mineralocorticoide; mTOR: alvo da rapamicina de mamíferos; NMDAR: receptor NMDA; PKA: proteína quinase A; PP1: proteína fosfatase 1; PreNMDAR: NMDAR pré-sináptico; PSD-95: proteína de densidade pós-sináptica de 95 KDa; SNARE: receptor solúvel de ligação à N-etilmaleimida; TrkB: receptor de tirosina quinase B; VGLUT: transportador vesicular de glutamato; Wnt: Proteína com função de receptor celular que partilha o nome com vias de sinalização em que está inserida, nome obtido por meio da junção de Wg (*wingless*) e Int. Extraído de Marsden (2013), sob permissão.

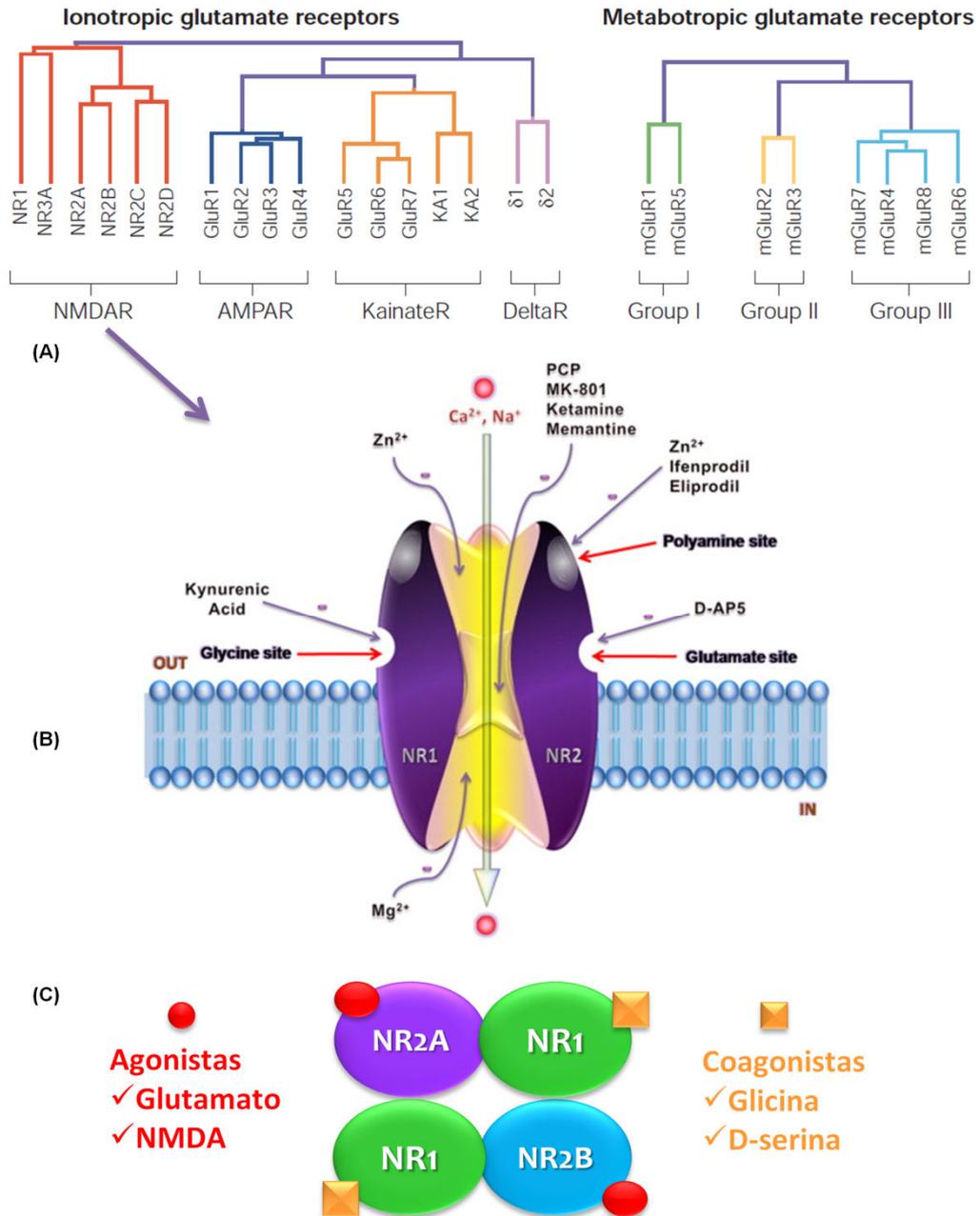
Há dois grandes grupos de receptores glutamatérgicos no sistema nervoso central: metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (SANACORA *et al*, 2008).

Os mGluRs são receptores acoplados à proteína G e podem ser organizados em três grupos (I a III), baseados nas vias de transdução de sinal que eles ativam (Figura 12). Os do grupo I agem primariamente por meio da fosfolipase C $\beta$  e a ativação dos sistemas de segundos mensageiros inositol trifosfato e diacilglicerol. Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos dos grupos II e III são negativamente acoplados à adenilato ciclase (SANACORA *et al*, 2008).

Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos (Figura 12) medeiam a transmissão sináptica rápida e são nomeados pelos seus respectivos agonistas: NMDAR, AMPAR e receptores cainato (KAR). Eles possuem estruturas homo ou heterotetraméricas permeáveis aos cátions Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e, dependendo do subtipo, também ao Ca<sup>2+</sup>. Atualmente, diferentes subunidades são conhecidas e são ainda mais diversificadas por *splicing* alternativo e edição de RNA (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003; SANACORA *et al*, 2008).

Os NMDARs (Figura 12) são heterotetrâmeros formados pela combinação de uma subunidade NR1 (oito isoformas) com uma subunidade NR2 (quatro isoformas) e, em alguns casos, com uma subunidade NR3 (duas isoformas) (MCBAIN; MAYER, 1994; SANACORA *et al*, 2008). O NMDAR é um canal com cinética relativamente lenta, permeável ao Ca<sup>2+</sup>, em adição ao Na<sup>+</sup> e ao K<sup>+</sup> (Figura 12). O canal contém um sítio de ligação para o Mg<sup>2+</sup> voltagem-dependente, o que torna o canal inativo em repouso e é liberado por despolarização pós-sináptica (NOVAK, 1994). Com a expulsão do Mg<sup>2+</sup>, os NMDARs podem ser ativados pela ação combinada de duas moléculas de glutamato e duas moléculas do coagonista glicina ou D-serina, permitindo o influxo de Ca<sup>2+</sup> (Figura 12). A elevada permeabilidade ao Ca<sup>2+</sup> fornece aos NMDARs uma profunda significância fisiopatológica, pois ativa uma série de vias de sinalização intracelulares, com diversas consequências potenciais, incluindo a estabilização de conexões sinápticas, LTD ou LTP, necrose ou apoptose (HARDINGHAM; BADING, 2003). Assim, a inibição de NMDARs pode ter consequências muito divergentes, deletérias ou benéficas (MCBAIN; MAYER, 1994; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007; RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003; SANACORA *et al*, 2008).

Adicionalmente, a atividade dos NMDARs é sensível ao pH e à modulação por uma variedade de agentes endógenos, incluindo o Zn<sup>2+</sup>, alguns neuroesteróides, o ácido araquidônico, reagentes redox e poliaminas (espermina) (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).



**Figura 12** – Diagrama esquemático do receptor NMDA. (A) Árvores filogenéticas das subunidades dos receptores glutamatérgicos. Extraído de Collingridge, Isaac e Wang (2004), sob permissão. (B) Modelo do receptor NMDA mostrando os sítios de ligação de agonistas e antagonistas. Extraído de Ghasemi e Schachter (2011), sob permissão. (C) Modelo esquemático das subunidades mais comuns do receptor NMDA. Glicina e D-serina são agonistas em NR1; glutamato e o NMDA são agonistas em NR2. AMPAR: receptor AMPA; D-AP5: ácido 2-amino-5-fosfopentanóico; DeltaR: receptor delta; GluR: receptor de glutamato; KA: subunidade do receptor de cainato; mGluR: receptor de glutamato metabotrópico; MK-801: dizocilpina; NMDAR: receptor NMDA; PCP: fenciclidina.

Estudos de ligação mostraram que os NMDARs exibem uma distribuição heterogênea, com níveis elevados no hipocampo, tálamo e no córtex e uma expressão ligeiramente mais baixa nos gânglios da base, cerebelo e medula espinhal (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003). A

densidade dos NMDARs sinápticos e a composição de suas subunidades são dinamicamente remodeladas individualmente por célula ou sinapse, durante o desenvolvimento e em resposta à atividade neuronal e à experiência sensorial (LAU; ZUKIN, 2007; SANACORA *et al*, 2008) (Figura 11). A atividade impulsiona a mobilidade lateral (entre sítios sinápticos e extrassinápticos) e a incorporação de NMDARs na sinapse (LAU; ZUKIN, 2007).

Os AMPARs são homo ou heterotetrâmeros compreendendo subunidades de quatro isoformas possíveis (Figura 12). Devido às diferenças na expressão de subunidades, como as modificações pós-transcricionais e o *splicing* alternativo, ocorre diversidade funcional entre os receptores. Em sinapses maduras, os AMPARs usualmente são coexpressos com NMDARs (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007; RIEDEL, PLATT e MICHEAU, 2003; SANACORA *et al*, 2008) (Figura 11).

Os AMPARs medeiam a excitação rápida na maioria das sinapses e são responsáveis pela reação inicial ao glutamato na sinapse (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003). A sua ativação permite o influxo de  $\text{Na}^+$ , resultando na despolarização da membrana neuronal (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007). AMPARs mostram rápida cinética de ativação e inativação, são em grande parte pós-sinápticos e principalmente impermeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (pelo menos os que contêm a subunidade GluR2) (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003).

AMPARs foram encontrados em todo o cérebro, com níveis de expressão particularmente elevados no córtex cerebral, gânglios da base, tálamo, hipotálamo, cerebelo, hipocampo e a medula espinhal (BLACKSTONE, 1992; RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003). Os KARs, assim como os AMPARs, permitem o influxo de  $\text{Na}^+$  que medeiam a rápida neurotransmissão excitatória, mas possuem uma distribuição distinta (SANACORA *et al*, 2008).

### 1.7.1 Função glutamatérgica na aprendizagem e na memória

Amplas evidências indicam que vários tipos de aprendizagem levam à ativação de NMDARs, AMPARs e mGluRs, iniciando a sequência de eventos de sinalização intracelular que medeiam a plasticidade sináptica (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003) (Figura 11).

Os NMDARs têm sido envolvidos no condicionamento pavloviano (XU *et al*, 2001), na memória espacial (TSIEN; HUERTA; TONEGAWA, 1996), na memória operacional e de referência (LEVIN *et al*, 1998), na preferência condicionada por lugar (SWAIN; SIGSTAD;

SCALZO, 2004), na aprendizagem de esquiva passiva (DANYSZ; WROBLEWSKI; COSTA, 1988), na memória olfativa (SI; HELLIWELL; MALESZKA, 2004), na aprendizagem reversa (HARDER *et al*, 1998), dentre outros.

Evidências da contribuição dos AMPARs são menos claras devido à sua especificidade: o seu bloqueio pode afetar vários componentes essenciais para a aprendizagem. Em geral, as funções dos mGluRs parecem ser variáveis e dependerem da estrutura cerebral e da tarefa de aprendizagem (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003).

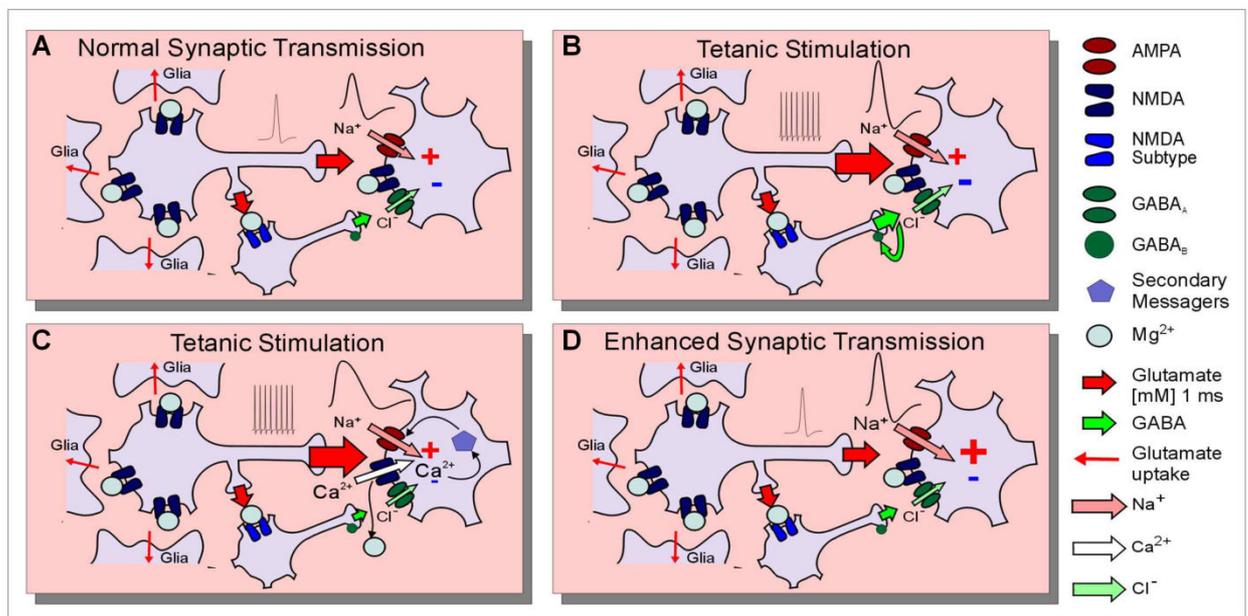
Os NMDARs exercem uma participação fundamental na modificação em longo prazo da força sináptica. A sua ativação está envolvida nos processos de LTP, LTD e na metaplasticidade (COLLINGRIDGE; ISAAC; WANG, 2004).

A LTP pós-sináptica dependente de NMDAR pode ser descrita pela seguinte sequência simplificada de eventos, segundo Parsons, Stöffler e Danysz (2007) (Figura 13). O glutamato liga-se aos NMDARs e AMPARs pós-sinápticos, no entanto, apenas os últimos são transitoriamente ativados durante a transmissão sináptica normal rápida, pois os íons  $Mg^{2+}$  bloqueiam os NMDARs e a sua cinética de ativação é mais lenta (Figura 13A). Quando um sinal prolongado e de alta frequência (ou a somação de vários sinais) chega em uma sinapse glutamatérgica, isto leva a uma forte e mais prolongada liberação de glutamato e a um influxo de íons  $Na^+$  mais pronunciado no neurônio pós-sináptico através dos AMPARs (Figura 13B). Além disso, a lenta ativação de receptores  $GABA_B$  pré-sinápticos em interneurônios inibitórios provoca desinibição de sinapses gabaérgicas. Ambos os processos, por sua vez, conduzem a um PPSE. Esta despolarização remove o bloqueio do  $Mg^{2+}$  no NMDAR, desde que a carga relativa da membrana neuronal é agora bem menos negativa durante um tempo suficiente para permitir que este cátion divalente deixe o canal durante a lenta ativação dos NMDARs. Nessa fase, pode ocorrer influxo de  $Ca^{2+}$  através dos NMDARs e o desencadeamento de uma cascata de segundos mensageiros que estão envolvidos no aumento da força sináptica (formação de memória neuronal) (Figura 13C). Essa alteração pós-sináptica é manifestada por um aumento de respostas mediadas por AMPARs, o que eleva os sinais sinápticos normais subsequentes (Figura 13D).

Esta voltagem-dependência do complexo NMDAR pode explicar a dependência da frequência da indução de LTP / LTD. Adicionalmente, a condução eficaz de corrente através dos NMDARs requer sinais coincidentes – a liberação pré-sináptica de glutamato, o desbloqueio

voltagem-dependente pelo  $Mg^{2+}$  e a despolarização pós-sináptica – permitindo que os NMDARs atuem como “detectores de coincidência” (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003).

A LTP em sinapses excitatórias desenvolve-se em estágios diferentes, a partir de uma fase de curta duração, independente de proteínas quinases (inferior a uma hora), a três níveis diferentes de LTP, requerendo a fosforilação proteica, a síntese proteica e a transcrição gênica, respectivamente (RAYMOND, 2007). Essas alterações funcionais da neurotransmissão sináptica são paralelas a alterações morfológicas de espinhas dendríticas, o principal sítio das sinapses glutamatergicas no cérebro (HOLTMAAT; SVOBODA, 2009).



**Figura 13** – Processo esquemático simplificado da indução da LTP dependente de receptores NMDA, extraído de Parsons, Stöffler e Danysz (2007), sob permissão.

As vias de sinalização desencadeadas pelo aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular incluem a proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII), a fosfolipase C / proteína quinase C, AMPc / proteína quinase A, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) / proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (MALINOW; SCHULMAN; TSIEN, 1989; MARSDEN, 2013; O’DELL; KANDEL; GRANT, 1991) (Figura 11). Isso resulta na síntese proteica *de novo* e na expressão de genes precoces imediatos específicos, incluindo c-fos, Arc e zif268, levando a alterações na

expressão gênica, reforço sináptico estrutural e no crescimento de novas conexões sinápticas (ALBERINI, 2008; CAREW, 1996).

Durante a sinalização da LTP a partir de NMDARs, neuromoduladores e fatores de crescimento promovem o tráfico sináptico de AMPARs, a tradução dependente de mTOR, a transcrição gênica dependente da proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc (CREB) e a liberação de proteínas como o BDNF e Wnt (BEKINSCHTEIN *et al*, 2007; MARSDEN, 2013) (Figura 11).

Esses eventos resultam na expressão de novos AMPARs (MALINOW; MALENKA, 2002), especialmente em condições “silenciosas” (*down-regulation* de AMPARs) (LIAO; HESSLER; MALINOW, 1995). Assim, a LTP é principalmente expressa como um aumento da neurotransmissão mediada pelo AMPAR, embora o componente mediado pelo NMDAR da neurotransmissão glutamatérgica pode também ser potenciado (BASHIR *et al*, 1991).

Em contraste, durante a LTD, a sinalização por fosfatases intracelulares regula contrariamente essas vias, como a internalização de AMPAR (BEATTIE *et al*, 2000; MARSDEN, 2013). NMDARs extrassinápticos representam mediadores da sinalização neuroplástica negativa; vias associadas levam ao desligamento de CREB, disfunção mitocondrial e potencialmente morte celular (MARSDEN, 2013).

Os astrócitos são também crucialmente envolvidos na plasticidade sináptica, pela liberação de gliotransmissores e fatores metabólicos, como o lactato (Figura 11); além disso, os astrócitos sofrem mudanças funcionais durante a plasticidade sináptica (MARSDEN, 2013).

Além disso, há evidências de mecanismos de expressão pré-sináptica de LTP e LTD, que envolvem a difusão de mensageiros retrógrados tais como o óxido nítrico (SCHUMAN; MADISON, 1991), fator ativador de plaquetas (KATO *et al*, 1994) e endocanabinóides (SJOSTROM; TURRIGIANO; NELSON, 2003) da região pré ou pós-sináptica.

O envolvimento crítico dos receptores glutamatérgicos na LTP e no aprendizado torna-os alvos óbvios para a melhoria cognitiva. Isso é apoiado, por exemplo, pelas ampaquinas, que são estimuladores cognitivos (LYNCH, 2006) e pelo agonista parcial do NMDAR D-cicloserina que foi capaz de aprimorar o desempenho de aprendizagem e resgatar déficits relacionados a LTP e memória em ratos (BAXTER *et al*, 1994). No entanto, há desafios para o desenvolvimento de agentes estimuladores dos NMDARs clinicamente aceitáveis

(HARDINGHAM; BADING, 2003), pois a sua estimulação excessiva medeia a morte neuronal por excitotoxicidade (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

### 1.7.2 Antagonistas do receptor NMDA

Uma vez que os NMDARs contêm múltiplos sítios de modulação alostérica, o desenvolvimento de agonistas e antagonistas com distintas afinidades, cinéticas e sítios de ligação no NMDAR encorajou estudos investigativos, emergindo fármacos de relevância clínica (Quadro 1).

**Quadro 1** – Exemplos de antagonistas do receptor NMDA.

Sítios modulatórios	Antagonistas competitivos	Aplicação	Referências
Glutamato	AP5, AP7	Experimental	DAVIES <i>et al</i> , 1981; NADLEWSKA <i>et al</i> , 2003.
Glicina	Ácido 7-Cloroquinurênico, Ácido quinurênico	Experimental	KEMP <i>et al</i> , 1988; HLINAK; KREJCI, 1995.
<b>Antagonistas não competitivos</b>			
	Fenciclidina	Experimental (anestésico proscrito)	JENTSCH; ROTH, 1999.
Fenciclidina	Cetamina	Anestésico	MORGAN; CURRAN, 2012.
	MK-801	Experimental	SWAIN; SIGSTAD; SCALZO, 2004.
Mg <sup>2+</sup>	Memantina	Tratamento para doença de Alzheimer	PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007.
<b>Moduladores negativos</b>			
Subunidade NR2B	Ifenprodil, Ro 25-6981	Experimental	WILLIAMS, 1993; FISCHER, 1997.

AP5: ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico; AP7: ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico; MK-801: dizocilpina.

Entretanto, antagonistas não competitivos que bloqueiam totalmente os NMDARs comumente levam a efeitos adversos clinicamente inaceitáveis, como prejuízos na memória, efeitos psicomiméticos e ataxia (JENTSCH; ROTH, 1999). Citam-se nesse grupo os bloqueadores de

canal aberto, como a fenciclidina (PCP, ou vulgarmente “pó de anjo”), a cetamina e o MK-801 (dizocilpina).

Há evidências consistentes de que os sintomas cognitivos e negativos da esquizofrenia resultam de uma disfunção glutamatérgica (OLNEY; NEWCOMER; FARBER, 1999), o que remonta à década de 1950, quando foi relatado que a fenciclidina poderia produzir efeitos psicóticos em seres humanos (LUBY *et al*, 1959). Não obstante, a administração de antagonistas NMDARs não competitivos, como a administração subcrônica de doses subanestésicas de cetamina, constitui um modelo amplamente aceito de esquizofrenia em roedores (NEILL *et al*, 2010).

O MK-801 age somente quando o receptor está ativado (WATKINS, 1994) e é considerado bloqueador, pois possui uma alta afinidade, baixa voltagem-dependência e cinética de desbloqueio lenta (PARSONS *et al*, 1999). Ainda, ele provoca bloqueio da indução da LTP *in vitro* e *in vivo* (CARAMANOS; SHAPIRO, 1994) e prejuízos da aquisição de tarefas em testes no LR-8 e no labirinto aquático (STAAY *et al*, 2011).

A hipofunção glutamatérgica sustentada e mais grave no cérebro adulto está associada com manifestações de neurotoxicidade com características neuropatológicas bem caracterizadas (FARBER, 2003), o que invalida a utilização clínica de vários antagonistas de NMDARs. Surpreendentemente, o bloqueio de NMDARs pode, por vezes, promover neuroproteção e facilitar a memória, uma observação que parece contradizer a lógica (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003). Estudos mais pormenorizados, no entanto, revelam que não há paradoxo real, como no caso da memantina, apresentada a seguir.

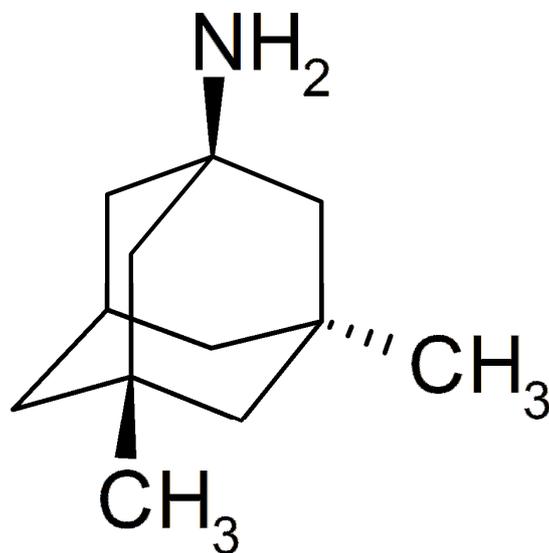
#### 1.7.2.1 Memantina

A memantina (1-amino-3,5-dimetil-adamantano) é um antagonista não competitivo de NMDARs de baixa a moderada afinidade que interage com o sítio de ligação do  $Mg^{2+}$  (ou próximo a ele) do canal, capaz de atenuar a ativação patológica desses receptores preservando a sua atividade fisiológica (LIPTON, 2006; RAMMES; DANYSZ; PARSONS, 2008; SCARPINI; SCHELTENS; FELDMAN, 2003). Tem-se sugerido que a memantina reduz a hiperativação do sistema NMDAR na doença de Alzheimer moderada a severa e inibe o

influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  em condições de excitotoxicidade neuronal (JOHNSON; KOTERMANSKI, 2006; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

A memantina é classificada como um bloqueador de canal aberto, pois pode acessar o interior do canal e bloquear o fluxo de corrente apenas após sua abertura. Por isso, ela só bloqueia o NMDAR na presença do agonista e, subsequentemente, uma proporção permanece retida no canal (em torno de 80 %) mesmo após a remoção do agonista, o que configura o antagonismo do tipo “sequestro parcial” (JOHNSON; KOTERMANSKI, 2006; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

Sua estrutura química (Figura 14) possui três anéis com um grupamento amino protonado sob condições fisiológicas, além de duas ramificações metila que prolongam o tempo de paragem no canal e que retardam a sua taxa de desbloqueio, aumentando a sua afinidade ao canal (LIPTON, 2006). Em concentrações elevadas (10-500 mM), a memantina afeta a recaptação de serotonina e de dopamina, receptores de acetilcolina nicotínicos, receptores serotoninérgicos, receptores sigma-1 e canais de  $\text{Na}^+$  ativados por voltagem (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).



**Figura 14** – Fórmula estrutural da memantina. Fonte: Wikipedia ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Memantin\\_Struktur.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Memantin_Struktur.png)).

A memantina foi originariamente sintetizada para ser utilizada como um potencial agente antidiabético, mas mostrou-se ineficaz. Mais tarde, foi aprovada para o tratamento da doença

de Alzheimer moderada a severa (2002, na união europeia) e, desde então, encontra-se disponível no mercado farmacêutico. Seus efeitos adversos são considerados benignos, em contraste com os outros antagonistas não competitivos, como o MK-801, cetamina e fenciclidina. Foi proposto que isso pode ser devido à sua forte voltagem-dependência e à rápida cinética de desbloqueio (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007; RAMMES; DANYSZ; PARSONS, 2008).

É surpreendente que um antagonista glutamatérgico possa melhorar os sintomas da doença de Alzheimer, uma condição caracterizada por déficits dos níveis de glutamato e de receptores glutamatérgicos (JOHNSON; KOTERMANSKI, 2006). Várias explicações para os benefícios cognitivos da memantina na doença de Alzheimer têm sido propostas, incluindo uma diminuição no “ruído” sináptico resultante da ativação excessiva NMDAR, a inibição da produção de  $\beta$ -amilóide e o reajuste do equilíbrio entre a inibição e excitação (JOHNSON; KOTERMANSKI, 2006; LIPTON, 2006; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007). Permanece uma questão aberta se a memantina exerce um efeito modificador da doença (lentificação do declínio cognitivo).

## *2 Considerações Finais*

Diante da contextualização apresentada, considerou-se:

I. O crescente interesse em paradigmas de estimulação elétrica cerebral como ferramentas neuromoduladoras da excitabilidade cortical e do comportamento em uma amplitude de ensaios clínicos e condições experimentais;

II. A significativa perda da intensidade de corrente aplicada sobre o escalpo nas técnicas não invasivas de estimulação elétrica cortical de baixa intensidade, o que adiciona complexidade na interpretação dos resultados obtidos em condições experimentais;

III. A comprovada ativação do CPF em ratos sob corrente anódica de 400  $\mu$ A de intensidade (TAKANO *et al*, 2011);

IV. Os inconclusivos mecanismos subjacentes da ação das técnicas de estimulação cerebral não invasivas e a sua constatada dependência da modulação da atividade de interneurônios glutamatérgicos, especialmente dos NMDARs;

V. A necessária investigação científica em modelos animais translacionais no esclarecimento dos mecanismos funcionais e comportamentais subjacentes à neuroplasticidade.

Por conseguinte, a investigação da modulação glutamatérgica em um modelo experimental de estimulação epidural cortical por corrente contínua de baixa intensidade poderia potencialmente ampliar os conhecimentos em neuromodulação. No laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), foi desenvolvido um modelo de estimulação elétrica epidural em ratos (CUSTODIO *et al*, 2012) que facilitou significativamente o desempenho desses animais no LR-8, sob estimulação epidural de 400  $\mu$ A no CPFm esquerdo, o que demandou uma investigação mais pormenorizada. No presente trabalho, hipotetizou-se que dadas as especificidades farmacodinâmicas da memantina e o seu comprovado envolvimento em processos de memória e plasticidade sináptica (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007), a relação dose-resposta desse fármaco associada com o modelo desenvolvido poderia ser relevante no campo da neuromodulação cognitiva.

*3 Objetivos*

### 3.1 Objetivo geral

Investigar a modulação glutamatérgica pela memantina na memória operacional espacial em ratos, sob estimulação epidural por corrente contínua de baixa intensidade, no CPFm esquerdo.

### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes doses de memantina sobre o desempenho de ratos durante a execução de tarefas de memória operacional espacial no LR-8;
- Avaliar o efeito da estimulação epidural cortical por corrente contínua de 400  $\mu$ A sobre o desempenho de ratos em tarefas de memória operacional espacial no LR-8;
- Avaliar a interação entre diferentes doses de memantina e a estimulação epidural cortical por corrente contínua de 400  $\mu$ A sobre o desempenho de ratos em tarefas de memória operacional espacial no LR-8;
- Avaliar os efeitos de diferentes doses de memantina sobre o desempenho de ratos de melhor e de pior linha de base comportamental em tarefas de memória operacional espacial no LR-8;
- Avaliar os efeitos da interação entre diferentes doses de memantina e a estimulação epidural cortical por corrente contínua de 400  $\mu$ A sobre o desempenho de ratos de melhor e de pior linha de base comportamental em tarefas de memória operacional espacial no LR-8.

## *4. Método*

#### 4.1 Animais

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos, pesando em média  $330,2 \text{ g} \pm 11,21$ , provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, com assoalho coberto por serragem em ambiente climatizado ( $22^\circ \text{ C} \pm 2$ ), num ciclo claro-escuro artificial de 12 h (luzes acesas às 7 h), parcialmente privados de alimento (Presence<sup>®</sup> Ratos e Camundongos, Presence Nutrição Animal, Paulínia, SP, Brasil) e com água *ad libitum*. Os animais foram mantidos com o peso corporal acima de 80 % do peso inicial, ajustado ao crescimento.

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do CCS/UFES, nº 04/2012.

#### 4.2 Delineamento experimental

Os animais foram submetidos a sessões diárias de habituação e aprendizagem no LR-8. Após aprenderem os procedimentos gerais (entrar uma única vez em cada braço visitado) e os procedimentos de retardo, foram submetidos à cirurgia de implante de eletrodo de estimulação epidural sobre o CPFm esquerdo. Desse modo, 50 animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos (randomização gerada por meio do *Web site* <http://www.randomization.com>), a saber (Figura 15):

- Grupo eDCS (n = 25): Animais submetidos à estimulação epidural cortical por corrente contínua (eDCS) de  $400 \mu\text{A}$  e à administração intraperitoneal (IP) de doses de memantina (0,32 mg/kg, 1 mg/kg e 3,2 mg/kg) e de solução salina (NaCl a 0,9 %);
- Grupo *Sham* (n = 25): Animais submetidos à estimulação simulada (*sham*) e à administração IP de doses de memantina (0,32 mg/kg, 1 mg/kg e 3,2 mg/kg) e de solução salina (NaCl a 0,9 %).

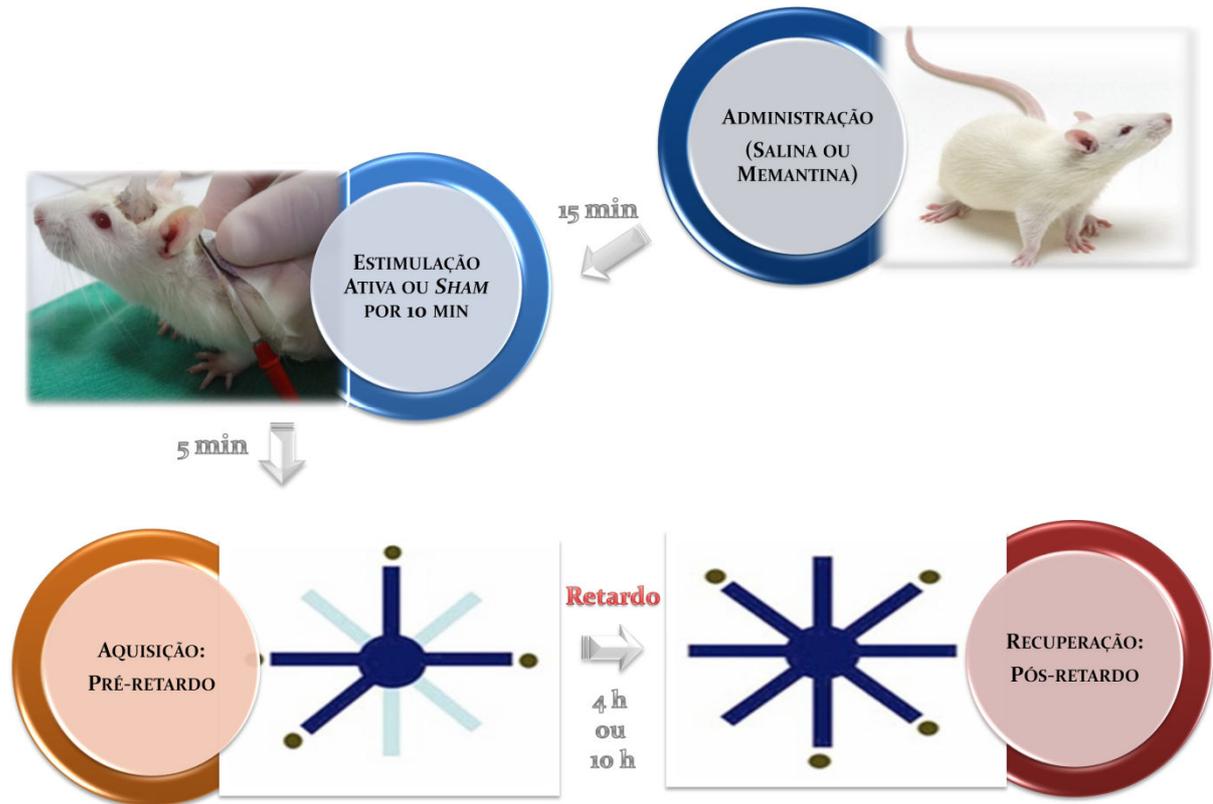
O delineamento deste estudo foi de amostras dependentes para as diferentes doses de memantina, incluindo salina, e independentes para o tipo de estimulação (Figura 15). Adicionalmente, as administrações de memantina e salina foram conduzidas por semirrandomização (método do quadrado latino), 15 min antes das sessões de estimulação ativa ou *sham*, as quais duravam 10 min (Figura 16). Após um intervalo de 5 min, os animais

eram submetidos a uma sessão de tarefa de memória operacional espacial com retardo prolongado, de 4 h ou de 10 h, semirrandomicamente designados.

O estudo foi duplo-cego, em que o observador do desempenho dos animais no labirinto (experimentador A) não tinha conhecimento acerca do tipo de estimulação recebida em cada animal, diferentemente dos outros experimentadores (B e C), que conduziam os procedimentos de administração e estimulação. Os experimentadores B e C, por sua vez, não tinham conhecimento acerca do desempenho individual dos animais nas sessões de tarefas de memória operacional espacial, embora mantivessem a informação da randomização (animais *Sham* e eDCS).



**Figura 15** – Diagrama esquemático do delineamento experimental. Ratos Wistar machos ( $n = 50$ ) foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos e desempenharam tarefas de memória operacional espacial no labirinto radial de oito braços. Após a aquisição da tarefa (fase V), os animais foram submetidos à cirurgia de implante de eletrodo de estimulação epidural sobre o córtex pré-frontal medial esquerdo. Animais *sham* foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, mas não foram eletricamente estimulados. Adicionalmente, a memantina foi administrada em três doses semirrandomicadas, 15 min antes das estimulações. O desempenho dos animais foi avaliado nos testes de memória operacional espacial em retardos de 4 h e 10 h, com e sem estimulação elétrica epidural ativa e sob o efeito de memantina ou salina.



**Figura 16** – Diagrama esquemático dos procedimentos conduzidos em uma sessão de retardo prolongado. 15 min após a administração IP de salina ou de uma dose de memantina, o animal era submetido à eDCS de 400  $\mu$ A ou à estimulação *sham*, por um período de 10 min, pelos experimentadores B e C. Após um intervalo de 5 min, o experimentador A, cego para o tipo de estimulação que o animal foi submetido, apresentava ao animal apenas quatro braços do LR-8, aleatoriamente definidos a cada sessão (pré-retardo). As portas eram abertas a cada posicionamento do animal na plataforma central e os reforços estavam disponíveis nos respectivos braços. Uma vez percorridos os quatro braços selecionados, o animal era destinado à sua gaiola-casa por 4 h ou por 10 h e, posteriormente, era reposicionado na plataforma central. Nesse momento, todas as oito portas eram abertas e os reforços estavam presentes apenas nos receptáculos dos quatro braços que não foram visitados anteriormente (pós-retardo). A repetição de um braço visitado no pré ou no pós-retardo era considerada erro de desempenho.

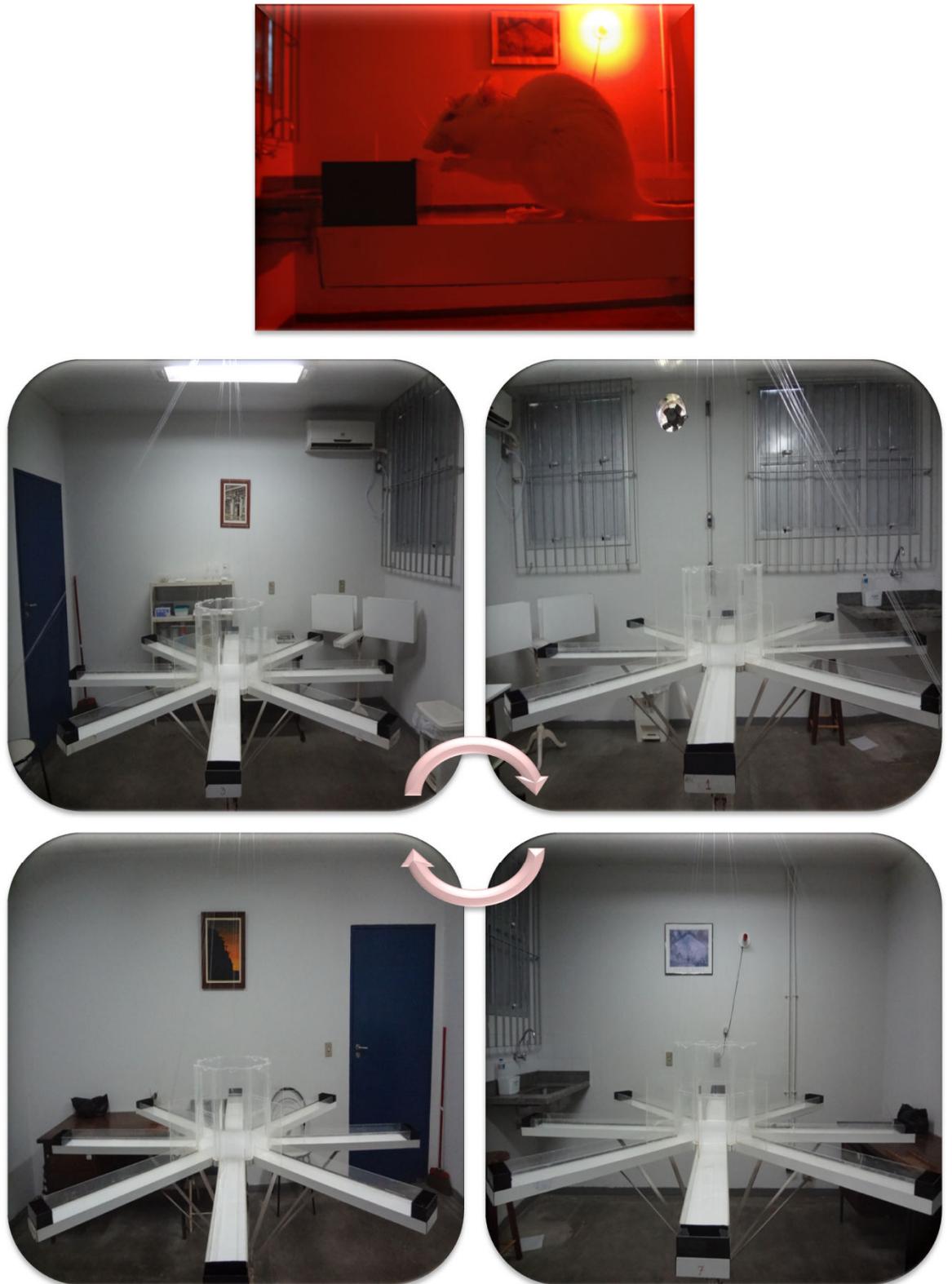
### 4.3 Memória operacional espacial: labirinto radial de oito braços

#### 4.3.1 Equipamento

Construído em acrílico transparente (Figura 17), constitui-se de oito braços simétricos removíveis (70 cm de comprimento, 10 cm de largura e paredes laterais de 4 cm de altura) que se irradiam de uma plataforma central de base octogonal (33 cm de diâmetro), mantida a 1 m de altura do solo por uma base metálica. Em volta das margens da plataforma central, oito portas do tipo guilhotina elevam-se a 30 cm de altura e possibilitam o acesso do animal aos braços. As portas são individualmente ligadas a fios de nylon, o que permitem o controle à

distância pelo experimentador A. Na extremidade final de cada braço, encontra-se um receptáculo preto (10 cm de largura e 3 cm de profundidade), destinado à apresentação do reforço para o animal (usualmente, pedaços de amendoim torrado sem casca).

Todos os oito braços do labirinto radial são similares entre si, diferindo apenas por sua localização espacial em relação aos outros braços, o que é sinalizada por estímulos visuais distais fixos (quadros, móveis, janelas etc), propositalmente mantidos ao longo do protocolo experimental, para discriminação e visualização a partir do labirinto (Figura 17). Ainda, a sala de experimentação era dotada de temperatura controlada, a geração de ruídos era reduzida e a iluminação natural foi bloqueada, sendo utilizada iluminação fluorescente vermelha, durante a execução dos procedimentos no LR-8.



**Figura 17** – Fotografias do labirinto radial de oito braços, evidenciando os distintos estímulos visuais externos na sala de experimentação. Em destaque, animal alimentando-se do amendoim encontrado no receptáculo, sob iluminação fluorescente vermelha.

#### 4.3.2 *Aquisição da tarefa de memória operacional espacial*

Ao longo do experimento, os animais foram privados parcialmente de alimento, com o peso corporal mantido acima de 80 % do peso inicial, ajustado ao crescimento.

Os procedimentos no LR-8 foram divididos em seis fases, com a execução de apenas uma sessão diária e individual, com o período máximo de 10 min de permanência do animal no labirinto, por sessão.

Fase I: Inicialmente, os animais eram posicionados na plataforma central do labirinto, com todas as portas de acesso aos braços abertas para livre exploração e habituação ao ambiente, durante 10 min por sessão, ao longo de dois dias.

Fase II: Pedacos de amendoim (reforço) eram colocados nos receptáculos e os animais tinham livre acesso aos braços, para que localizassem e consumissem o reforço no final de cada braço, em um período de 10 min. Sempre que o reforço era consumido, um novo pedaço de amendoim era devidamente repostado no receptáculo de origem, o que estimulava o animal a percorrer o labirinto. Essa fase é dependente da aprendizagem do animal na localização do reforço, usualmente durava de dois a três dias.

Fase III: Após a habituação e aprendizado a localizar o reforço, o animal era posicionado na plataforma central e todas as portas eram abertas, permitindo a escolha de qualquer uma das oito portas. Ao entrar em um dos braços, todas as portas eram fechadas e, após ter encontrado e consumido o reforço do braço, o animal era novamente posicionado no centro do labirinto e todas as portas eram abertas, exceto a(s) que já tivesse(m) sido visitada(s) na sessão. Este procedimento foi feito sucessivamente até que o animal obtivesse os oito reforços em uma mesma sessão, no período máximo de 10 min.

Fase IV: Esta fase é a aquisição da tarefa propriamente dita. Todas as portas eram abertas a cada reposicionamento do animal na plataforma central, após ter visitado qualquer um dos braços. Nesta condição, não ocorria reposição dos reforços e os animais deveriam aprender a não repetir braços já visitados, em um período de 10 min. A repetição de um braço já visitado foi considerada erro de desempenho. Neste procedimento, considerou-se aprendizagem satisfatória quando o animal alcançava um desempenho de zero ou um erro por sessão, em três sessões consecutivas. Atingido esse critério, os animais eram submetidos à fase V.

Fase V: Os animais eram submetidos a treinamento em tarefas de memória operacional espacial. Nesta fase, foi introduzido um intervalo de retenção (retardo), entre o quarto e o quinto braço visitado. Neste procedimento, apenas quatro portas, escolhidas aleatoriamente a cada sessão de treinamento, eram abertas a cada posicionamento do animal na plataforma central e os reforços estavam disponíveis nos respectivos braços. Esta etapa foi denominada de pré-retardo ou de primeira corrida. Uma vez percorridos os quatro braços selecionados, o animal era destinado à sua gaiola-casa por 5 s (“retardo de 5 s”) e, posteriormente, era reposicionado na plataforma central. Nesse momento, todas as oito portas eram abertas e os reforços estavam presentes apenas nos receptáculos dos quatro braços que não foram visitados anteriormente. Esta etapa foi denominada de pós-retardo ou de segunda corrida. A repetição de um braço visitado no pré ou no pós-retardo era considerada erro de desempenho e os animais eram treinados nesta fase até atingirem um critério de zero ou um erro para o pré e pós-retardo, por sessão, em três sessões consecutivas. Atingido esse critério, os animais eram submetidos à cirurgia estereotáxica de implante de eletrodo epidural cortical.

Fase VI: Três dias após a recuperação da cirurgia, os animais eram submetidos a uma sessão de retardo de 5 s, idêntica à fase anterior. Caso resultasse em zero ou um erro para o pré e pós-retardo, no dia seguinte, eles eram submetidos à fase VI. Caso não fosse atingido o critério, os testes eram repetidos diariamente, até a sua recuperação. A fase VI constituiu de testes com retardos prolongados (Figura 16). O procedimento foi semelhante ao da fase anterior, exceto pela modificação nos períodos de retardo, que foram de 4 h e 10 h, semirrandomicamente designados. Além disso, as tarefas no LR-8 dessa fase ocorriam após as administrações de salina ou memantina, precedidas das estimulações. As sessões de retardos de 4 h e de 10 h ocorriam uma única vez para cada dose designada de memantina ou salina, por animal. Ainda, eram assegurados intervalos interssessões, em que o animal era mantido em repouso ou submetido a sessões de retardos de 5 s. Para tanto, no dia seguinte após a sessão de retardo prolongado, os animais eram mantidos em repouso em suas gaiolas-casa. Subsequentemente, no dia seguinte, havia uma sessão de 5 s, para averiguar se ocorria a manutenção do critério de zero ou um erro no pré e no pós-retardo pelo animal. Caso o animal não mantivesse o critério em uma sessão de 5 s, o procedimento era repetido em dias consecutivos, até que o animal retornasse ao critério. Caso não ocorresse o retorno ao critério em até quatro dias consecutivos, o animal era excluído do experimento. No dia seguinte ao retorno ao critério, havia uma nova sessão com retardo prolongado, com os posteriores intervalos interssessões, ou seja, de pelo menos três dias.

24 h após o último teste com retardo, os animais eram submetidos à perfusão intracardíaca para remoção dos seus cérebros, seguida de processamento histológico.

#### 4.4 Cirurgia estereotáxica

Após os animais terem aprendido a tarefa de retardo (término da fase V), eles foram submetidos à cirurgia estereotáxica para o implante do eletrodo de estimulação de polaridade anódica, em região epidural sobrejacente ao CPFm esquerdo (Figura 18).

Inicialmente, os animais foram anestesiados com cetamina a 75 mg/kg (Dopalen<sup>®</sup> injetável, 116 mg/mL de cloridrato de cetamina, Sespo, Paulínia, SP, Brasil) e xilazina a 10 mg/kg (Anasedan<sup>®</sup> injetável, 23 mg/mL de cloridrato de xilazina, Sespo, Paulínia, SP, Brasil) via IP, em volume de 0,1 mL/100 g de seus pesos corporais. A seguir, foi feita a tricotomia na parte superior da cabeça e no dorso direito do animal (aproximadamente 10 cm de diâmetro), reservado ao posicionamento do catodo. O animal era devidamente posicionado em equipamento estereotáxico (51600, Stoeling<sup>®</sup>, Wood Dale, IL, EUA) e foram procedidas as seguintes etapas:

- I. Antissepsia com álcool iodado na área da incisão cirúrgica (Figura 18b);
- II. Produção de um botão anestésico com a injeção de 0,2 mL de solução de lidocaína a 2 % com adrenalina (Xylestesin<sup>®</sup> injetável a 2,0 % C/V, Cristália, Itapira, SP, Brasil) no tecido subcutâneo;
- III. Incisão do botão anestésico, com remoção de pele e tecido subcutâneo para exposição da calota craniana, na região do Bregma (Figura 18c);
- IV. Medição e registro das coordenadas estereotáxicas do Bregma (Figura 18d);
- V. Orientação do esterotáxico nas coordenadas de + 2,5 mm AP, + 1 mm L em relação ao Bregma, para o alcance do CPF esquerdo (Figura 18e);
- VI. Delimitação da região de posicionamento do eletrodo de estimulação anódica, em 5 mm de diâmetro, tendo como ponto médio a orientação demarcada (Figura 18f);
- VII. Após devida limpeza e secagem da área exposta, era realizada uma craniectomia da área delimitada, com o auxílio de uma mini-furadeira (Dremel Multipro,

Stoeling<sup>®</sup>, Wood Dale, IL, USA), até a quase exposição da dura-máter, sem lesioná-la e mantendo uma fina camada óssea íntegra (Figura 18g e h);

VIII. Para a devida ancoragem da prótese, dois dispositivos plásticos em arco eram fixados bilateralmente nos segmentos escamosais dos ossos temporais, com o auxílio da mini-furadeira (Figura18 i e j);

IX. Um eletrodo de neuroestimulação (ValuTrove<sup>®</sup> Neurostimulation Electrodes, Axelgaard, Fallbrook, CA, EUA) recortado com 5 mm de diâmetro e revestido com gel condutor de eletroencefalografia era devidamente posicionado acima da dura-máter (Figura 18k e l) e fixado com resina acrílica autopolimerizável de secagem rápida (copolímero de metilmetacrilato, Reliance Dental<sup>®</sup>, Worth, IL, EUA) (Figura18 m);

X. Administração intramuscular de 0,3 mL de penicilina G procaína 24000 UI (Penkaron<sup>®</sup> pó para suspensão injetável, benzilpenicilina procaína e benzilpenicilina potássica a 400.000 UI, Ariston, São Paulo, SP, Brasil) no animal anestesiado;

XI. Retorno do animal para a sua gaiola-casa, com recuperação pós-cirúrgica em ambiente iluminado e aquecido;

XII. Paracetamol solução oral (Paracetamol genérico 200 mg/mL, Medley, Campinas, SP, Brasil) era adicionado na água do bebedouro (2 mg/mL) ao longo de 48 h após a cirurgia.



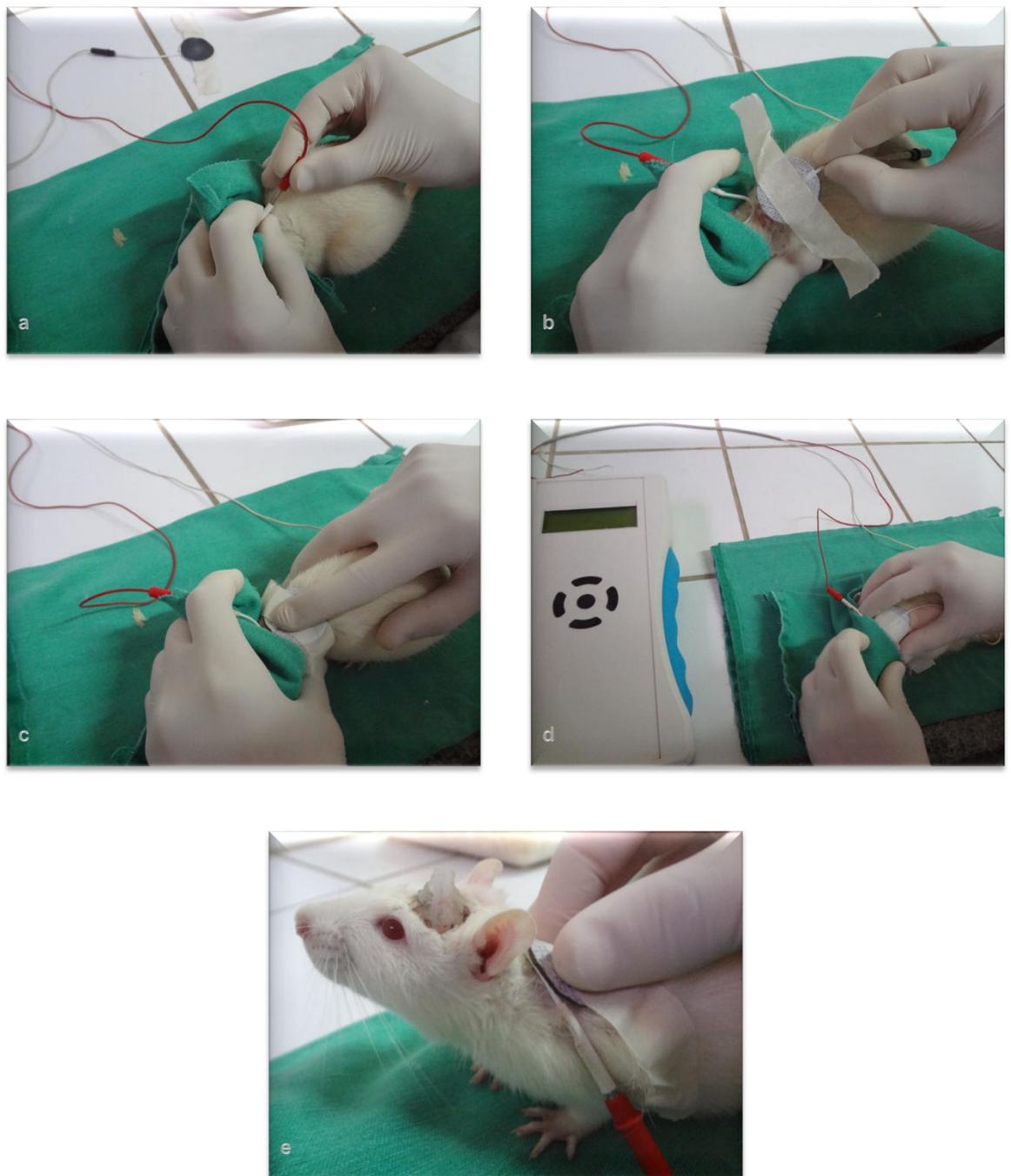
**Figura 18** – Fotografias representativas das etapas da cirurgia de implante do eletrodo de estimulação epidural cortical. (a) Preparo da mesa cirúrgica. (b) Posicionamento do animal no estereotáxico e antisepsia. (c) Exposição do crânio, na região do Bregma. (d) Medição e registro das coordenadas do Bregma. (e) Orientação do estereotáxico para o alcance do CPF esquerdo. (f) Delimitação da região de posicionamento do eletrodo, em 5 mm de diâmetro. (g e h) Craniectomia da área delimitada. (i e j) Fixação dos dispositivos plásticos. (k) Revestimento com gel condutor. (l) Posicionamento do eletrodo. (m) Fixação da prótese.

#### 4.5 Estimulação epidural cortical de corrente contínua de baixa intensidade - eDCS

A eDCS foi realizada empregando-se um par de eletrodos de neuroestimulação, constituído de material autoadesivo (ValuTrove<sup>®</sup> Neurostimulation Electrodes, Axelgaard, Fallbrook, CA, EUA). O eletrodo anódico foi fixado previamente na região epidural, acima do CPFm esquerdo, em procedimento cirúrgico previamente descrito, e teve 5 mm de diâmetro; o eletrodo de polaridade catódica tinha 10 mm de diâmetro, era removível e posicionado sobre a pele tricotomizada na região posterior da cabeça do animal, próxima ao pescoço, a cada sessão de estimulação (Figura 19).

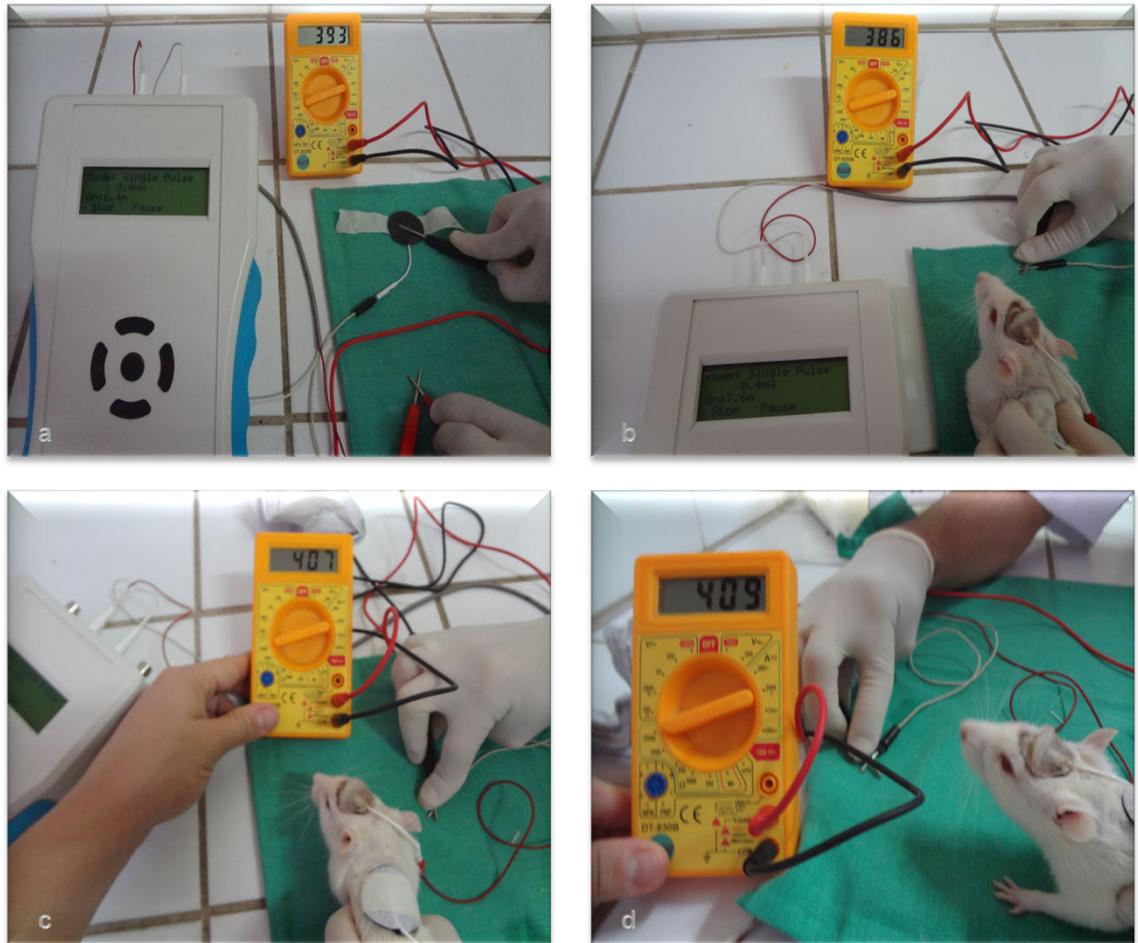
A corrente elétrica era fornecida por um estimulador de corrente contínua (tDCS Demo Unit serial # 072208-03, NeuroQuest Therapeutics<sup>®</sup>, USA), com a especificação de saída máxima de 10 mA de corrente (Figura 19d).

Uma corrente constante de pulso simples, com intensidade de 400  $\mu$ A era aplicada por 10 min (Figura 16). Cinco minutos após a estimulação, o animal era submetido aos testes no labirinto. Na estimulação simulada, os animais *Sham* eram submetidos exatamente aos mesmos procedimentos cirúrgicos e de manipulação que o grupo de estimulação ativa, entretanto, o estimulador não era acionado.



**Figura 19** – Fotografias representativas da estimulação epidural. (a) Conexão do anodo. (b e c) Conexão do catodo, revestido de gel condutor, sobre a pele tricotomizada do dorso do animal. (d) Acionamento do estimulador nos parâmetros “pulso simples”, “0,4 mA”, “10 min”. (e) Contenção do animal por 10 min. Na estimulação *sham*, os mesmos procedimentos eram conduzidos, exceto o passo (d).

A passagem da corrente elétrica pelos eletrodos era confirmada por meio de medição da corrente em um multímetro digital (Smart<sup>®</sup> DT-830B), antes de cada estimulação nos animais do grupo eDCS (Figura 20), o que assegurava a funcionalidade da prótese.



**Figura 20** – Fotografias dos procedimentos de confirmação da passagem da corrente elétrica de 400  $\mu$ A através do catodo (a) e no animal, em três sessões distintas (b, c, d).

As sessões de estimulação ativa e *sham* eram realizadas por meio de contenção manual dos animais, durante todo o período de 10 min. A fim de que fossem atenuados possíveis efeitos de estresse por contenção sobre os resultados da fase VI, assim que os animais de ambos os grupos iniciavam a fase V, eles eram gentilmente contidos manualmente por 5 min na primeira sessão da fase V, seguido por contenções de 10 min nas sessões subsequentes, sempre imediatamente antes de cada procedimento no LR-8. As contenções descritas também foram realizadas imediatamente antes das sessões de retardos de 5 s da fase VI, por 10 min. Os processos descritos e os de estimulação foram conduzidos pelos mesmos experimentadores (B e C) até o término do protocolo experimental, em uma mesma sala apropriada, o que garantiu a habituação dos animais aos procedimentos de manipulação.

#### **4.6 Administrações da memantina**

Para avaliação dos efeitos agudos do antagonista glutamatérgico sobre a memória operacional espacial, as administrações IP iniciavam na fase VI dos experimentos no LR-8. Considerando-se que foram empregadas amostras dependentes, os animais eram aleatorizados nas doses de memantina e salina (NaCl a 0,9 %), obedecendo-se ao método do quadrado latino. Desse modo, cada animal era submetido a uma ordem individual de combinações no decorrer do experimento.

As doses estabelecidas da droga, incluindo salina, foram administradas, respeitando-se um intervalo de 15 min antes das estimulações e de 30 min antes da submissão do animal às tarefas de retardo de 4 h ou de 10 h (Figura 16). Adicionalmente, era administrada apenas uma única dose por dia em cada animal, com um intervalo de pelo menos três dias entre as administrações.

A memantina (memantina HCl, fabricação em 05/2011, validade até 05/2014, lote IF-ME-110502, Iffect Chemphar, Nanjing, China) foi previamente aprovada em testes de controle de qualidade, por laboratório farmacêutico licenciado (Pharma Nostra, lote 11061897B, Anápolis, GO, Brasil), cumprindo a normatização sanitária brasileira relacionada ao controle de qualidade de insumos farmacêuticos. Mantida em solução salina estéril, em concentrações de 0,32 mg/mL, 1 mg/mL e 3,2 mg/mL, as soluções eram conservadas em temperatura de 4 °C. Novas soluções eram preparadas a cada mês de experimento. Para os procedimentos de administração, as doses eram administradas em volumes de 0,1 mL/100 g de peso corporal do animal.

#### **4.7 Análise histológica**

Ao término dos experimentos, era conduzida a análise histológica para avaliar a integridade histológica cortical, subjacente ao eletrodo de estimulação. Assim, após completarem a fase VI no LR-8, os animais eram submetidos à perfusão intracardiaca, remoção dos seus cérebros e processamento histológico.

Os animais recebiam uma sobredose de cetamina (Dopalen<sup>®</sup> injetável, 116 mg/mL de cloridrato de cetamina, Sespo, Paulínia, SP, Brasil) e xilazina (Anasedan<sup>®</sup> injetável, 23 mg/mL de cloridrato de xilazina, Sespo, Paulínia, SP, Brasil), via IP, fixados a uma

plataforma de perfusão e submetidos à toracotomia. Após a exposição do coração e ligadura da aorta descendente, introduzia-se uma agulha no ventrículo esquerdo. Em seguida, o átrio direito era seccionado e realizava-se a perfusão com 200 mL de solução salina (NaCl a 0,9 %), seguida de 200 mL de solução de formaldeído a 10 %, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex<sup>®</sup> CE 77120-70, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA).

Após decapitação, os cérebros eram posteriormente removidos e mantidos em solução de formaldeído a 10 %, por um período mínimo de 48 h.

Posteriormente, os cérebros eram devidamente posicionados em um criostato (Leica Microsystems<sup>®</sup>, CM 1850, Wetzlar, Alemanha) e seccionados em cortes coronais de 20 µm de espessura. Os cortes obtidos da região subjacente ao eletrodo de estimulação (Bregma: 3.00 mm) e correspondente hemisfério contralateral eram estendidos sequencialmente, à temperatura ambiente, em lâminas previamente gelatinizadas. Após 24 h, os tecidos eram submetidos à técnica de coloração de Nissl com vermelho neutro (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) e montados em DPX (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA). Após secagem, os sítios corticais eram registrados por meio de um fotomicroscópio (Leica Microsystems<sup>®</sup>, DM2800, Wetzlar, Alemanha), nas referências do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (2005).

#### **4.8 Análise estatística**

Foram registrados os pesos corporais, os erros cometidos e o tempo individual gasto em cada sessão de treinamento. Os pesos corporais foram expressos como média (em gramas) ± erro padrão da média (e.p.m.). Os erros de desempenho foram definidos como a repetição de braços anteriormente visitados, somados aos braços omitidos que deveriam ser visitados em uma mesma sessão de treinamento. Os erros de desempenho foram apresentados sob a forma de média de erros ± e.p.m.. O tempo gasto em cada braço foi definido pela relação entre o tempo total de permanência no labirinto (em segundos) e o número de braços visitados em cada sessão ou corrida (pré-retardo ou pós-retardo), sendo expresso sob a forma de média (em segundos) ± e.p.m.. O número de sessões para alcançar o critério nas fases IV e V de treinamento foi expresso como média ± e.p.m..

Para análise dos pesos corporais foram considerados, para cada animal, dois registros de peso por fase de treinamento no LR-8, sendo um ao início e o outro ao término da fase. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de um fator para medidas repetidas, seguida do *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas.

Nas fases IV e V, para análise dos erros cometidos e do tempo gasto nas sessões de aquisição da tarefa, foram empregadas regressão linear e ANOVA de um fator para medidas repetidas, seguida do *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Foram consideradas as últimas sete sessões de treinamento na fase IV e as últimas quatro sessões na fase V.

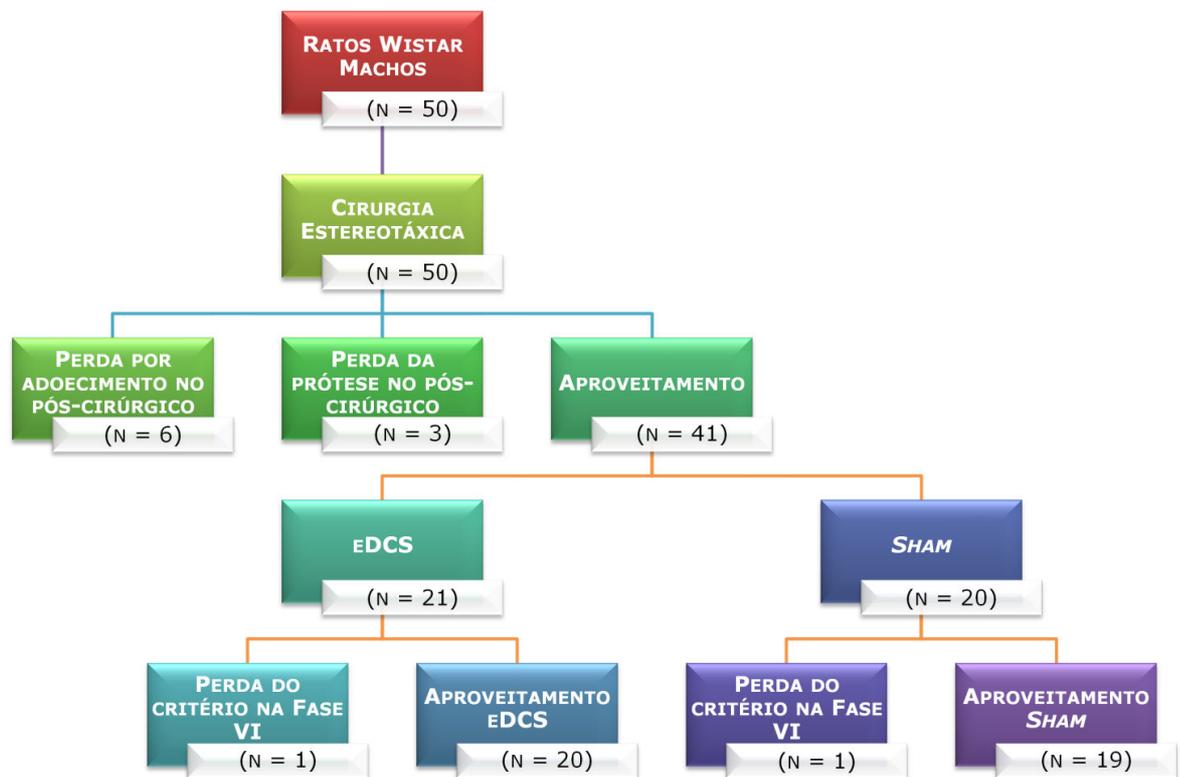
Na fase VI, a partir de um estudo exploratório dos dados para verificar a normalidade da distribuição, por meio do teste de Shapiro-Wilk, foi observado que os resultados obtidos de erros e de tempos de desempenho não seguiram uma distribuição normal. Dessa forma, foi empregada análise estatística não paramétrica na fase VI. Para comparações intragrupo, entre as doses utilizadas de memantina ou salina em função dos erros cometidos ou do tempo gasto, em cada pré ou pós-retardo de 4 h e de 10 h, foi empregado teste de Friedman seguido de *post-hoc* de Dunn. Nas comparações intergrupos, para cada dose utilizada, em função dos erros cometidos ou do tempo gasto, foi empregado teste de Mann-Whitney. Para comparações intragrupo, para detectar diferenças de desempenho entre os retardos, para cada dose, foi empregado teste de Wilcoxon.

Para todas as análises, foi adotado um nível de significância  $p$  de 5 % e foi utilizado o *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 5.01, La Jolla, CA, EUA) para análise estatística e representação gráfica.

## *5 Resultados*

82 % (n = 41; Figura 21) dos animais utilizados recuperaram-se da cirurgia com sucesso (hígidos e com a prótese íntegra). Nas sessões intermediárias de retardos de 5 s da fase VI, um animal de cada grupo foi excluído do experimento por não atingir o critério de zero ou um erro por quatro sessões consecutivas. Dessa forma, houve 78 % de aproveitamento (n = 39) dos animais utilizados até o fim do protocolo. Considerando-se que o mesmo animal foi submetido a retardos de 4 h e de 10 h, segue abaixo o n amostral final para cada grupo:

<p>➤ Grupo <i>Sham</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Retardo de 4 h (n = 18)</li> <li>○ Retardo de 10 h (n = 13)</li> </ul>	<p>➤ Grupo eDCS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Retardo de 4 h (n = 16)</li> <li>○ Retardo de 10 h (n = 12)</li> </ul>
---	--



**Figura 21** – Diagrama esquemático do aproveitamento dos animais. Nove animais foram excluídos no pós-cirúrgico e dois animais foram excluídos na fase VI, com 78 % de aproveitamento (n = 39) dos animais utilizados até o fim do protocolo.

### 5.1 Pesos corporais

Os pesos corporais dos animais foram monitorados ao longo de todo o protocolo experimental (Tabela 1). Ao início do protocolo, os animais pesavam  $330,2 \text{ g} \pm 11,21$  (n = 39).

A ANOVA de um fator para medidas repetidas detectou diferenças de peso estatisticamente significantes [ $F(7,226) = 61,45$ ;  $p < 0,0001$ ] entre as fases do LR-8 e o *post-hoc* de Tukey revelou diferenças estatísticas em todas as fases, em comparação com a média de peso inicial dos animais ( $p < 0,0001$ ). Também foram encontradas diferenças entre as fases I a III em comparação com o início da última fase ( $p < 0,05$ ) e com o seu término ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 1** – Média dos pesos corporais (g)  $\pm$  e.p.m. dos animais (n = 39) ao longo das fases de treinamento no LR-8 e o seu percentual em relação à média do peso inicial (330,2 g  $\pm$  11,21).

Fases	Média (g) $\pm$ e.p.m.	% do peso inicial
I a III	275,2 $\pm$ 9,43 ***	83
IV inicial	273,2 $\pm$ 9,01 ***	83
IV final	274,2 $\pm$ 7,45 ***	83
V inicial	277,8 $\pm$ 7,21 ***	84
V final	281,6 $\pm$ 7,40 ***	85
VI inicial	287,4 $\pm$ 7,35 *** +	87
VI final	294,2 $\pm$ 5,60 *** +++	89

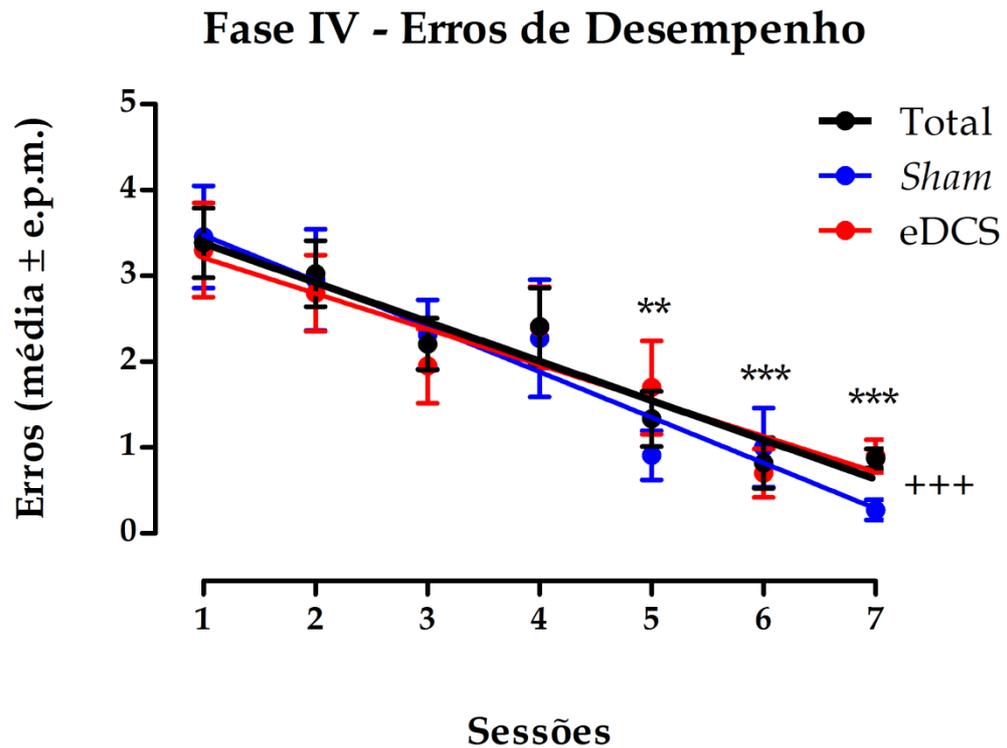
\*\*\*  $p < 0,0001$  comparado ao peso inicial; +  $p < 0,05$  comparado às fases I a III; +++  $p < 0,0001$  comparado às fases I a III (ANOVA de um fator para medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey).

## 5.2 Aprendizagem

### 5.2.1 Fase IV

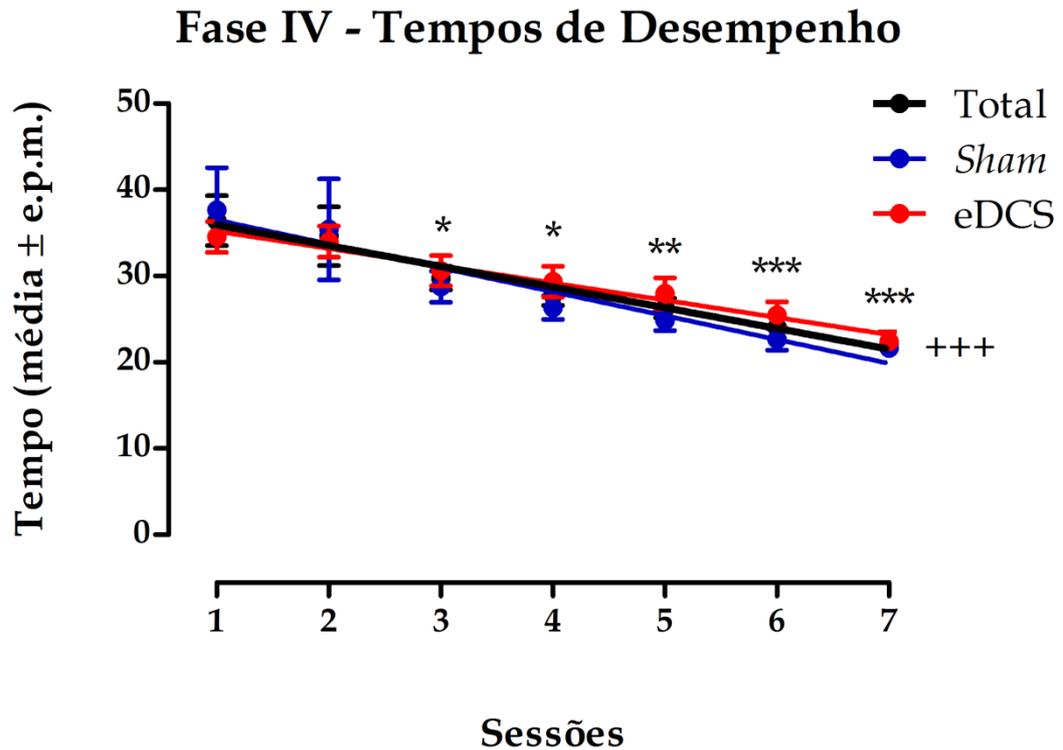
Os animais levaram em média  $7,51 \pm 0,33$  sessões para atingir o critério pré-estabelecido de aprendizagem na fase IV (grupo eDCS:  $7,65 \pm 0,33$  sessões; grupo *Sham*:  $7,41 \pm 0,52$  sessões). Portanto, foram consideradas as últimas sete sessões de treinamento para análise estatística e representação gráfica.

A regressão linear mostrou que os animais (n = 39) apresentaram uma melhora progressiva do seu desempenho (Figuras 22 e 23), refletida pela redução da média de erros cometidos [ $F(1,271) = 51,4$ ;  $Y = 3,839 - 0,4579X$ ;  $r^2 = 0,1594$ ;  $p < 0,0001$ ] e do tempo gasto em cada braço [ $F(1,271) = 44,05$ ;  $Y = 38,36 - 2,404X$ ;  $r^2 = 0,1398$ ;  $p < 0,0001$ ].



**Figura 22** – Média de erros  $\pm$  e.p.m. nas sete últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 ( $n = 39$ ). +++  $p < 0,0001$  na análise de regressão linear para os grupos Total, Sham e eDCS. \*\*\*  $p < 0,0001$  e \*\*  $p < 0,01$  no grupo Total em comparação com a primeira e à segunda sessão pela ANOVA de um fator para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey.

A ANOVA de um fator para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre os erros cometidos [ $F(6,228) = 10,27$ ;  $p < 0,0001$ ] e entre o tempo gasto em cada braço [ $F(6,228) = 11,51$ ;  $p < 0,0001$ ] ao longo das sessões ( $n = 39$ ). O teste de Tukey para comparações múltiplas revelou diferenças estatisticamente significantes entre os erros cometidos (Figura 22) nas últimas três sessões ( $p < 0,01$ ) em comparação à primeira e à segunda sessão e entre o tempo gasto em cada braço (Figura 23) nas últimas cinco sessões ( $p < 0,05$ ) em comparação à primeira e à segunda sessão.



**Figura 23** – Média de tempo  $\pm$  e.p.m. nas sete últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 ( $n = 39$ ). +++  $p < 0,0001$  na análise de regressão linear para os grupos Total, Sham e eDCS. \*\*\*  $p < 0,0001$  e \*\*  $p < 0,01$  em comparação à primeira e à segunda sessão para o grupo Total; \*  $p < 0,05$  em comparação à primeira sessão para o grupo Total (ANOVA de um fator para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey).

Analisou-se, separadamente, o desempenho dos animais que foram posteriormente distribuídos nos grupos Sham e eDCS (Figuras 22 e 23). A regressão linear mostrou que os animais Sham e eDCS apresentaram uma melhora progressiva do seu desempenho, refletida pela redução da média de erros cometidos pelos grupos Sham [ $F(1,152) = 34,43$ ;  $Y = 4,006 - 0,5308X$ ;  $r^2 = 0,1847$ ;  $p < 0,0001$ ] e eDCS [ $F(1,138) = 26,03$ ;  $Y = 3,629 - 0,4161X$ ;  $r^2 = 0,1587$ ;  $p < 0,0001$ ] e do tempo gasto em cada braço nos grupos Sham [ $F(1,152) = 22,88$ ;  $Y = 39,27 - 2,770X$ ;  $r^2 = 0,1308$ ;  $p < 0,0001$ ] e eDCS [ $F(1,138) = 41,50$ ;  $Y = 37,21 - 1,999X$ ;  $r^2 = 0,2312$ ;  $p < 0,0001$ ].

A ANOVA de um fator para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre os erros cometidos nos grupos Sham [ $F(6,126) = 6,552$ ;  $p < 0,0001$ ] e eDCS [ $F(6,114) = 5,697$ ;  $p < 0,0001$ ] e entre o tempo gasto em cada braço nos grupos Sham [ $F(6,126) = 5,905$ ;  $p < 0,0001$ ] e eDCS [ $F(6,114) = 14,04$ ;  $p < 0,0001$ ] ao longo das sessões. O *post-hoc* de Tukey identificou diferenças estatisticamente significantes entre os erros cometidos no grupo Sham nas últimas três sessões ( $p < 0,05$ ) em comparação à primeira e à

segunda sessão e no grupo eDCS nas últimas duas sessões ( $p < 0,05$ ) em comparação à primeira e à segunda sessão. Similarmente, em relação ao tempo gasto em cada braço, o teste de Tukey encontrou diferenças estatísticas nos grupos *Sham* e eDCS nas últimas quatro sessões ( $p < 0,05$ ) em comparação à primeira e à segunda sessão.

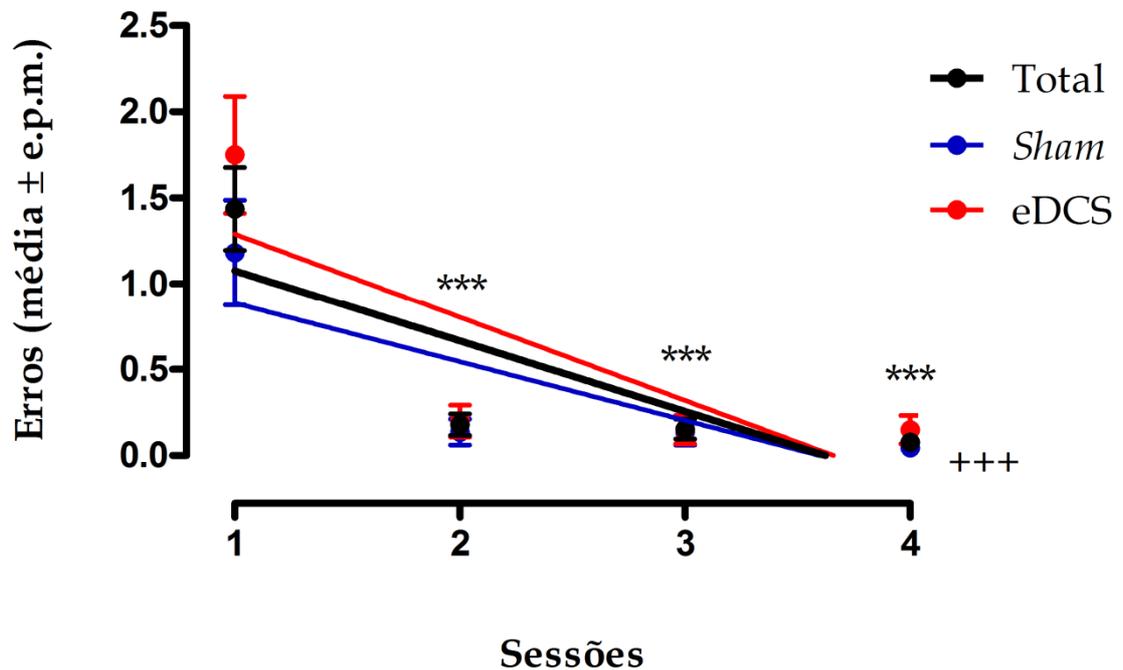
### 5.2.2 Fase V

Os animais aprenderam rapidamente a tarefa na fase V (Figuras 24 e 25); levaram em média  $4,26 \pm 0,29$  sessões para alcançar o critério pré-estabelecido (grupo eDCS:  $4,80 \pm 0,49$  sessões; grupo *Sham*:  $3,82 \pm 0,24$  sessões). Portanto, foram analisadas as últimas quatro sessões de treinamento para análise estatística e representação gráfica.

A regressão linear ( $n = 39$ ; Figuras 24 e 25) evidenciou a rápida redução do número de erros cometidos no pós-retardo [ $F(1,154) = 43,59$ ;  $Y = 1,487 - 0,4103X$ ;  $r^2 = 0,2206$ ;  $p < 0,0001$ ] e uma diminuição gradual do tempo gasto em cada braço [ $F(1,154) = 16,11$ ;  $Y = 20,58 - 0,996X$ ;  $r^2 = 0,0947$ ;  $p < 0,0001$ ]. Quanto ao pré-retardo, etapa de menor demanda cognitiva que o pós-retardo, a quase totalidade dos animais desempenhou a tarefa com zero ou um erro desde a primeira sessão da fase V (dados não apresentados).

No pós-retardo, a ANOVA de um fator para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes entre os erros cometidos [ $F(3,114) = 28,38$ ;  $p < 0,0001$ ] e entre o tempo gasto em cada braço [ $F(3,114) = 7,0$ ;  $p < 0,05$ ] ao longo das sessões (Figuras 24 e 25). O teste de Tukey para comparações múltiplas identificou diferenças estatisticamente significantes entre os erros cometidos nas três últimas sessões em comparação à primeira sessão ( $p < 0,0001$ ) e entre o tempo gasto em cada braço na última sessão em comparação à primeira ( $p = 0,0002$ ) e à segunda sessão ( $p = 0,0011$ ).

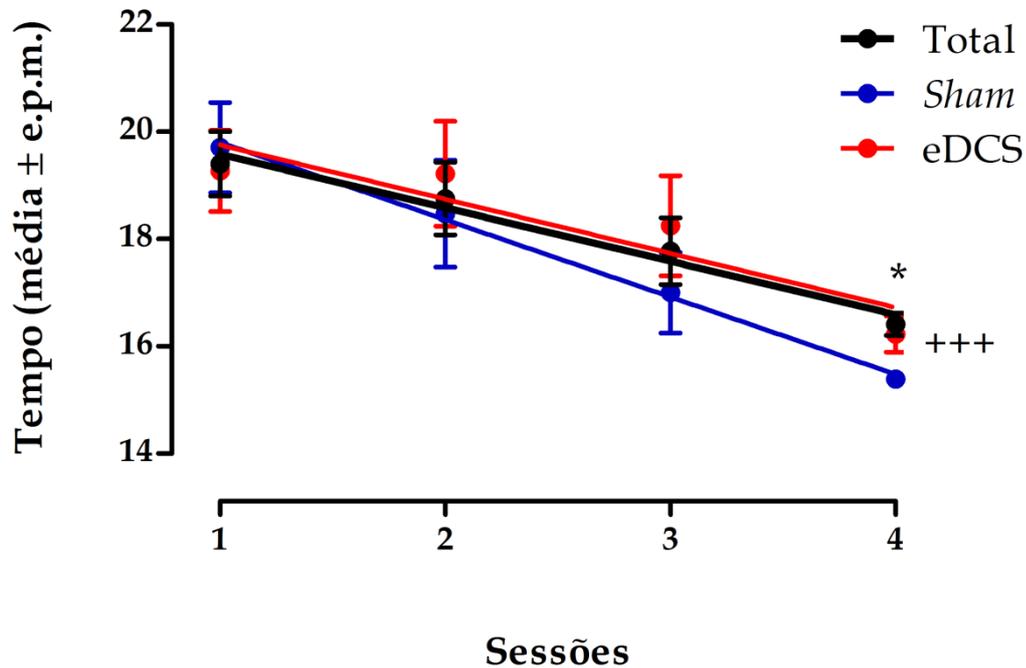
## Fase V - Erros de Desempenho no Pós-retardo



**Figura 24** – Média de erros  $\pm$  e.p.m. nas quatro últimas sessões de treinamento na fase V (aprendizagem) no LR-8 ( $n = 39$ ). +++  $p < 0,0001$  na análise de regressão linear para os grupos Total, Sham e eDCS. \*\*\*  $p < 0,0001$  em comparação à primeira sessão para os grupos Total, Sham e eDCS pela ANOVA de um fator para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey.

Analisou-se, separadamente, o desempenho dos animais que foram posteriormente randomizados nos grupos Sham e eDCS (Figuras 24 e 25). A regressão linear mostrou que os animais Sham e eDCS apresentaram um perfil semelhante em seu desempenho, no pós-retardo, observado pela redução da média de erros cometidos pelos grupos Sham [ $F(1,86) = 19,69$ ;  $Y = 1,227 - 0,3409X$ ;  $r^2 = 0,1863$ ;  $p < 0,0001$ ] e eDCS [ $F(1,78) = 27,73$ ;  $Y = 1,775 - 0,4850X$ ;  $r^2 = 0,2623$ ;  $p < 0,0001$ ] e do tempo gasto em cada braço nos grupos Sham [ $F(1,86) = 18,54$ ;  $Y = 21,25 - 1,441X$ ;  $r^2 = 0,1773$ ;  $p < 0,0001$ ] e eDCS [ $F(1,78) = 8,169$ ;  $Y = 20,77 - 1,01X$ ;  $r^2 = 0,0948$ ;  $p = 0,0055$ ].

## Fase V - Tempos de Desempenho no Pós-retardo



**Figura 25** – Média de tempo  $\pm$  e.p.m. nas quatro últimas sessões de treinamento na fase V (aprendizagem) no LR-8 ( $n = 39$ ). +++  $p < 0,0001$  na análise de regressão linear para os grupos Total, Sham e eDCS. \*  $p < 0,01$  em comparação à primeira e à segunda sessão para os grupos Total, Sham e eDCS pela ANOVA de um fator para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey.

A ANOVA de um fator para medidas repetidas revelou diferenças estatisticamente significantes entre os erros cometidos nos grupos Sham [ $F(3,63) = 11,36$ ;  $p < 0,0001$ ] e eDCS [ $F(3,57) = 21,6$ ;  $p < 0,0001$ ] e entre o tempo gasto em cada braço nos grupos Sham [ $F(3,63) = 7,899$ ;  $p < 0,0001$ ] e eDCS [ $F(3,57) = 3,644$ ;  $p < 0,05$ ] ao longo das sessões (Figuras 24 e 25). O *post-hoc* de Tukey identificou diferenças estatisticamente significantes entre os erros cometidos nos grupos Sham e eDCS nas últimas três sessões ( $p < 0,0001$ ) em comparação às suas respectivas primeiras sessões. Ainda, em relação ao tempo gasto em cada braço, o teste de Tukey encontrou diferenças estatísticas no grupo Sham nas últimas duas sessões ( $p < 0,05$ ) em comparação à primeira e à segunda sessão e no grupo eDCS na última sessão ( $p < 0,05$ ) em comparação à primeira e à segunda sessão.

### 5.2.3 Fase VI

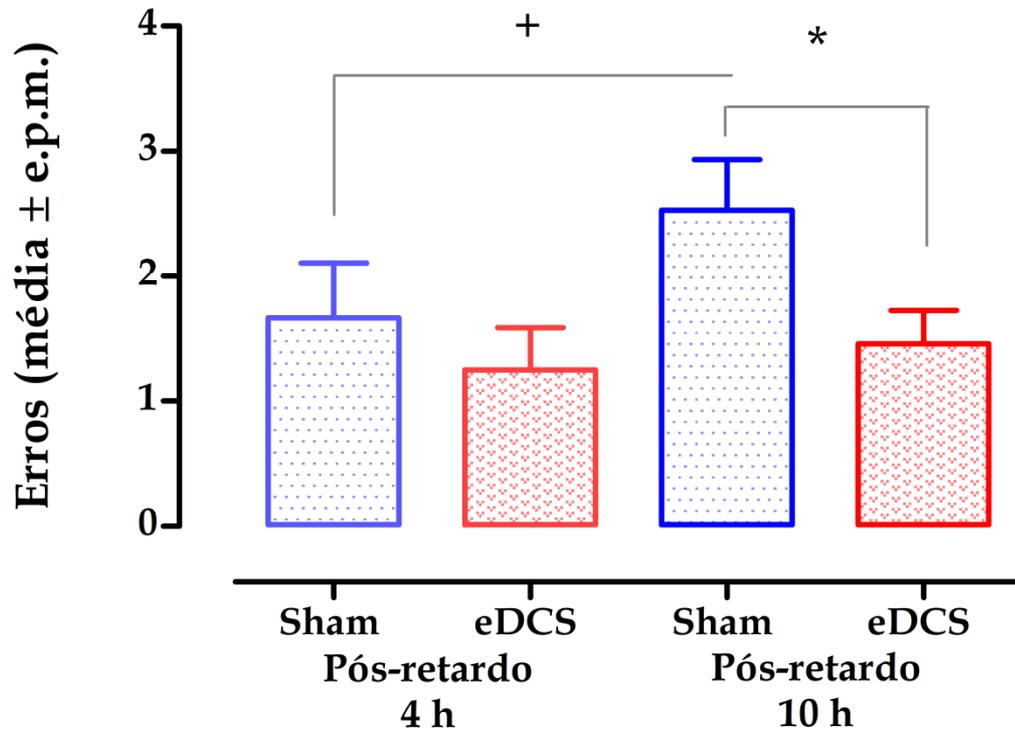
#### 5.2.3.1 Efeitos da eDCS sobre o desempenho da memória operacional espacial no LR-8: administrações de salina

Na fase VI dos procedimentos no LR-8, procurou-se, inicialmente, examinar possíveis diferenças no desempenho da memória operacional espacial nos ratos sob a eDCS em comparação com a estimulação *sham*, sob a administração IP de salina.

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk revelou que os dados obtidos de erros e de tempos de desempenho na fase VI não seguiram uma distribuição normal. Dessa forma, procederam-se análises estatísticas com testes não paramétricos.

O grupo eDCS desempenhou as tarefas de memória operacional espacial com menor número de erros (Figura 26) e completou o pós-retardo de 10 h com significativamente menos erros ( $1,46 \pm 0,27$ ;  $n = 12$ ) em comparação ao pós-retardo de 10 h do grupo *Sham* ( $2,53 \pm 0,40$ ;  $n = 13$ ), pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos erros de desempenho entre os grupos no pós-retardo de 4 h. O grupo *Sham* cometeu um maior número de erros no pós-retardo de 10 h em comparação ao pós-retardo de 4 h ( $1,67 \pm 0,44$ ;  $n = 18$ ) de forma estatisticamente significativa pelo teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ; Figura 26). Ainda que o grupo eDCS tenha errado mais no pós-retardo de 10 h em comparação ao seu pós-retardo de 4 h ( $1,25 \pm 0,33$ ;  $n = 16$ ), esta diferença não produziu significância estatística.

## Erros de Desempenho - Salina Pós-retardo



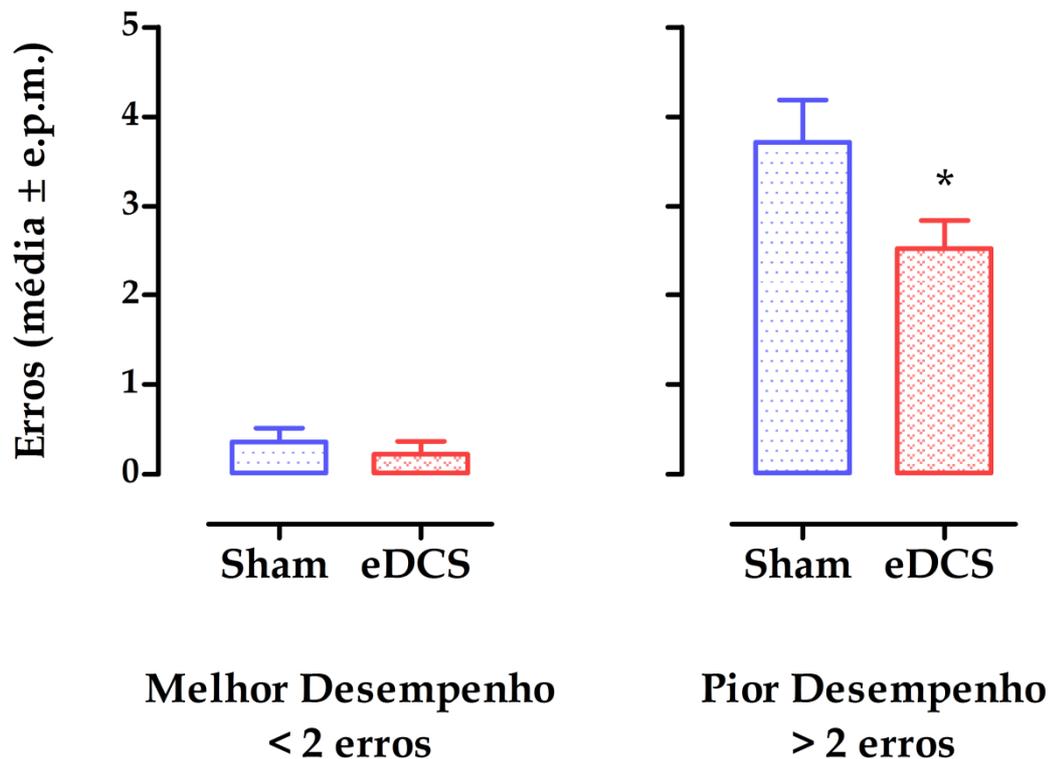
**Figura 26** – Média de erros  $\pm$  e.p.m. nos pós-retardos de 4 h (à esquerda) e de 10 h (à direita), nos grupos *Sham* e eDCS, sob a administração IP de salina. \*  $p < 0,05$ , grupo *Sham* em comparação ao grupo eDCS, no pós-retardo de 10 h, pelo teste de Mann-Whitney. +  $p < 0,05$ , grupo *Sham* no pós-retardo de 4 h, em comparação ao seu pós-retardo de 10 h, pelo teste de Wilcoxon.

Considerando-se a observação de uma média menor de erros no grupo eDCS sob a dose de salina nos dois pós-retardos e a ocorrência de subgrupos de melhor e pior desempenho, foi realizada uma análise específica do desempenho dos animais. Para tanto, foi adotado o critério de até dois erros cometidos no pós-retardo, sob o efeito de salina, para os subgrupos eDCS e *Sham* de melhor desempenho e acima de dois erros cometidos, também sob o efeito de salina, para os subgrupos de pior desempenho no LR-8. Todavia, não foi possível constituir subgrupos no retardo de 10 h, uma vez que não houve suficiente número de animais que preenchessem o critério de “melhor desempenho”, devido ao maior grau de dificuldade do teste. Desse modo, para o retardo de 4 h, foram constituídos os subgrupos, a seguir:

- |   |   |
|---|---|
| <p>➤ Subgrupos <i>Sham</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Melhor desempenho (n = 11)</li> <li>○ Pior desempenho (n = 7)</li> </ul> | <p>➤ Subgrupos eDCS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Melhor desempenho (n = 9)</li> <li>○ Pior desempenho (n = 7)</li> </ul> |
|---|---|

Na análise dos erros de desempenho dos subgrupos, sob a administração de salina (Figura 27), foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre o subgrupo eDCS de pior desempenho ( $2,53 \pm 0,31$ ), em comparação ao subgrupo *Sham* de também pior desempenho ( $3,71 \pm 0,47$ ), pelo teste de Mann Whitney.

## Erros de Desempenho - Subgrupos Salina



**Figura 27** – Média de erros  $\pm$  e.p.m. nos pós-retardos de 4 h nos subgrupos de melhor (à esquerda) e de pior desempenho (à direita), sob a administração IP de salina. \*  $p < 0,05$  em comparação ao pós-retardo de 4 h do subgrupo *Sham* de pior desempenho, pelo teste de Mann-Whitney.

Quanto ao pré-retardo, etapa de menor demanda cognitiva que o pós-retardo, a quase totalidade dos animais desempenhou a tarefa com zero ou um erro, em todas as doses da fase VI (dados não apresentados).

Em relação aos tempos de desempenho (Tabela 2), não houve diferenças estatisticamente significantes nas comparações intra ou intergrupos, no pré e no pós-retardo, entre as administrações IP de salina.

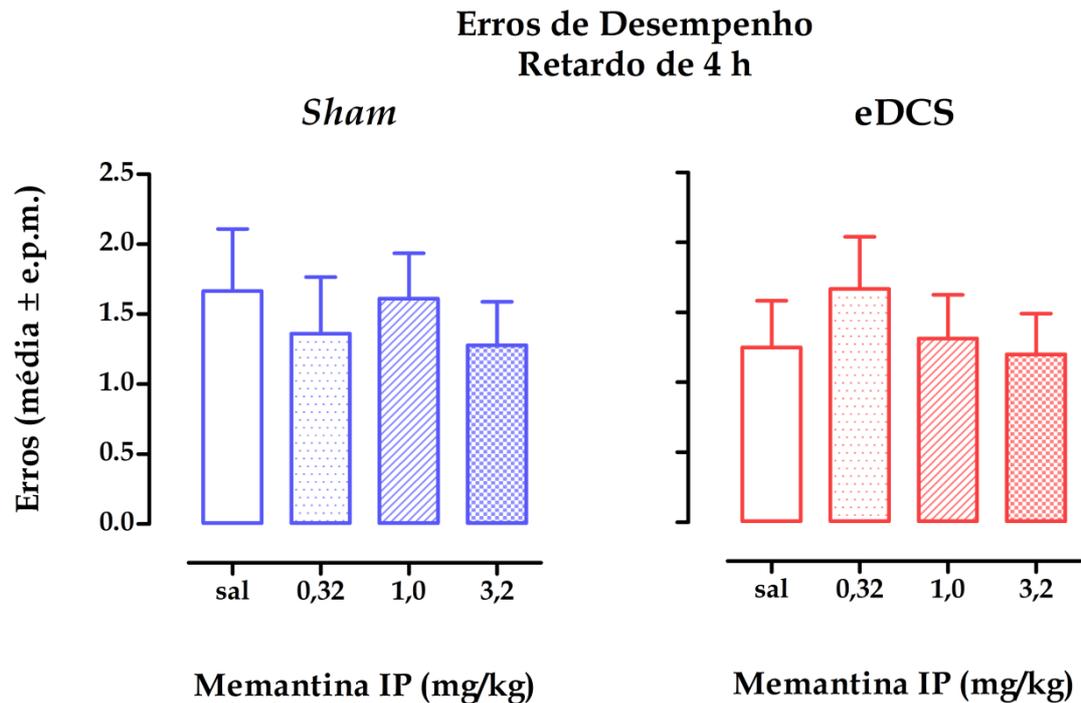
**Tabela 2** – Média de tempo (s)  $\pm$  e.p.m. nos pré e pós-retardos de 4 h e 10 h nos grupos e subgrupos, sob a administração IP de salina. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tempos de desempenho na dose de salina.

Grupo / Subgrupo	Retardo de 4 h	
	Pré-retardo	Pós-retardo
<i>Sham</i>	18,31 $\pm$ 1,22	18,33 $\pm$ 0,83
eDCS	18,84 $\pm$ 2,25	18,72 $\pm$ 1,45
<b>Sham de melhor desempenho</b>	19,64 $\pm$ 1,71	17,83 $\pm$ 0,94
<b>Sham de pior desempenho</b>	16,21 $\pm$ 1,40	19,11 $\pm$ 1,60
<b>eDCS de melhor desempenho</b>	17,03 $\pm$ 1,75	19,02 $\pm$ 2,43
<b>eDCS de pior desempenho</b>	21,16 $\pm$ 4,70	18,33 $\pm$ 1,35
Grupo	Retardo de 10 h	
	Pré-retardo	Pós-retardo
<i>Sham</i>	19,57 $\pm$ 1,40	18,00 $\pm$ 0,82
eDCS	22,77 $\pm$ 3,62	23,51 $\pm$ 4,73

### 5.2.3.2 Retardos de 4 h

Foram examinadas diferenças nos efeitos das diferentes doses de memantina, em cada grupo, nos retardos de 4 h. Com o objetivo de se verificar se a memantina interfere nos efeitos observados da eDCS, foram realizadas comparações intra e intergrupos, para todas as doses utilizadas, em função do desempenho no LR-8.

Na análise dos grupos totais, *Sham* e eDCS, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intragrupos pelo teste de Friedman e intergrupos pelo teste de Mann-Whitney, no pós-retardo de 4 h (Figura 28).



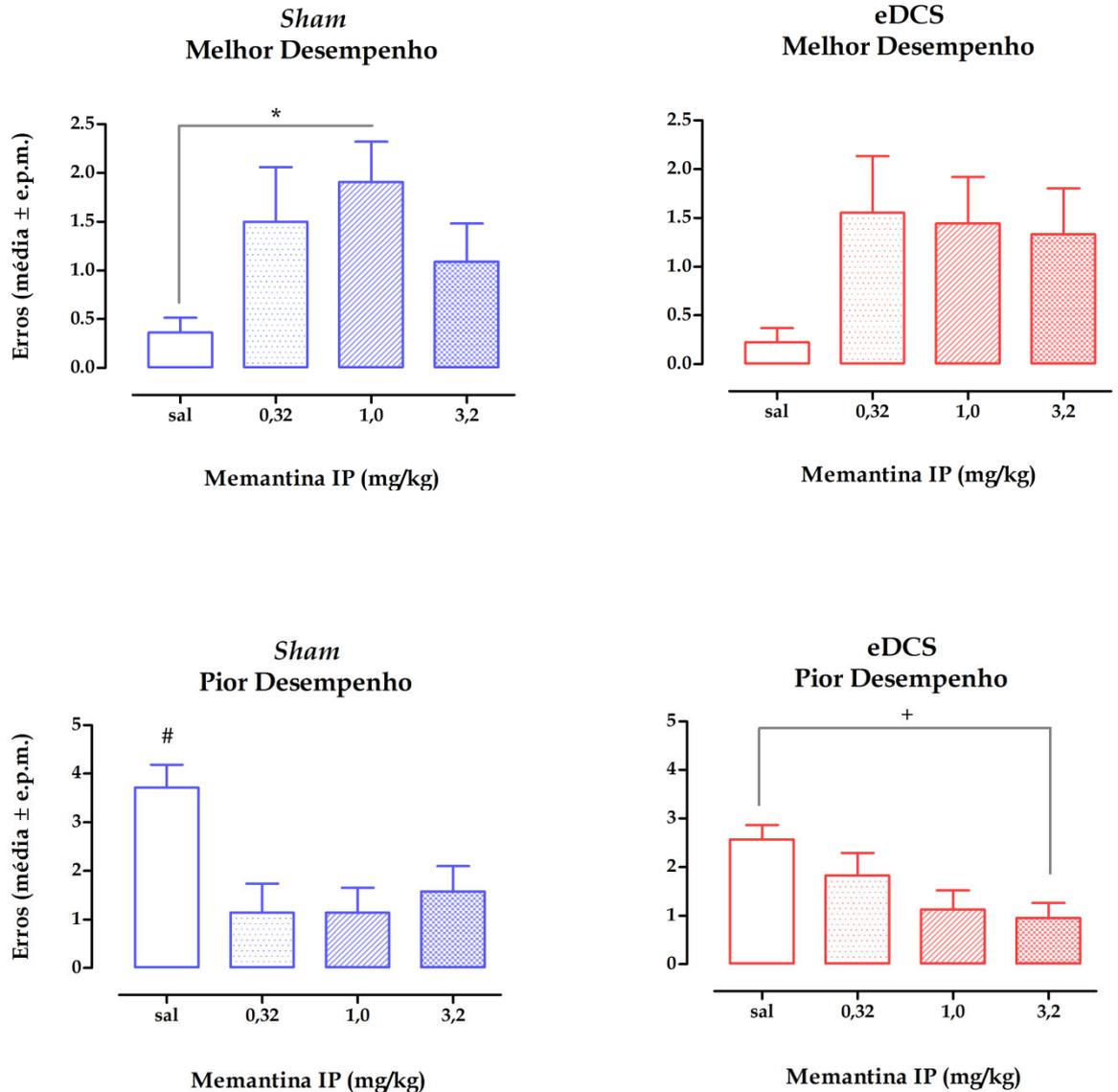
**Figura 28** – Média de erros  $\pm$  e.p.m. nos pós-retardos de 4 h nos grupos *Sham* e eDCS, sob a administração IP de salina e memantina (mg/kg). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os erros de desempenho, no pós-retardo de 4 h, nas comparações intra e intergrupos.

Na análise de subgrupos (Figura 29), foram apontadas diferenças estatísticas entre os erros de desempenho nas distintas doses do subgrupo *Sham* de melhor desempenho, pelo teste de Friedman ( $p < 0,05$ ) e o *post-hoc* de Dunn revelou um aumento estatisticamente significativo dos erros na dose de 1,0 mg/kg ( $1,91 \pm 0,41$ ) de memantina em comparação à salina ( $0,36 \pm 0,15$ ) ( $p < 0,05$ ). No subgrupo eDCS de pior desempenho, também foram encontradas diferenças estatísticas entre as doses, pelo teste de Friedman ( $p < 0,05$ ) e o *post-hoc* de Dunn detectou uma redução dos erros estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na dose de 3,2 mg/kg de memantina ( $0,96 \pm 0,31$ ) em comparação à salina ( $2,57 \pm 0,30$ ). Foi ainda detectada uma diferença estatisticamente significativa entre a dose de 3,2 mg/kg de memantina do subgrupo eDCS de pior desempenho ( $0,96 \pm 0,31$ ) e a dose de salina do subgrupo *Sham* de pior desempenho ( $3,71 \pm 0,47$ ), pelo teste de Mann-Whitney ( $p < 0,01$ ).

No subgrupo eDCS de melhor desempenho, as doses empregadas de memantina promoveram um aumento dos erros no pós-retardo de 4 h (Figura 29), contudo, sem diferenças estatisticamente significantes (teste de Friedman). Os animais do subgrupo *Sham* de pior desempenho cometeram menos erros no pós-retardo de 4 h, em todas as doses de memantina,

em comparação ao seu desempenho com salina, entretanto, sem diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Friedman.

## Erros de Desempenho (Subgrupos) Retardo de 4 h



**Figura 29** – Média de erros  $\pm$  e.p.m. nos pós-retardos de 4 h nos subgrupos de melhor e pior desempenho, sob a administração IP de salina e memantina (mg/kg). \*  $p < 0,05$ , teste de Friedman com *post-hoc* de Dunn (salina e memantina 1 mg/kg). +  $p < 0,05$ , teste de Friedman com *post-hoc* de Dunn (salina e memantina 3,2 mg/kg). #  $p < 0,01$ , teste de Mann-Whitney (salina do subgrupo Sham de pior desempenho e memantina 3,2 mg/kg do subgrupo eDCS de pior desempenho). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos erros de desempenho no pós-retardo de 4 h nas comparações intragrupos nos subgrupos eDCS de melhor desempenho e Sham de pior desempenho (teste de Friedman).

Em relação aos tempos de desempenho, na análise dos grupos totais, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos tempos de desempenho, nos pré e pós-retardos de 4 h, nas comparações intra e intergrupos (Tabela 3). Para os subgrupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos tempos de desempenho, nos pré-retardos de 4 h, nas comparações intragrupos (teste de Friedman).

**Tabela 3** – Média de tempo (s)  $\pm$  e.p.m. nos pré e pós-retardos de 4 h, nos grupos e subgrupos, sob a administração IP de salina ou memantina.

Dose		Grupo / Subgrupo					
		<i>Sham</i>	eDCS	<i>Sham</i> Melhor desempenho	<i>Sham</i> Pior desempenho	eDCS Melhor desempenho	eDCS Pior desempenho
Salina	Pré	18,31 $\pm$ 1,22	18,84 $\pm$ 2,25	19,64 $\pm$ 1,71	16,21 $\pm$ 1,40	17,03 $\pm$ 1,75	21,16 $\pm$ 4,70
	Pós	18,33 $\pm$ 0,83	18,72 $\pm$ 1,45	17,83 $\pm$ 0,94	19,11 $\pm$ 1,60	19,02 $\pm$ 2,43	18,33 $\pm$ 1,35
0,32 mg/kg	Pré	18,03 $\pm$ 1,74	17,43 $\pm$ 1,25	20,97 $\pm$ 2,50	13,83 $\pm$ 0,82	16,71 $\pm$ 1,13	18,51 $\pm$ 2,54
	Pós	24,33 $\pm$ 3,46	17,25 $\pm$ 0,82	29,05 $\pm$ 5,06 #	17,60 $\pm$ 2,69	17,27 $\pm$ 1,43	17,23 $\pm$ 0,63
1 mg/kg	Pré	18,71 $\pm$ 1,88	17,79 $\pm$ 1,29	19,74 $\pm$ 2,98	17,09 $\pm$ 1,37	17,10 $\pm$ 1,68	18,69 $\pm$ 2,10
	Pós	18,98 $\pm$ 0,78	19,09 $\pm$ 1,49	20,35 $\pm$ 0,93	16,83 $\pm$ 0,97	19,36 $\pm$ 2,55	18,74 $\pm$ 1,23
3,2 mg/kg	Pré	20,46 $\pm$ 1,83	23,48 $\pm$ 6,19	20,15 $\pm$ 1,69	20,96 $\pm$ 4,10	17,51 $\pm$ 1,66	18,67 $\pm$ 2,36
	Pós	20,71 $\pm$ 1,44	17,98 $\pm$ 1,39	22,60 $\pm$ 1,96	17,73 $\pm$ 1,63	17,37 $\pm$ 1,59	18,90 $\pm$ 2,54

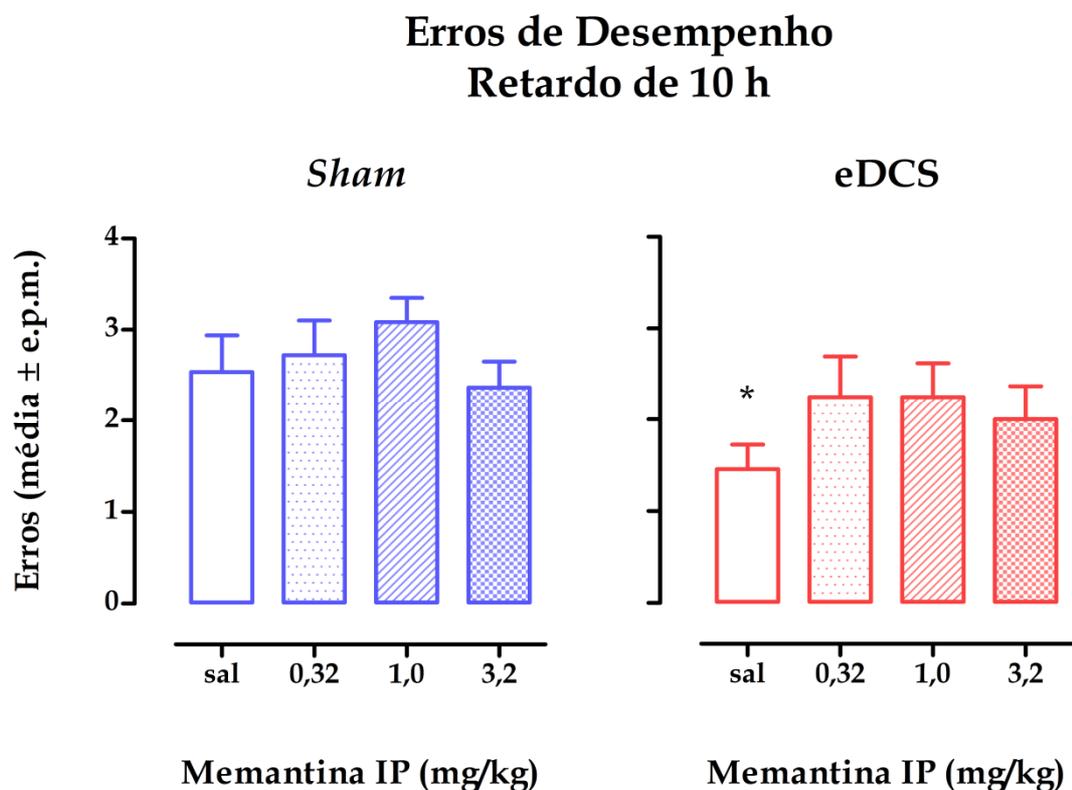
#  $p < 0,05$  em comparação ao pós-retardo do subgrupo *Sham* de melhor desempenho, sob a administração de salina (teste de Friedman com *post-hoc* de Dunn).

Nas análises dos pós-retardos de 4 h (Tabela 3), o teste de Friedman apontou diferenças estatisticamente significantes no subgrupo *Sham* de melhor desempenho ( $p < 0,05$ ) e o *post-hoc* de Dunn detectou uma elevação no tempo de desempenho sob a administração de 0,32 mg/kg de memantina (29,05 s  $\pm$  5,06) em relação à salina (17,83 s  $\pm$  0,94) ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.3.3 Retardos de 10 h

Foram buscadas diferenças nos efeitos das diferentes doses de memantina, em cada grupo, nos retardos de 10 h.

Na análise dos grupos totais, *Sham* e eDCS, foi observada uma tendência global na redução dos erros no pós-retardo de 10 h, no grupo eDCS, em todas as doses de memantina, em comparação ao grupo *Sham*. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas comparações intragrupos pelo teste de Friedman e intergrupos pelo teste de Mann-Whitney, no pós-retardo de 10 h (Figura 30), exceto pela comparação entre as administrações de salina, estatisticamente significativa, como previamente apresentada (Figura 26).



**Figura 30** – Média de erros  $\pm$  e.p.m. nos pós-retardos de 10 h, nos grupos *Sham* e eDCS, sob a administração IP de salina e memantina (mg/kg). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos erros de desempenho, no pós-retardo de 10 h nas comparações intra e intergrupos para as doses de memantina. \*  $p < 0,05$  em comparação ao pós-retardo do grupo *Sham*, sob a administração de salina, pelo teste de Mann-Whitney.

Faz-se lembrar de que não foi possível efetuar as análises de subgrupos no retardo de 10 h, uma vez que não houve suficiente número de animais que preenchessem o critério de “bom desempenho”, devido ao maior grau de dificuldade do teste.

Quanto aos tempos de desempenho (Tabela 4), não houve diferenças estatisticamente significantes nos pré e pós-retardos de 10 h, nas comparações intra e intergrupos.

**Tabela 4** – Média de tempo (s)  $\pm$  e.p.m. nos pré e pós-retardos de 10 h, nos grupos *Sham* e eDCS, sob a administração IP de salina ou memantina. Não houve diferenças estatisticamente significantes nos tempos de desempenho nos pré e pós-retardos de 10 h nas comparações intra e intergrupos.

Dose		Grupo	
		<i>Sham</i>	eDCS
Salina	Pré	19,57 $\pm$ 1,40	22,77 $\pm$ 3,62
	Pós	18,00 $\pm$ 0,82	23,51 $\pm$ 4,73
0,32 mg/kg	Pré	17,94 $\pm$ 1,70	20,55 $\pm$ 2,42
	Pós	18,12 $\pm$ 1,15	19,93 $\pm$ 1,31
1 mg/kg	Pré	22,11 $\pm$ 4,07	18,80 $\pm$ 1,26
	Pós	16,84 $\pm$ 0,87	19,13 $\pm$ 1,58
3,2 mg/kg	Pré	18,07 $\pm$ 1,39	23,78 $\pm$ 4,15
	Pós	17,73 $\pm$ 1,10	22,29 $\pm$ 2,94

### 5.3 Análise histológica

A análise histológica (Figura 31) mostrou que a integridade da citoarquitetura cortical subjacente ao eletrodo de estimulação foi preservada em comparação à região correspondente no hemisfério contralateral. Não foram detectadas lesões neuronais, pela coloração de Nissl, nas áreas representativas do CPFm: Cg1 (área 1 do cíngulo anterior) e córtex pré-límbico (PAXINOS; WATSON, 2005), sob estimulação epidural anódica de 400  $\mu$ A desta região.



## *6 Discussão*

### **6.1 Avaliação dos efeitos da eDCS sobre a memória operacional espacial**

Na fase VI, procurou-se, inicialmente, examinar possíveis diferenças no desempenho de ratos na memória operacional espacial sob a eDCS, em comparação com a estimulação *sham*.

O grupo eDCS cometeu menor número de erros de desempenho nas tarefas com retardos prolongados no LR-8, sob a administração de salina IP, comparado ao grupo *Sham*, sendo estatisticamente significativa para o retardo de 10 h, considerando todos os animais e, para o retardo de 4 h, em um subgrupo de animais com baixo desempenho basal. Isso mostra que a estimulação epidural cortical por corrente contínua de 400  $\mu$ A sobre o CPFm esquerdo parece favorecer o desempenho dos testes com retardos prolongados e, subsequentemente, facilita o componente de longa duração da memória operacional espacial.

Ao mesmo tempo, a eDCS não modificou o desempenho dos animais com melhor linha de base comportamental, ou seja, o subgrupo de animais com até dois erros sob a dose de salina, no pós-retardo de 4 h.

Nas comparações inter-retardos de 4 h e de 10 h, sob as administrações de salina, o aumento da dificuldade da tarefa (prolongamento do tempo de retardo) gerou aumentos nos erros de desempenho estatisticamente significantes no grupo *Sham*. O grupo eDCS cometeu mais erros de desempenho no pós-retardo de 10 h, em comparação ao seu pós-retardo de 4 h, entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Pode-se inferir, pelos resultados apresentados, que a eDCS no CPFm esquerdo, aplicada agudamente, pode aprimorar o desempenho da memória operacional espacial em ratos, sobretudo em tarefas de maior grau de dificuldade e em um subgrupo de animais com pior desempenho e, paralelamente, não compromete o desempenho de animais com melhor linha de base comportamental.

### **6.2 Avaliação dos efeitos da memantina sobre a memória operacional espacial**

Os efeitos das diferentes doses de memantina foram examinados na análise de desempenho do grupo *Sham*, nos testes com retardos de 4 h e 10 h.

O efeito da memantina no protocolo adotado e nas doses utilizadas, administradas agudamente, foi sutil, uma vez que não foram detectadas diferenças estatisticamente

significantes interdoses no grupo *Sham* Total, em ambos os retardos. Entretanto, nas análises dos subgrupos *Sham*, a memantina produziu efeitos antagônicos, em função da linha de base comportamental dos animais, como serão explanados adiante.

A memantina prejudicou o desempenho dos animais com melhor linha de base na memória operacional espacial, como visto no perfil dose-resposta do subgrupo *Sham* de melhor desempenho. Neste caso, observa-se a formação de uma curva em U invertido, com o seu ápice na dose de 1 mg/kg, sendo esta diferença estatisticamente significativa em relação à salina. Prejuízos no desempenho também foram observados nas doses de 0,32 mg/kg e 3,2 mg/kg em comparação à salina, embora não tenham sido estatisticamente significantes.

Por outro lado, a memantina apresentou uma propensão a facilitar o desempenho dos animais com pior linha de base na memória operacional espacial, como visto no perfil dose-resposta do subgrupo *Sham* de pior desempenho. As reduções dos erros no pós-retardo de 4 h ocorreram em todas as doses de memantina em comparação à salina, mas não de forma estatisticamente significativa. Todavia, o efeito observado foi nitidamente antagônico àquele produzido pela memantina nos animais *Sham* de melhor desempenho.

Assim, diferentemente da eDCS, a memantina pode prejudicar o desempenho de animais com melhor linha de base comportamental, configurando um padrão dose-resposta em U invertido, enquanto tende a aprimorar o desempenho de animais com pior linha de base e, neste caso, seguindo um padrão dose-resposta em U.

### **6.3 Avaliação dos efeitos da memantina sobre a eDCS na memória operacional espacial**

Com o objetivo de se verificar se a memantina interfere nos efeitos observados da eDCS, foram realizadas comparações intergrupos, para cada dose utilizada, em função do desempenho no LR-8.

As doses utilizadas de memantina também prejudicaram o desempenho dos animais eDCS de melhor desempenho, contudo, sem gerar diferença estatisticamente significativa, como ocorreu no subgrupo *Sham* de melhor desempenho supracitado.

Por outro lado, na análise do subgrupo eDCS de pior desempenho, houve uma facilitação da memória operacional espacial ao longo das doses, atingindo significância estatística na dose

de 3,2 mg/kg, em relação à salina. Cumpre ressaltar que esta diferença do efeito combinado da eDCS e a maior dose de memantina deu-se na comparação com o desempenho de animais sob eDCS que receberam salina, e que já apresentaram uma redução significativa do número de erros comparada ao subgrupo *Sham*. A magnitude do efeito foi ainda maior na comparação entre a dose de 3,2 mg/kg no subgrupo eDCS de pior desempenho com o subgrupo *Sham* de pior desempenho, sob a dose de salina.

Nas análises dos tempos de desempenho, não ocorreram diferenças estatisticamente significantes majoritárias entre os grupos e subgrupos, nos pré e nos pós-retardos. O prolongamento do tempo de desempenho no pós-retardo de 4 h na dose de 0,32 mg/kg do subgrupo *Sham* de melhor desempenho, em comparação ao seu pós-retardo, sob a administração de salina, foi observado em apenas um animal, o que não pode ser, portanto, atribuído a um efeito da memantina. Assim, os resultados mostram que nas doses utilizadas, não houve alterações significativas nos tempos de desempenho da tarefa de memória operacional espacial.

Os dados apresentados sugerem que a eDCS parece facilitar os efeitos de melhora do desempenho produzidos pela memantina, em animais com pior linha de base comportamental. Ainda, esses resultados sugerem que houve interações nos efeitos da estimulação epidural por corrente contínua de 400  $\mu$ A no CPFm esquerdo e o bloqueio de baixa afinidade do NMDAR pela memantina sobre a memória operacional espacial.

Adiante, serão pormenorizadas questões concernentes ao delineamento experimental e, posteriormente, serão levantadas hipóteses explicativas para os efeitos observados neste estudo.

## **6.4 Delineamento experimental**

### *6.4.1 Memória operacional espacial pelo paradigma do LR-8*

Olton e Samuelson (1976) foram os pioneiros na proposição do LR-8 como modelo eficaz e validado para a avaliação da memória operacional espacial em roedores. O modelo vale-se de que em tarefas espaciais, os ratos têm uma acentuada habilidade de recordar as informações e usá-las apropriadamente de forma flexível e adaptável. Ainda, a tarefa é sensível aos efeitos

de determinadas lesões cerebrais (CHURCHWELL; KESNER, 2011) e de numerosos fármacos (OLTON, 1987) que podem prejudicar ou facilitar o desempenho.

Segundo Olton (1987), o modelo apresenta validade etológica, pois há uma influência do risco de predação percebida nas decisões de forrageamento, mesmo em laboratório, em que não há ameaças reais de predação, e sugere que os ratos tratam o LR-8 como um ambiente naturalista. O animal tende a recorrer à sua melhor estratégia cognitiva para se movimentar no LR-8 e realiza a tomada de decisão para obter alimento com o gasto mínimo de esforço e menor exposição ao risco contextual (FLORESCO; GHODS-SHARIFI, 2007; OLTON, 1987). Quando o risco pressuposto é reduzido, o conflito da exposição ao ambiente também é diminuído e é favorecida a avaliação experimental da memória operacional. Desse modo, a sala de experimentação do LR-8 utilizada foi adaptada com temperatura constante, iluminação artificial escura e controle da geração de ruídos.

Os experimentos iniciais com o LR-8 (OLTON; SAMUELSON, 1976) mostraram que os ratos não se guiam por pistas intralabirinto (odores do reforço, rastros de odores etc) ou por cadeias de resposta egocêntricas (como escolher braços adjacentes) para resolver a tarefa. A localização de cada braço é especificada por pistas visuoespaciais extralabirinto, ou seja, aloctrônicas (OLTON, 1976). Por outro lado, a redução da saliência dos estímulos em torno do labirinto, como tornar a sala de experimentação um ambiente homogêneo, pode influenciar substancialmente o desempenho. Isso pode obrigar o rato a usar estratégias não mnemônicas para resolver a tarefa, como informações egocêntricas ou trilhas de odor. Assim, a sala de experimentação continha pistas visuais facilmente detectáveis a partir do LR-8, como citadas na sessão método e, ainda, o LR-8 era higienizado ao término de cada sessão individual.

As portas do tipo guilhotina foi um recurso utilizado em quase todas as fases de treinamento. Elas são uma característica crítica do labirinto, por confinar o rato na plataforma central entre as escolhas. Caso contrário, o rato pode desenvolver uma resposta padrão tendenciosa, o que torna a interpretação dos resultados difícil; isto é, torna-se impossível determinar se o rato lembrou da opção correta ou se procedeu um mero hábito de resposta.

Embora a privação parcial de alimento levasse à redução do peso corporal dos animais para garantir a busca pelo reforço no LR-8, especialmente nas fases iniciais, esse decréscimo não ultrapassou o limite controlado de 80 %, e ainda foi observada uma recuperação gradual do peso, seguindo o ganho ponderal dos animais. As diferenças estatisticamente significantes que

foram encontradas entre as médias de peso das fases I a III em comparação com a última fase refletem a recuperação de peso.

Os animais completaram satisfatoriamente as fases de aquisição da tarefa (IV e V) e a análise estatística revelou que os animais que foram posteriormente distribuídos em *Sham* e eDCS apresentaram desempenho semelhante, tanto no que se refere à média de sessões necessárias para concluir cada fase, quanto na redução gradual da média de erros e de tempos de desempenho no LR-8.

Em suma, ao término das fases de aquisição da tarefa, os animais exibiam bom estado geral, aprendizagem satisfatória e recuperação pós-cirúrgica com alto rendimento, o que resultou em uma alta porcentagem de aproveitamento dos animais até o fim do protocolo (78 %).

Segundo Olton (1979), em relação aos itens retidos na memória operacional (fase VI), independentemente da ordem serial da entrada nos braços, não há evidências significativas de efeitos de primazia ou de recência, sob esse paradigma. Não há interferências significativas entre os itens acumulados em um teste de memória operacional em relação a um novo teste, mesmo quando o intervalo entre os testes seja curto (OLTON, 1979). Por fim, a seleção da ordem de escolha dos braços pelo animal parece ocorrer por um processo aleatório, não há nenhuma indicação significativa de uma ordem previsível, pelo menos, quando é adotado o confinamento na plataforma central (OLTON, 1979).

A memória de referência também está envolvida nos procedimentos realizados (OLTON; BECKER; HANDELMANN, 1979). Enquanto a memória operacional é manifestada nas informações que são apenas relevantes durante a experiência com a tarefa, a memória de referência, mais rígida, são as informações necessárias em todas as exposições à tarefa, ou seja, em todas as sessões de teste. Estas últimas incluem as habilidades motoras e perceptuais necessárias para o animal guiar-se no ambiente, relativas ao fato de que o alimento está localizado na extremidade do braço, à execução das regras definidas em cada fase, e assim por diante. Em contraste com a memória operacional espacial, a memória de referência exibe maior capacidade, duração e resistência à interferência (OLTON; BECKER; HANDELMANN, 1979).

Ainda, estão envolvidas a codificação retrospectiva, que informa ao animal acerca dos braços já visitados e a codificação prospectiva, amplamente definida como a intenção de executar um plano de ação futura e contar com a capacidade de codificar e mais tarde recuperar o conteúdo

do plano, em um momento apropriado no futuro, frequentemente na presença de uma pista eliciadora da ação (KAMETANI; KESNER, 1989).

A memória operacional evoluiu do antigo conceito de memória de curto prazo, e os dois termos são ainda por vezes utilizados indistintamente (BADDELEY, 2012). A memória de curto prazo refere-se ao simples armazenamento temporário de informações, em contraste com a memória operacional, que implica uma combinação de armazenamento e manipulação ativa das informações (BADDELEY, 2012). Entretanto, Atkinson e Shiffrin (1968) postularam a memória de curto prazo como um processo cognitivo para a manipulação da informação, o que pode explicar por que muitos estudos posteriores não têm discriminado os dois termos.

Notoriamente, a memória operacional tem sido referida como a capacidade de manter uma informação *on-line* referente a um estímulo que já não está presente (GOLDMAN-RAKIC, 1994). Sendo assim, a tarefa prototípica ilustrativa desse conceito envolve um período de retardo que, no caso do presente estudo, foram adotados retardos de 4 h e de 10 h. Retardos crescentes podem exigir a codificação prospectiva, dependente da busca retroativa da memória (CHURCHWELL; KESNER, 2011). Evidentemente, quanto maior o período de retardo, maior o tempo requerido para a manutenção ativa das informações e, portanto, maior a demanda de memória operacional.

#### 6.4.1.1 Memória operacional espacial: correlatos anatomofuncionais

Relatos prévios usando o LR-8 sugerem fortemente um envolvimento do CPFm na organização da informação espacial recentemente adquirida (SEAMANS; FLORESCO; PHILLIPS, 1995) e na memória operacional espacial (TAYLOR; LATIMER; WINN, 2003). Dado o forte componente de memória operacional e os complexos mecanismos de seleção da resposta espacial necessários para resolver a tarefa no LR-8, neurônios do CPFm modulam a atividade enquanto o número de itens (braços) armazenados no *buffer* da memória operacional aumenta gradualmente. Há ainda explicações baseadas na atividade altamente correlacionada no CPFm e hipocampo (GOTO; GRACE, 2008; JONES; WILSON, 2005), sugerindo uma interação funcional entre as duas estruturas.

Similar aos primatas com danos no CPF DL, ratos com danos no CPFm dorsal frequentemente mostram déficits em tarefas de memória operacional espacial que exigem uma resposta após um retardo (HORST; LAUBACH, 2009). Essa homologia anatomofuncional com o CPF DL do primata é ainda mais reforçada em experimentos que exibem atividade celular persistente durante períodos de retardo, relacionada ao desempenho correto da tarefa de memória operacional espacial (FUNAHASHI, 2006). Ainda, lesões no CPF DL do primata produziram prejuízos que estão presentes em retardos crescentes (FUNAHASHI; BRUCE; GOLDMAN-RAKIC, 1993), enquanto prejuízos na memória operacional espacial têm também sido observados após lesões ou inativações do CPFm em ratos (TAYLOR; LATIMER; WINN, 2003).

Adicionalmente, ratos com lesões no CPFm têm desempenho prejudicado em tarefas de memória operacional espacial com retardo de 30 min (SEAMANS; FLORESCO; PHILLIPS, 1995) e exibem um aumento significativo de respostas prematuras (NARAYANAN; HORST; LAUBACH, 2006). Roedores com inativação do CPFm mostram desempenho normal no forrageamento livre no LR-8, enquanto a estrutura é requisitada em uma tarefa de memória operacional espacial com retardo no LR-8 (SEAMANS; FLORESCO; PHILLIPS, 1995).

O contexto temporal de uma tarefa pode também modular o disparo dos neurônios do CPFm: algumas células respondem seletivamente ao intervalo inter-sessões ou a braços específicos do LR-8, o que sugere como função cortical pré-frontal a codificação de regras ou de sequências comportamentais (JUNG *et al*, 1998).

O CPFm também é fortemente modulado por eventos motivacionalmente salientes, tanto positivos e negativos. No CPFm do roedor, geralmente cerca de um terço das células mostram alterações nas taxas de disparo vinculadas à recompensa ou à sua expectativa, em tarefas de memória espacial no LR-8 (PRATT; MIZUMORI, 2001). Um estudo eletrofisiológico em roedor mostrou que respostas no CPFm dorsal foram fortemente conduzidas pela navegação do animal no labirinto, enquanto as respostas no CPFm ventral apresentaram maior sensibilidade à recompensa (SUL *et al*, 2010). O CPFm dorsal também é capaz de alterar a atividade neuronal de outras áreas, como o córtex motor, exercendo um controle *top-down*, a fim de inibir respostas motoras temporalmente inapropriadas (NARAYANAN; LAUBACH, 2006).

São reconhecidas especializações subregionais do CPF, de acordo com a modalidade do estímulo retido na memória operacional, como espacial, objetos visuais, odor e sabor

(GOLDMAN-RAKIC, 1996). Especificamente, lesões nas sub-regiões pré-límbica e/ou infralímbica do CPFm de ratos produzem prejuízos na memória operacional para informações visuoespaciais (DIAS; AGGLETON, 2000). Esses resultados indicam que a modalidade do estímulo utilizado no treinamento pode ser fundamental para revelar a memória operacional e outras funções executivas dentro das várias sub-regiões do CPF do roedor.

Ainda, tarefas de memória operacional espacial no LR-8 com retardo requerem que o rato utilize uma estratégia prospectiva para localizar a recompensa, enquanto tarefas sem retardo requerem que o rato utilize uma estratégia retrospectiva (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997). Foi mostrado que o desempenho na tarefa visuoespacial com retardo requer o córtex pré-límbico funcional, ao passo que a tarefa sem retardo não o demanda (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997; SEAMANS; FLORESCO; PHILLIPS, 1995; TAYLOR; LATIMER; WINN, 2003). Por meio de análise eletrofisiológica, Saint Blanquat *et al* (2010) observaram que, durante a tomada de decisão na memória operacional no LR-8, neurônios do CPFm exibem correlatos comportamentais, sugestivos da estratégia prospectiva.

Considerando a função proeminente do hipocampo na memória, não é surpreendente que o hipocampo e o CPFm são anatomicamente relacionados. Em comparação com outras áreas corticais, projeções da metade ventral do hipocampo e do subiculum ao CPFm são particularmente densas (CENQUIZCA; SWANSON, 2007; JAY; WITTER, 1991). A via é unidirecional, mas pode ser recíproca em uma rota bissináptica através do núcleo reuniens ou do córtex lateral entorrinal (BURWELL; AMARAL, 1998; VERTES *et al*, 2007).

Uma vez que o CPFm recebe inervação direta da formação hipocampal e o desempenho em tarefas espaciais de memória operacional é comumente acometido após lesões do hipocampo (WANG; CAI, 2008) e há coordenação da atividade CPFm-hipocampo em tarefas de memória espacial (JONES; WILSON, 2005), é factível especular que os componentes espaciais da função do CPFm são transmitidos pela influência hipocampal (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012).

Especificamente, tem sido sugerido que o hipocampo e o CPFm podem, por vezes, operar independentemente ou em paralelo, em condições em que existe um breve retardo interposto na tarefa (LEE; KESNER, 2003) ou interagem sob condições em que a memória prospectiva é necessária em retardos mais prolongados (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997). Há evidências que sugerem que o hipocampo esteja envolvido nas memórias prospectiva e retrospectiva (FERBINTEANU; SHAPIRO, 2003) e que o CPFm esteja mais criticamente

envolvido nos processos de memória prospectiva (KESNER, 1989). Desde que longos retardos podem ditar uma mudança na estratégia de codificação da memória, o CPFm pode ser necessário para organizar sequências espaciais representadas no hipocampo para a codificação prospectiva (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012).

Na medida em que a condição dos retardos de 4 h e de 10 h requer codificação, recuperação e execução da ação no pós-retardo, com base na memória do evento do pré-retardo, o hipocampo e especialmente o CPFm podem ser requeridos para atuar como um circuito integrado para proporcionar o bom desempenho da memória operacional.

Consistente com isso, Floresco, Seamans e Phillips (1997) utilizaram uma técnica de desconexão funcional, em que o animal é mantido com um hipocampo e um CPFm intactos, mas sem conexão entre eles. Esta técnica tem sido utilizada para demonstrar que a comunicação CPFm-hipocampal é necessária para a execução de tarefas, em paradigmas de memória operacional espacial no LR-8 (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997; GOTO; GRACE, 2008) e no labirinto aquático (WANG; CAI, 2008). De fato, os efeitos da desconexão CPFm-hipocampal são quase os mesmos que os observados após a inativação bilateral do CPFm, apoiando a alegação de que o CPFm é dependente da via hipocampal-CPFm, tanto para o contexto e para a aprendizagem rápida.

A evidência suporta duas possíveis funções para a projeção hipocampal ao CPFm: fornecer contexto espacial ou permitir aprendizagem associativa rápida (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012). A capacidade do hipocampo para codificar a localização espacial é bem conhecida (WILSON; MCNAUGHTON, 1993). No entanto, quando se move ao longo do eixo septal (dorsal) ao temporal (ventral) do hipocampo, campos de localização tornam-se progressivamente maiores (JUNG; WIENER; MCNAUGHTON, 1994). Campos hipocampais ventrais são tão grandes que eles provavelmente codificam o contexto global (ou seja, em que ambiente o animal se encontra) (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; KJELSTRUP *et al*, 2008). Por conseguinte, o CPFm, cujas aferências do hipocampo surgem principalmente do hipocampo ventral, não exibem evidências de respostas do tipo células de localização, mas permitem discriminar entre ambientes (JUNG *et al*, 1998).

O outro papel possível da projeção hipocampal ao CPFm apoia a aprendizagem rápida. A formação rápida e a consolidação de associações entre contextos, eventos e respostas dentro do CPFm pode depender do hipocampo, enquanto o armazenamento a longo prazo pode ser mediado principalmente pelo CPFm (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012).

Há evidências de um envolvimento do estriado na aprendizagem e na memória. Esta estrutura parece estar particularmente envolvida na aprendizagem procedural, com a aquisição de respostas sequenciais, como virar à esquerda ou à direita em labirintos (MYHRER, 2003). Danos ao estriado resultam em prejuízos na geração de respostas motoras (EAGLE *et al*, 1999). O estriado dorsal está envolvido em controle sensoriomotor e na aprendizagem de hábitos e o estriado ventral, em comportamentos de motivação e de recompensa (EAGLE *et al*, 1999).

A atividade associativa intacta é provavelmente necessária para o aprendizado e a memória em todas as fases de treinamento no LR-8. O sistema de memória do CPF e do estriado envolve projeções dopaminérgicas, glutamatérgicas e colinérgicas (EAGLE *et al*, 1999; MYHRER, 2003), enquanto a atividade na região do hipocampo é fortemente baseada na transmissão mediada por glutamato (MYHRER, 2003). Funções modulatórias, como processos atencionais, emocionais e motivacionais são, provavelmente, apoiadas por sistemas de projeção monoaminérgicos (MYHRER, 2003).

Evidências de estudos que descrevem os efeitos modulatórios sobre a memória, de drogas administradas antes ou após o treinamento comportamental, também destacam a importância de se considerar que os agentes neuromoduladores podem produzir efeitos diferentes em distintas fases da memória, ou seja, de aquisição (ou aprendizagem), consolidação, persistência de longo prazo, reconsolidação e expressão (ou recuperação). Em suma, as experiências utilizando o LR-8 têm proporcionado um meio para a investigação sistemática da memória em animais.

#### 6.4.2 Anestesia

O agente anestésico adotado na cirurgia estereotáxica foi a cetamina, um antagonista não competitivo de NMDAR. Entretanto, por ser a cetamina um fraco antagonista glutamatérgico e possuir meia-vida curta (LIVINGSTON; WATERMAN, 1978), foi descartada a possibilidade de que o seu uso pudesse afetar os resultados dos efeitos induzidos pela estimulação elétrica epidural cortical e nem que interagisse com a memantina.

Por outro lado, a técnica de estimulação elétrica adotada permitiu que os procedimentos experimentais fossem conduzidos com os animais acordados, não anestesiados, o que é uma

vantagem do método, já que o uso de quaisquer anestésicos durante os procedimentos de estimulação dificultaria ou inviabilizaria a avaliação posterior da memória operacional espacial de forma apurada.

#### 6.4.3 A eDCS

A cirurgia de implante do eletrodo de estimulação epidural seguiu o modelo de Custodio *et al* (2012), com modificações. A cirurgia foi um aperfeiçoamento do modelo original, com a preservação de uma fina camada óssea na área de posicionamento do anodo e a utilização de dupla ancoragem da prótese. Essas modificações fizeram-se necessárias, tendo em vista que os animais deveriam manter-se com a prótese por um tempo superior ao estudo anterior. Diante disso, foi propiciada a maior durabilidade das próteses, com 82 % de aproveitamento dos animais operados.

Os efeitos facilitadores da memória operacional espacial neste estudo foram observados após a estimulação epidural de 400  $\mu$ A, aplicada agudamente, por 10 min, 5 min antes da submissão do animal à tarefa no LR-8, repercutindo nos pós-retardos de 4 h e de 10 h. Pode-se afirmar que houve uma sustentação do efeito da eDCS, pois a facilitação da memória operacional espacial repercutiu 4 h ou 10 h após a aplicação da estimulação. Esse achado seria um correlato comportamental que corrobora as clássicas observações de Bindman, Lippold e Redfearn (1962), em que correntes polarizantes levaram a mudanças duradouras no nível da atividade elétrica cortical, traduzindo-se em atividade neuronal aumentada por uma corrente de polaridade anódica.

Cada animal do grupo eDCS recebeu quatro sessões de estimulação, para cada teste de retardo prolongado, com um intervalo inter-sessões de pelo menos três dias, caso cumprisse satisfatoriamente a sessão intermediária de retardo de 5 s. Ainda que tenha havido intervalos entre as estimulações, não se pode descartar a possibilidade de uma sustentação ainda mais estendida dos efeitos da eDCS e, conseqüentemente, a ocorrência de possíveis efeitos *carry-over* da eDCS, de persistência ou de modificação do efeito dos tratamentos aplicados subsequentemente.

A duração dos pós-efeitos é dependente do período de estimulação e do número de tratamentos. Dockery *et al* (2011) usaram um modelo de memória operacional visuoespacial e aprendizagem de habilidade em associação com a ETCC anódica/catódica de 200  $\mu$ A, por 30

min, aplicada no córtex frontal de ratos. Não foram observados efeitos relevantes da ETCC imediatamente após três sessões, mas após um longo intervalo de 21 dias sem estimulações adicionais, foi observado um efeito facilitador nos ratos previamente tratados com ETCC catódica. Isto mostra um efeito tardio da estimulação cerebral não invasiva.

Em outros estudos, enquanto a duração da ETCC de não mais que 7 min produziu apenas 5 min adicionais de pós-efeitos, a estimulação com duração de 9 a 13 min produziu uma sustentação de efeitos de 30 a 90 min, respectivamente (NITSCHE; PAULUS, 2001). Ohn *et al* (2008) investigaram a duração dos efeitos da ETCC anódica de 1 mA, por 30 min, no CPF esquerdo, em voluntários que desempenhavam tarefas de memória operacional. Foi observado que a acuidade da resposta permanecia aumentada por até 30 min após o término da estimulação. Em outros estudos clínicos, a ETCC administrada diariamente (2 mA, 20 min, duas vezes por dia), por vários dias, produziu efeitos de duração de pelo menos um mês na maioria dos participantes (BRUNONI *et al*, 2011).

Os efeitos duradouros da ETCC podem ser expandidos para o tratamento de condições patológicas. Em um estudo mais recente, Laste *et al* (2012) utilizaram um modelo de dor crônica inflamatória em ratos para investigar os efeitos tardios da ETCC. A ETCC anódica de 500  $\mu$ A, aplicada por 20 min, por oito sessões, resultou em efeitos antinociceptivos por até 24 h após o término da estimulação.

Mesmo com a possibilidade da sustentação tardia dos efeitos da eDCS, não se espera que isso tenha afetado significativamente o perfil das curvas dose-resposta obtidas, pois as administrações de memantina e a ordem de aplicação dos retardos foram semirrandomizadas para todos os animais.

Como já descrito na sessão de métodos, este foi um estudo duplo-cego, em que cada experimentador apenas detinha o conhecimento essencial para a execução do procedimento, seja administração e estimulação, seja treinamento do animal no LR-8. A utilização desse recurso possibilitou a redução de expectativas subjetivas dos experimentadores, eliminando vieses sistemáticos dessa natureza. Ao mesmo tempo, os animais *Sham* passaram por estimulações simuladas, idênticas ao procedimento eDCS, exceto que o aparelho não era acionado.

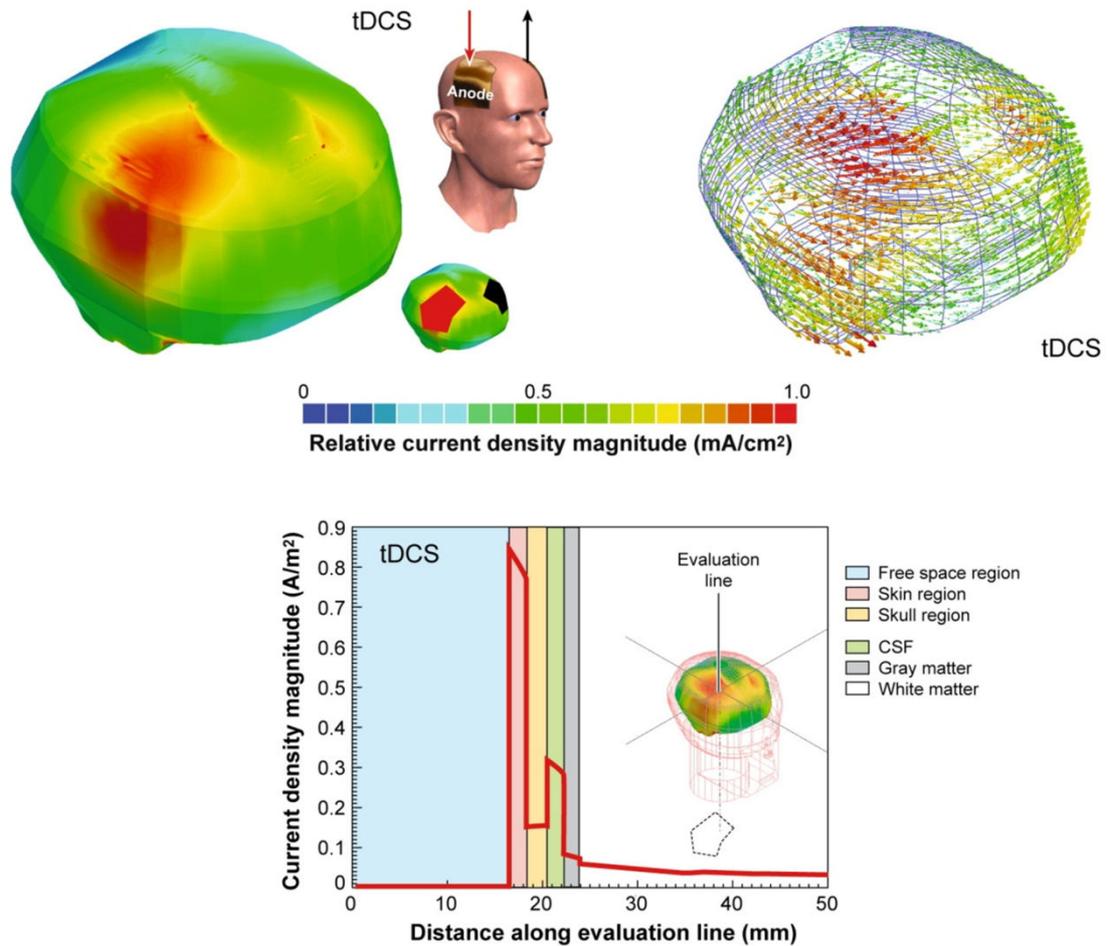
Estudos clínicos duplo-cegos controlados por placebo também são conduzidos no campo da neuromodulação não invasiva. Gandiga *et al* (2006) compararam sensações relatadas como

grau de atenção, fadiga e desconforto entre voluntários que receberam ETCC ou estimulação *sham* por experimentadores cegos para os tipos da estimulação. Os autores não observaram diferenças significativas nas sensações relatadas entre as modalidades de estimulação aplicadas. Além disso, os avaliadores não foram capazes de distinguir entre os tipos de ETCC que os participantes receberam.

A intensidade da corrente adotada de 400  $\mu\text{A}$  e o período de 10 min de estimulação foram os mesmos parâmetros em que Takano *et al* (2011) observaram significativos aumentos de intensidade do sinal de ressonância magnética no córtex frontal e *nucleus accumbens* de ratos. A mesma intensidade de corrente também foi utilizada por Custodio *et al* (2012), que estimaram a densidade de corrente aplicada no anodo (5 mm de diâmetro) como de 20,37  $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ .

A passagem da corrente pelos eletrodos era assegurada por meio de teste em multímetro, realizado em todos os animais, antes de cada sessão de estimulação ativa. A intensidade de corrente indicada pelo multímetro correspondia ao valor aplicado, com oscilações irrisórias, o que certificava a integridade do eletrodo anódico implantado e a funcionalidade da montagem.

Em revisão de Wagner, Valero-Cabre e Pascual-Leone (2007), foram discutidas as variações na densidade da corrente aplicada em função da anatomia, nas montagens de ETCC (Figura 32). A montagem dos eletrodos, a geometria da cabeça, as propriedades eletromagnéticas dos tecidos e a alta resistência do crânio ao fluxo da corrente, em conjunto, são cruciais na distribuição do campo elétrico final e, em última análise, na eficiência da ETCC (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007). O crânio atenua as correntes que alcançam o córtex, que em vez disso, são essencialmente desviadas (*shunting*), ao longo da superfície do couro cabeludo, desvio que provoca a redução em 86 vezes do fluxo da corrente que alcança o córtex, em eletrodos de 1  $\text{cm}^2$  (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007).



**Figura 32** – Diagrama esquemático das variações das magnitudes de densidade de corrente ( $A/m^2$ ) em cada tecido na ETCC. O anodo (seta vermelha) e o catodo (seta preta) representam a montagem da ETCC no modelo em 3-D. Abaixo, representação esquemática gráfica das variações das magnitudes de densidade de corrente em cada tecido na ETCC, ao longo de uma linha de avaliação. Nota-se que as magnitudes da densidade de corrente variam substancialmente em função das heterogeneidades da condutividade dos tecidos. Acima, modelo 3-D em malha com as linhas de avaliação centrais intersectando os tecidos. Adaptado de Wagner, Valero-Cabre e Pascual-Leone, 2007 apud Wagner *et al*, 2007.

O referido efeito do *shunting* da corrente pela pele e crânio foi evidentemente suprimido na montagem da eDCS, o que, por outro lado, requereu prudência na estimação do valor da intensidade de corrente que fosse o quanto menor quanto maior fosse a perda da resistência.

Danos ao tecido cerebral foram identificados por Liebetanz *et al* (2009), após o uso de escalas crescentes de intensidades de corrente catódica e de tempos de exposição, através de um eletrodo epicranial em ratos. Os autores relataram que lesões cerebrais só foram identificáveis quando a corrente excedia  $500 \mu A$ , por períodos superiores a 10 min, ou em intensidades de

corrente bem maiores, por menor período. Os autores propuseram a queimadura como um provável mecanismo de dano.

A análise histológica do presente estudo não mostrou lesões histopatológicas, o que corrobora os limites de segurança propostos por Liebetanz *et al* (2009) e os resultados de Custodio *et al* (2012).

Na medida em que o efeito de *shunting* da corrente é suprimido e a localização do CPFm esquerdo foi precisa no modelo da eDCS, pode-se sugerir que a eDCS é mais focal, em comparação às montagens de ETCC ou de EMT no roedor. A ETCC e a EMT tradicionais são reconhecidamente não focais (WAGNER; VALERO-CABRE; PASCUAL-LEONE, 2007). Isso sugere que poderia haver diferenças sutis nas populações de neurônios ativados entre a eDCS e a ETCC, por exemplo, que resultaria em mudanças de atividade remotas através de diferentes redes neuronais. Em última análise, pode-se hipotetizar que a seletividade espacial da eDCS é maior, mas não absoluta.

A ETCC em ratos utilizada por Takano *et al* (2011) produziu aumentos significativos na intensidade do sinal de ressonância magnética no córtex frontal e *nucleus accumbens*, estrutura que recebe densas projeções do córtex frontal (BERENDSE; GALIS-DE GRAAF; GROENEWEGEN, 1992), enquanto não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas ativações do córtex orbital, estriado, tálamo e hipotálamo. Esses resultados podem orientar hipóteses acerca das áreas que possam estar ativadas na estimulação por eDCS, uma vez que Takano *et al* (2011) utilizaram os mesmos parâmetros de montagem dos eletrodos, intensidade, polaridade e período de aplicação da corrente. Entretanto, a estimulação epidural, ao contrário da transcraniana, é mais focal, resultando em possíveis diferenças nas redes neuronais ativadas, o que merece uma investigação pormenorizada adequada.

A escolha da aplicação da corrente no hemisfério esquerdo baseia-se em estudos prévios que alcançaram resultados positivos na facilitação da memória operacional por meio da ETCC aplicada no hemisfério esquerdo de humanos. A ETCC aplicada no CPFDL esquerdo tem facilitado o desempenho de tarefas de memória operacional em voluntários saudáveis (ANDREWS *et al*, 2011; FREGNI *et al*, 2005), em pacientes com déficits cognitivos após acidente vascular encefálico (JO *et al*, 2009) ou com doença de Parkinson (BOGGIO *et al*, 2006). Embora sejam apontados os benefícios da ETCC aplicada no CPFDL esquerdo de humanos na memória operacional, rareiam os estudos que investigam o efeito de outras

montagens da ETCC em modelos animais, sobre a memória operacional, além do trabalho de Dockery *et al* (2011), que encontraram um efeito facilitador, porém tardio, da memória operacional em ratos previamente tratados com ETCC catódica.

Tendo em vista os poucos, mas recentes estudos utilizando modelos animais de estimulação cerebral não invasiva (eDCS, ETCC, EMT), as montagens utilizadas nesses protocolos até o momento ainda não passaram por sofisticações, como a modelagem computacional de alta resolução desenvolvida para a personalização da ETCC em humanos (BIKSON *et al*, 2012). Embora os modelos translacionais propostos até o momento tenham corroborado muitos achados em humanos, ainda não está claro como a anatomia cortical do roedor ou a polaridade e a posição dos eletrodos afetam o fluxo da corrente e a ativação neural no córtex do rato. Assim, em metanálise publicada por Brunoni, Fregni e Pagano (2011), nos modelos animais propostos, o catodo, denominado “eletrodo de referência”, tem sido geralmente posicionado em região extracefálica inespecífica. O posicionamento do catodo na região dorsal do animal neste estudo seguiu a montagem de Takano *et al* (2011) e de Custodio *et al* (2012).

#### 6.4.4 Randomizações

A fim de se evitar possíveis interferências nos resultados, provocados pela ordem da apresentação dos retardos, eles também foram semirrandomizados para cada animal, iniciando-se com retardos de 4 h ou de 10 h. As administrações de salina ou das doses de memantina também foram semirrandomizadas pelo método do quadrado latino. As referidas precauções, em conjunto com a adoção de períodos de intervalo entre as sessões atenuaram a ocorrência de efeitos residuais do tipo *carry-over*, excetuando-se um presumível efeito *carry-over* da eDCS, abordado anteriormente.

#### 6.4.5 Administrações da memantina

O momento da administração, a escolha das doses empregadas e a definição do período de intervalo entre as administrações basearam-se em estudos prévios e em dados farmacocinéticos da memantina específicos de roedores.

Doses clínicas de memantina não são extrapoláveis para roedores, em proporção, uma vez que a farmacocinética da droga entre as duas espécies é desigual (BECONI *et al*, 2012; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

As doses estabelecidas da droga, incluindo salina, foram administradas, respeitando-se um intervalo de 15 min antes das estimulações e de 30 min antes da submissão do animal às tarefas de retardo de 4 h ou de 10 h. O momento da administração da memantina partiu da informação de que o pico de concentração plasmática da droga é mais tardio em humanos ( $7,6 \text{ h} \pm 3,7$ ) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012) que em ratos, sendo de apenas 0,5 h (BECONI *et al*, 2012).

Além disso, Wise e Lichtman (2007), em uma tarefa no LR-8 de memória operacional espacial com retardo de 18 h, em ratos Sprague-Dawley, testaram diferentes doses de memantina e investigaram os efeitos da droga 20 min antes do pré-retardo, imediatamente após o pré-retardo ou 20 min antes do pós-retardo. Quando administrada 20 min antes do pré-retardo, a memantina gerou uma curva dose-resposta em U invertido, com doses baixas (0,3 e 0,56 mg/kg) reduzindo significativamente o número de erros cometidos no pós-retardo, enquanto doses elevadas (3 e 10 mg/kg) prejudicaram o desempenho no labirinto (WISE; LICHTMAN, 2007). Quando administrada imediatamente após o pré-retardo ou 20 min antes do pós-retardo, não afetou o desempenho (WISE; LICHTMAN, 2007). Além disso, a dose de 10 mg/kg de memantina provocou um bloqueio da atividade no labirinto em todos os animais testados, impossibilitando a avaliação nesta dose (WISE; LICHTMAN, 2007).

Segundo Parsons, Stöffler e Danysz, 2007, doses idênticas de memantina administradas por distintas vias de administração, como infusões e injeções IP, não são comparáveis. Por exemplo, a infusão de 20 mg/kg/d leva a níveis plasmáticos máximos que são pelo menos quatro vezes inferiores ao pico de concentração alcançado após uma única administração IP da mesma dose (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007). No caso de administrações agudas, os resultados dependem do momento da avaliação (HESSELINK *et al*, 1999), devido às maiores flutuações das concentrações plasmáticas e cerebrais. Segundo Danysz *et al* (1997), se a administração aguda é usada, a dose de 5 mg/kg IP é a máxima dose terapeuticamente relevante para uma avaliação após 30 a 60 min.

Ressalvas ainda devem ser consideradas, como a idade, cepa, sexo e estado de saúde dos animais, fatores que podem alterar a farmacocinética consideravelmente (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007). Por exemplo, é predito que ratos mais velhos e ratos fêmeas

geralmente apresentam concentrações plasmáticas mais elevadas, enquanto a maioria dos estudos pré-clínicos farmacodinâmicos da memantina tem utilizado ratos machos adultos jovens (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007). Por outro lado, a diferença de sensibilidade à memantina entre o homem e o rato é principalmente devido à farmacocinética, em vez de aspectos farmacodinâmicos (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

Era administrada apenas uma única dose por dia em cada animal, com um intervalo de três dias entre as administrações. Esse intervalo assegurava o *wash out* da droga, considerando-se que a meia-vida de eliminação da memantina em ratos e camundongos (3 a 5 h) é muito mais curta que em humanos (até 100 h), tanto nos compartimentos plasmático e cerebral (BECONI *et al*, 2012; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

Os resultados obtidos por Wise e Lichtman (2007) sobre os efeitos da memantina no LR-8, aliados aos dados farmacocinéticos da memantina em ratos (BECONI *et al*, 2012; DANYSZ *et al*, 1997; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007), orientaram as definições sobre o momento das administrações, as doses adotadas e o emprego do intervalo de *wash out* de três dias entre as administrações.

Por fim, Rammes, Danysz e Parsons (2008) publicaram uma extensa revisão dos estudos pré-clínicos da memantina, com foco em modelos animais de doenças neurológicas e neuropsiquiátricas. Todos os estudos encontrados não revelaram quaisquer sinais de potenciais efeitos colaterais, de interações medicamentosas ou de alterações tóxicas atribuíveis à memantina ou a produtos de biotransformação, em doses terapeuticamente relevantes para o tratamento da doença de Alzheimer (RAMMES; DANYSZ; PARSONS, 2008). As doses de memantina utilizadas nesse estudo não produziram efeitos adversos identificáveis nos animais *Sham* e eDCS.

## **6.5 Efeitos cognitivos da memantina**

Estudos anteriores não alcançaram um consenso quanto aos efeitos da memantina sobre a aprendizagem e memória. Isso pode ser atribuído ao perfil dose-resposta não linear da memantina, a alguns equívocos em extrapolações farmacocinéticas, elencados por Parsons, Stöffler e Danysz (2007) e, por fim, aos distintos desenhos experimentais que variam a frequência das administrações da memantina e a demanda cognitiva das tarefas. Esses fatores,

em conjunto, adicionam complexidade na interpretação dos resultados e na comparação entre estudos diversos. Por outro lado, admitem-se os resultados benéficos da memantina sobre a memória, sendo por vezes considerada “um potenciador cognitivo” (*cognitive enhancer*) por alguns autores (ROESLER; SCHRÖDER, 2011; WALLACE *et al*, 2011).

A ação terapêutica da memantina em doenças que envolvem manifestações de excitotoxicidade, como na doença de Alzheimer, deve-se, em parte, ao controle da hiperativação de NMDARs e do influxo excessivo de  $Ca^{2+}$  (LIPTON, 2006; ROESLER; SCHRÖDER, 2011). Esse influxo excessivo, por sua vez, leva à despolarização da membrana mitocondrial, ativação de lipases e proteases intracelulares, culminando em apoptose e estresse oxidativo (LIPTON, 2006). A memantina pode exibir efeitos neuroprotetores e antioxidantes, o que resulta em efeitos benéficos sobre a função cognitiva. Além disso, a memantina pode resgatar os déficits de memória associados ao envelhecimento, possivelmente reduzindo o estresse oxidativo cerebral (PIETÁ DIAS *et al*, 2007).

Propõe-se que o aprimoramento da função cognitiva pela memantina esteja relacionado com as suas ações neuroprotetoras em tratamentos crônicos, em vez de uma influência sobre os mecanismos subjacentes ao processamento da memória *per se* (BUTTERFIELD; POCERNICH, 2003; LIPTON, 2006). No entanto, alguns estudos têm mostrado que a administração aguda de memantina pode resgatar déficits de memória em modelos experimentais de amnésia (YUEDE; DONG; CSERNANSKY, 2007). Adicionalmente, foi evidenciado que a administração aguda, mas não crônica de memantina, aumentou os níveis proteicos do BDNF, o que sugere um mecanismo adaptativo (RÉUS *et al*, 2010).

Com o intuito de investigar os efeitos antidepressivos da memantina, Quan *et al* (2011), testaram a memantina a 20 mg/kg IP, por 21 dias, em um modelo animal de estresse crônico imprevisível. Nos ratos estressados, a memantina levou a benefícios no consumo de sacarose, na aprendizagem reversa e na plasticidade sináptica cortical pré-frontal, mas prejudicou a aprendizagem espacial, em comparação aos ratos estressados sem a droga (QUAN *et al*, 2011). Os autores concluíram que a memantina apresentou ação antidepressiva no modelo utilizado, provavelmente via *up-regulation* da subunidade NR2B no CPF, e que as doses utilizadas de memantina foram tão elevadas, a ponto de provocar déficit na memória espacial (QUAN *et al*, 2011).

A memantina tem aprimorado o desempenho de roedores em tarefas de demanda de memória espacial, em uma relação dose-resposta não linear (BARNES; DANYSZ; PARSONS, 1996;

PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007). Embora alguns estudos tenham mostrado que tanto doses baixas (ZOLADZ *et al*, 2006) quanto doses elevadas (LUKOYANOV; PAULA-BARBOSA, 2001) de memantina resultaram em melhora da cognição espacial, alguns estudos relataram que altas doses de memantina produziram déficit cognitivo (CREELEY *et al*, 2006; QUAN *et al*, 2011).

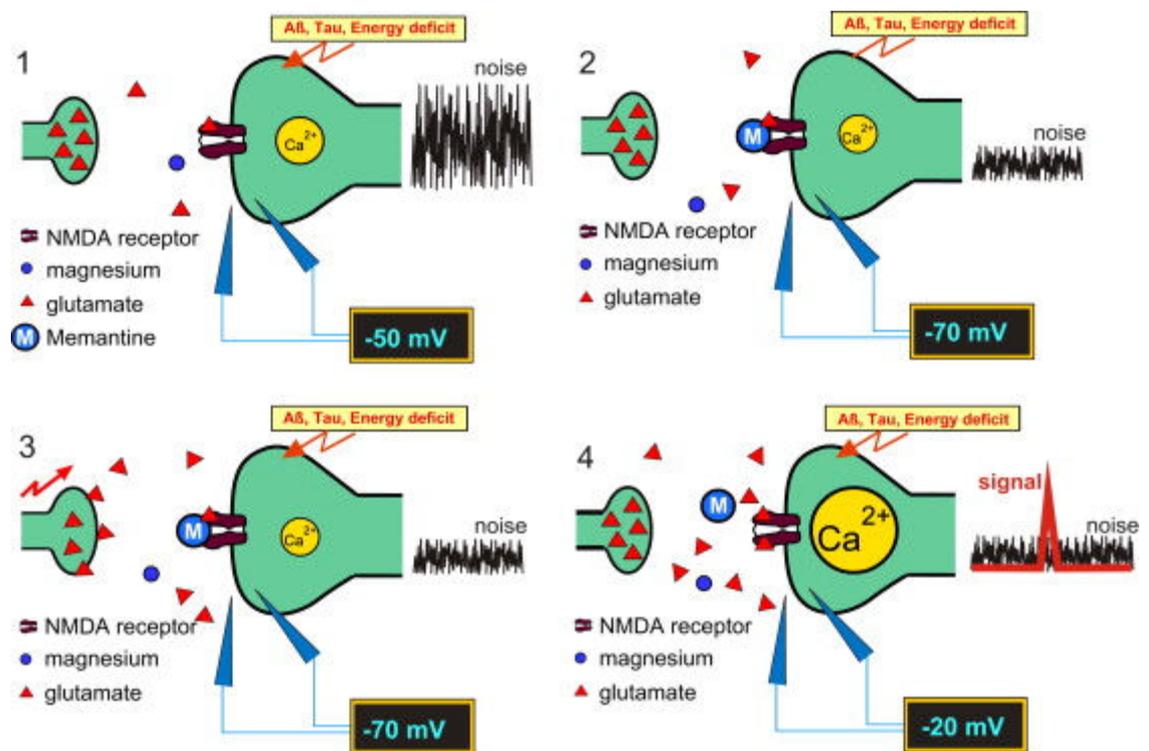
De fato, a memantina é tipicamente reconhecida por produzir curvas dose-resposta em U invertido, perfil não linear que se insere nos fenômenos designados de hormese (CALABRESE, 2008). Admite-se que a hormese seja uma compensação excessiva a uma ruptura na homeostase e aparece em investigações toxicológicas e farmacológicas, inclusive em aprendizagem e memória (CALABRESE, 2008). O perfil dose-resposta em U invertido do subgrupo *Sham* de melhor desempenho corrobora os achados de Wise e Lichtman (2007), em que a memantina também gerou o mesmo perfil de curva, quando administrada 20 min antes do pré-retardo no LR-8. Além disso, são reconhecidas curvas dose-resposta horméticas para a maioria dos medicamentos aprovados para tratamento de doença de Alzheimer (CALABRESE, 2008).

Em clássica revisão de Parsons, Stöffler e Danysz (2007), foram levantadas hipóteses explicativas para a capacidade da memantina, em contraste com alguns outros antagonistas NMDAR, em poder proporcionar tanto a melhoria sintomática clinicamente comprovada na doença de Alzheimer, quanto o potencial para a atividade neuroprotetora, com poucos efeitos colaterais. Os autores concluíram que apenas a hipótese do sinal-ruído – a que considera tanto a voltagem-dependência e a rápida cinética de desbloqueio na presença contínua de memantina – poderia explicar adequadamente tanto os efeitos sintomatológicos e cognitivos da memantina, vistos poucas semanas após o tratamento em ensaios clínicos, quanto os previstos efeitos neuroprotetores a longo prazo deste composto (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

Segundo a hipótese do sinal-ruído (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007), em condições de repouso, o  $Mg^{2+}$  ou a memantina podem ocupar o NMDAR (Figura 33). Da mesma forma, ambos são capazes de liberar o canal NMDAR sob forte despolarização sináptica, devido à sua pronunciada voltagem-dependência e a uma rápida cinética de desbloqueio. No entanto, a memantina, em contraste com o  $Mg^{2+}$ , não deixa o canal tão facilmente sobre despolarização moderadamente prolongada, durante insultos excitotóxicos crônicos (PARSONS *et al*, 1993). Esta propriedade da memantina pode efetivamente prover tanto a neuroproteção e a melhora

sintomática pelo mesmo mecanismo de ação, ou seja, bloqueio do canal NMDAR com afinidade moderada a rápida e voltagem-dependência (Figura 33).

Parsons, Stöffler e Danysz (2007) propuseram que as propriedades biofísicas da memantina permitiriam que este composto diferenciase claramente entre a ativação patológica crônica de baixo nível do NMDAR na doença de Alzheimer (“ruído”) e a ativação sináptica fisiológica do NMDAR (“sinal”) (DANYSZ; PARSONS, 2003). Em suma, a memantina, em concentrações terapeuticamente relevantes, é capaz de suprimir o “ruído” de fundo patológico, mas preserva ou mesmo aumenta a plasticidade sináptica fisiológica desejável, mediada pelo NMDAR (“sinal”).



**Figura 33** – Processo esquemático simplificado que explica o mecanismo de ação da memantina na doença de Alzheimer, baseada na hipótese do sinal-ruído, segundo Parsons, Stöffler e Danysz (2007). A memantina é capaz de servir como um filtro de bloqueio do “ruído sináptico” (seções 2 e 3) e assim permite a detecção do sinal relevante (seção 4), traduzindo-se em restauração da plasticidade sináptica. Níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  são representados por diferentes tamanhos dos círculos amarelos. Potenciômetros ilustram o potencial de membrana pós-sináptico: -70 mV, repouso; -50 mV, estado patológico prolongado leve; -20 mV, forte ativação sináptica transitória. A seta vermelha indica a chegada de um sinal pré-sináptico.  $Mg^{2+}$  e glutamato são ilustrados por círculos azuis e triângulos vermelhos, respectivamente. Extraído de Parsons, Stöffler e Danysz (2007), sob permissão.

Em condições normais, a plasticidade sináptica (aprendizado e memória) também depende da detecção de um sinal relevante (proeminente) sobre a atividade de fundo (ruído), ou seja, diante de uma suficiente razão sinal-ruído. A hipótese do sinal-ruído poderia, de forma similar, explicar os perfis dose-resposta obtidos na memória operacional espacial dos animais, em função da linha de base comportamental (melhor ou pior desempenho).

A memantina apresentou uma tendência a facilitar o desempenho dos animais com pior linha de base comportamental na memória operacional espacial, como visto no perfil dose-resposta do subgrupo *Sham* de pior desempenho. Pode-se dizer que nesse caso ela facilitou a relação sinal-ruído, embora de forma não estatisticamente significante.

Surpreendentemente, nos animais com melhor linha de base comportamental, a eDCS atenuou os prejuízos provocados pela memantina, enquanto atuou em sinergismo com a memantina na facilitação da memória operacional espacial, nos animais com linha de base de desempenho pior. Esses resultados sugerem que a eDCS, associada com a memantina, aumentou significativamente a relação sinal-ruído, especialmente nos animais com linha de base de desempenho pior.

Os prejuízos da memória operacional espacial provocados pela memantina nos subgrupos de melhor desempenho poderiam ser explicados pelo fato de que, neste caso, a memantina foi utilizada em animais com desempenho ótimo, prejudicando a homeostase do sistema glutamatérgico, como mecanisticamente hipotetizado por Parsons, Stöffler e Danysz (2007). Novamente, a eDCS foi capaz de atenuar esses prejuízos provocados pela memantina, aumentando a relação sinal-ruído.

Efeitos distintos poderiam ser esperados com a associação da eDCS com outros antagonistas NMDAR, como o MK-801 e o dextrometorfano, uma vez que especificidades farmacodinâmicas desses agentes, em comparação com a memantina, poderiam afetar substancialmente seus efeitos sobre a memória operacional espacial (BANE *et al*, 1996; DEMATTEIS; LALLEMENT; MALLARET, 1998; STAAY *et al*, 2011).

Por exemplo, Liebetanz *et al* (2002) observaram uma supressão dos efeitos da ETCC catódica e anódica, aplicada no córtex motor humano, com a utilização do dextrometorfano. À parte das demais diferenças metodológicas em comparação com o presente estudo, o dextrometorfano é um antagonista não competitivo NMDAR de baixa afinidade, utilizado como antitussígeno, e seu principal metabólito, dextrorfano, também é ativo. O dextrorfano

tem ação antagonista NMDAR ainda mais potente que o dextrometorfano, pois pode ligar-se ao canal NMDAR fechado (DEMATTEIS; LALLEMENT; MALLARET, 1998; NETZER *et al*, 1993), ao contrário da memantina, que não possui metabólitos ativos e é um antagonista NMDAR essencialmente de canal aberto.

Adicionalmente, o dextrometorfano pode provocar sedação em ratos, ao passo que o seu metabólito ativo pode provocar reações psicomiméticas dose-dependentes (DEMATTEIS; LALLEMENT; MALLARET, 1998), efeitos adversos que não ocorrem comumente com a memantina, tornando o dextrometorfano menos adequado para a investigação da função comportamental no presente estudo (BANE *et al*, 1996; RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003).

Nitsche *et al* (2004a) testaram os efeitos da D-cicloserina, um agonista parcial NMDAR, nas mudanças da excitabilidade cortical motora induzidas pela ETCC. A D-cicloserina prolongou (mas não elevou) o aumento da excitabilidade induzida pela ETCC anódica, enquanto não afetou significativamente a ETCC catódica. Os autores propuseram que a D-cicloserina atuou em sinergismo com a ETCC, aumentando a eficácia da ETCC anódica (NITSCHKE *et al*, 2004a).

Os resultados observados de sinergismo da D-cicloserina com a ETCC anódica e da memantina com a eDCS parecem, entretanto, envolver mecanismos distintos relativos à atividade do NMDAR. Enquanto a D-cicloserina parece aumentar primariamente a ativação fásica do receptor e as suas consequências, isto é, a LTP, a memantina parece atuar na ativação tônica do receptor. A memantina, portanto, poderia aprimorar as funções cognitivas pelo aumento da relação sinal-ruído sináptico relacionado ao aprendizado e, ainda, por reduzir os efeitos excitotóxicos desencadeados por hiperativação glutamatérgica (DANYSZ; PARSONS, 2003).

## **6.6 Neuromodulação cognitiva da estimulação cerebral não invasiva**

Originalmente desenvolvida para tratar distúrbios neuropsiquiátricos, tais como a doença de Parkinson, depressão, demência, AVC e dor crônica, a estimulação cerebral não invasiva tem conquistado outros domínios como a Neuroergonomia (PARASURMAN; RIZZO, 2008) e a

pesquisa bélica (MCKINLEY *et al*, 2012), a fim de transcender as limitações atuais da cognição humana.

Por outro lado, a disfunção cognitiva é um sintoma central de muitas doenças neuropsiquiátricas e o grau de comprometimento relativo às funções cognitivas é um fator crítico que tem grande impacto sobre a qualidade de vida. A combinação da ETCC com outras intervenções terapêuticas pode ser alcançada com relativa facilidade e uma série de estudos tem buscado essa abordagem (JO *et al*, 2009; PLOW *et al*, 2011).

A EMT e a ETCC têm fornecido uma coleção de evidências no aprimoramento da cognição, em habilidades que incluem a nomeação de figuras (MOTTAGHY *et al*, 2006), a memória fonológica (KIRSCHEN *et al*, 2006), a memória operacional (FREGNI *et al*, 2005), a fluência verbal (WASSERMANN; GRAFMAN, 2005), a detecção de ameaças (CLARK *et al*, 2010), a aprendizagem probabilística (KINCES *et al*, 2004) e o raciocínio analógico (BOROOJERDI *et al*, 2001).

A ETCC anódica aplicada no CPFDL esquerdo parece produzir efeitos sobre o processo de tomada de decisão, um componente das funções executivas. Fecteau *et al* (2007) concluíram que a estimulação anódica, tanto do CPFDL direito ou do esquerdo, com o catodo localizado sobre uma área do hemisfério contralateral, levou pacientes a fazer escolhas mais cautelosas sobre a tarefa de risco do balão analógico (BART).

A ETCC no CPFDL esquerdo também tem levado a aprimoramentos na memória e no aprendizado. Fregni *et al* (2005) observaram um aumento na acuidade da resposta de uma tarefa com demanda de memória operacional, em estudantes universitários, quando a ETCC anódica foi aplicada no CPFDL esquerdo. Ainda, o efeito da ETCC era relativamente focal e dependente da polaridade da estimulação, pois uma estimulação catódica sobre a mesma área ou uma estimulação de polaridade anódica sobre o córtex motor não apresentava tal efeito. Fertoni *et al* (2010) mostraram que a mesma montagem da ETCC anódica facilitou o desempenho em uma tarefa de nomeação de figuras. Igualmente, a estimulação catódica da mesma região cerebral não produziu quaisquer efeitos. Kinces *et al* (2004) observaram que a ETCC aplicada no CPFDL esquerdo aprimorou significativamente o desempenho em uma tarefa de aprendizagem implícita probabilística.

Em um estudo de imagem funcional (KEESER *et al*, 2011), foi observado que a ETCC, aplicada por 20 min, a 2 mA, com o anodo sobre o CPFDL esquerdo e o catodo sobre a região

supraorbital direita, foi capaz de alterar a conectividade funcional da região pré-frontal. A região subgenual do CPF, o córtex cingulado anterior e o giro frontal medial foram significativamente ativados (KEESER *et al*, 2011).

Os resultados obtidos de facilitação da memória operacional espacial da eDCS anódica aplicada no CPFm esquerdo de ratos corroboram os efeitos pró-cognitivos observados da ETCC anódica no CPFDL esquerdo nos estudos clínicos citados, o que sugere que o modelo de eDCS adotado pode satisfazer a validade de face, formalmente definida como respostas do modelo assemelhando-se aos comportamentos e sintomas do paciente (WILLNER, 1984).

Por outro lado, há relatos de prejuízos da memória operacional em outros protocolos de neuromodulação cognitiva. Marshall *et al* (2005) observaram uma redução no tempo de reação quando a ETCC era aplicada bilateralmente em sítios frontocorticais e intermitentemente (15 s *on* / *off*) por 15 min, enquanto os voluntários desempenhavam uma tarefa de memória operacional. Os autores especularam que esses efeitos eram devidos a interferências provocadas na dinâmica temporal do processamento cortical (MARSHALL *et al*, 2005). Berryhill *et al* (2010) observaram um efeito negativo na memória operacional após a aplicação da ETCC catódica no córtex parietal posterior direito.

Em uma revisão recente, Demirtas-Tatlidede, Vahabzadeh-Hagh e Pascual-Leone (2013) reuniram trabalhos com abordagem dos efeitos cognitivos da estimulação cerebral não invasiva em vários distúrbios neuropsiquiátricos. Apenas um estudo foi identificado que objetivou explorar os efeitos em longo prazo da ETCC em pacientes com doença de Alzheimer. Neste estudo *cross-over*, os pacientes receberam cinco sessões diárias de ETCC anódica, bilateralmente sobre o córtex temporal, por 30 min (BOGGIO *et al*, 2012). Os autores relataram uma melhoria na memória de reconhecimento visual, que persistiu durante quatro semanas.

Cotelli *et al* (2011) aplicaram vinte sessões de 20 Hz de EMTr sobre o CPFDL esquerdo em pacientes com doença de Alzheimer moderada e relataram um efeito significativo na compreensão auditiva. Ahmed *et al* (2012) observaram uma melhoria significativa no funcionamento cognitivo de pacientes com doença de Alzheimer, após cinco sessões consecutivas de estimulação bilateral de EMTr de alta frequência, aplicada bilateralmente no CPFDL, e este efeito foi mantido durante três meses.

A doença de Alzheimer caracteriza-se por uma progressiva plasticidade sináptica disfuncional (MESULAM, 2000), que conduz a um estado hipoplástico anormal (PASCUAL-LEONE *et al*, 2011). As abordagens terapêuticas atuais oferecem um benefício ainda insuficiente nos sintomas cognitivos e comportamentais e há um esforço global dedicado à investigação de novas estratégias que possam retardar a progressão da doença.

A significativa facilitação da memória operacional espacial, nos animais com linha de base de pior desempenho, após a eDCS anódica no CPFm esquerdo, em sinergismo com a memantina, um fármaco de utilidade comprovada na doença de Alzheimer e em outras demências, suscitam questões que devem ser analisadas em caráter translacional.

O elemento disfuncional da plasticidade sináptica na doença de Alzheimer (MESULAM, 2000) torna a estimulação cerebral não invasiva particularmente relevante, pois a EMTr, a ETCC e possivelmente a eDCS, permitem a facilitação da plasticidade neuronal por indução de efeitos relativamente duradouros. Os poucos estudos conduzidos até o momento revelam as primeiras evidências do potencial da estimulação cerebral não invasiva para a melhoria cognitiva na demência de Alzheimer. No entanto, esses estudos não foram replicados e as evidências permanecem preliminares. Por outro lado, uma prova convergente é mostrada no presente estudo e poderá contribuir na orientação de futuras investigações translacionais.

Adicionalmente, sistemas de neurotrofinas, especialmente o BDNF, são expressos em regiões que apresentam um elevado grau de plasticidade (isto é, o córtex e o hipocampo) e são tidos como reguladores chave nos processos de LTP e de memória de longo prazo (COWANSAGE; LEDOUX; MONFILS, 2010). Não é surpreendente que a densidade de células imunorreativas ao BDNF está significativamente reduzida em até 20 % em pacientes com doença de Alzheimer (LORKE *et al*, 2010) e o processamento da  $\beta$ -amilóide está envolvido na via do BDNF (FORERO *et al*, 2006).

Marvanova *et al* (2001) mostraram que doses clinicamente relevantes de memantina levaram a aumentos significativos dos níveis de RNAm de BDNF e também da expressão do seu receptor, TrkB, no córtex límbico. Paralelamente, a estimulação por corrente direta induz a liberação de BDNF e a ativação de TrkB (FRITSCH *et al*, 2010).

Os dados apresentados, em conjunto com o resultado convergente do presente estudo, sugerem que o BDNF possa ser um fator chave na resposta da excitabilidade cortical na

ETCC, em pacientes com doença de Alzheimer e que pode ser sinergicamente ampliado com a memantina.

Os dados disponíveis são promissores, mas ainda não são conclusivos e as hipóteses apresentadas merecem ser testadas e replicadas, a fim de se alcançar eficácia na estimulação cerebral não invasiva no tratamento do declínio cognitivo como uma estratégia de reabilitação.

### **6.7 Limitações do estudo**

O estudo foi altamente controlado, de modo que foram ponderadas questões relativas à habituação dos animais, envolvendo salas apropriadas para os experimentos, procedimentos de contenção na Fase V previamente ao início das estimulações e treinamento dos experimentadores. Esses fatores permitiram a atenuação de interferentes externos ao protocolo (ARNSTEN, 2009; FLORESCO; GHODS-SHARIFI, 2007; OLTON, 1987) e teoriza-se que, possivelmente por esses fatores, mesmo animais *Sham*, sob teste em retardos prolongados, cometessem poucos erros, como visto no pós-retardo de 4 h do grupo *Sham*, sob a dose de salina. A posterior subdivisão dos animais em subgrupos foi útil para que fossem evidenciadas as particularidades dos efeitos da eDCS em animais com linhas de base comportamentais heterogêneas. Todavia, tem-se como limitação a impossibilidade da constituição de subgrupos no retardo de 10 h, uma vez que não houve suficiente número de animais que preenchessem o critério de “melhor desempenho”, devido ao maior grau de dificuldade do teste.

Como explanado anteriormente, não se pode descartar um efeito *carry-over* tardio da eDCS, de possíveis modificações no efeito das sessões de estimulação subsequentes. Evidentemente, essa é uma hipótese que demanda comprovação e, ainda, não se espera que esses prováveis efeitos possam ter afetado o perfil das curvas dose-resposta obtidas, devido à semirrandomização adotada.

Nesse estudo, não foi efetuado o bloqueio completo dos NMDARs. Isso é fundamentado pela memantina possuir afinidade baixa a moderada para os NMDARs, cinética mais rápida de bloqueio e desbloqueio de canal aberto e fechamento do canal do tipo “sequestro parcial”, em comparação à cetamina e ao MK-801 (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

Antagonistas não competitivos, por outro lado, têm um menor índice terapêutico e provocam graves déficits sensório-motores. Essas características os tornam menos adequados para a investigação de funções comportamentais relacionadas aos NMDARs. A modulação alostérica pela memantina oferece uma abordagem mais assertiva, em comparação ao agonismo ortostérico e ao antagonismo, pois preserva a natureza espacial e temporal da neurotransmissão, com menor tendência à dessensitização ou à tolerância (NATHAN *et al*, 2011). Secundariamente, a memantina permite determinar um nível de saturação da resposta, que potencialmente reduz a propensão ao surgimento de efeitos colaterais (MAY *et al*, 2007).

Indubitavelmente, a modulação do sistema glutamatérgico na estimulação cerebral por corrente contínua precisa ser mais amplamente investigada, especialmente no domínio dos AMPARs. É reconhecido que os AMPARs no CPF participam dos mecanismos de memória operacional espacial em ratos (ROMANIDES; DUFFY; KALIVAS, 1999) e, ao mesmo tempo, estão fundamentalmente envolvidos nos fenômenos de plasticidade sináptica (DERKACH *et al*, 2007). Essa plasticidade está associada ao tráfico de membrana e à fosforilação de AMPARs sinápticos, que são alvos de múltiplas vias de sinalização que regulam a força das sinapses excitatórias glutamatérgicas (DERKACH *et al*, 2007).

## **6.8 Perspectivas futuras**

Esse é o primeiro estudo que avaliou os efeitos de um antagonista glutamatérgico em um modelo animal de neuromodulação cognitiva, com implicações na memória operacional espacial. O sugestivo sinergismo do efeito pró-cognitivo observado entre a eDCS aplicada no CPFm esquerdo e a memantina suscita questões que devem ser analisadas em caráter translacional, na medida em que a estimulação cerebral não invasiva e a memantina, isoladamente, têm mostrado efeitos benéficos contra o declínio cognitivo no homem. Ademais, o potencial sinergismo observado nesse estudo poderá futuramente ser investigado em estudos clínicos controlados e, fundamentalmente, essa prova de conceito poderá ser fomentada em modelos animais de doença de Alzheimer, tornando exequível explorar amplos aspectos, sejam comportamentais, eletrofisiológicos, moleculares e histopatológicos, não prontamente acessíveis pela prática clínica.

Paralelamente aos avanços, surgem novos desafios. Ao traduzir as conclusões das investigações translacionais para a prática clínica, deve-se considerar, entretanto, as

diversidades de resposta entre estudos em animais e em humanos. Interações não lineares complexas e as variabilidades interindivíduos dificultam a previsão de tratamentos na dosagem e na direção da plasticidade induzida pela neuromodulação, assim exigindo maior pesquisa empírica.

Uma série de questões precisam ser melhor investigadas e replicadas em abordagens translacionais. A validação de modelos animais cada vez mais aperfeiçoados se faz necessária, para que se possam elucidar aspectos como o grau de persistência do efeito sobre a memória, o efeito da exposição prolongada e/ou repetida da estimulação cerebral não invasiva, a aplicabilidade da técnica combinada com o tratamento farmacológico convencional, assim como possíveis efeitos dose-resposta de adaptação ou de habituação aos efeitos pró-cognitivos da estimulação.

Notavelmente, modelos animais de neuromodulação tornaram-se imprescindíveis para aprimorar as técnicas de estimulação cerebral não invasiva, otimizar suas aplicações científicas e clínicas, testar tecnologias emergentes e garantir a sua segurança. Futuramente, instrumentos inovadores poderão ser capazes de identificar subgrupos de pacientes biologicamente distintos, o que permitirá personalizar e aumentar a eficácia das terapias neuromoduladoras de estimulação cerebral, em combinação com a intervenção farmacológica.

## *7 Conclusões*

- A eDCS no CPFm esquerdo facilitou o desempenho da memória operacional espacial, especialmente em animais com pior linha de base comportamental.
- A eDCS sobre o CPFm esquerdo não modificou o desempenho da memória operacional espacial em animais com desempenho basal ótimo.
- A facilitação da memória operacional espacial pela eDCS tem propriedade de longa duração, uma vez que a melhora do desempenho foi observada 4 h ou 10 h após sua administração.
- A memantina prejudicou, em perfil dose-resposta de U invertido, o desempenho da memória operacional espacial de animais com melhor linha de base comportamental, enquanto tendeu a facilitar o desempenho de animais com pior linha de base comportamental, em perfil de U.
- Em animais de melhor linha de base comportamental, a eDCS sobre o CPFm esquerdo atenuou o efeito de prejuízo da memória operacional espacial produzido pela memantina. Por outro lado, em animais de pior linha de base comportamental, a eDCS promoveu um possível sinergismo em associação com a memantina.
- Essas interações sugerem, em parte, que a eDCS envolveria a mediação glutamatérgica pelos NMDARs em seus efeitos. Entretanto, não parece ser dependente apenas desse mecanismo e é sugerido um sinergismo entre a eDCS e a memantina.
- O potencial sinergismo entre a eDCS aplicada sobre o CPFm esquerdo e a memantina poderá futuramente ser investigado em modelos animais que possibilitem estudar as desordens cognitivas observadas nas doenças neuropsiquiátricas.

*8 Referências*

ABRAHAM, W. C. Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 387, 2008.

ABRAHAM, W. C.; BEAR, M. F. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences**. v.19, n. 3, p. 126–30, 1996.

AGNEW, W. F.; MCCREERY, D. B. Considerations for safety in the use of extracranial stimulation for motor evoked potentials. **Neurosurgery**, v. 20, n. 1, p. 143–7, 1987.

AHMED, M. A.; et al. Effects of low versus high frequencies of repetitive transcranial magnetic stimulation on cognitive function and cortical excitability in Alzheimer's dementia. **Journal of Neurology**, v. 259, n. 1, p. 83-92, 2012.

ALBERINI, C. M. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 234–46, 2008.

ALEXANDER, W. H.; BROWN, J. W. Medial prefrontal cortex as an action-outcome predictor. **Nature Neuroscience**. v. 14, n. 10, p. 1338–44, 2011.

ALLEN, G. V.; et al. Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 311, n. 1, p. 1–16, 1991.

ANDERSON, P.; LOMO, T. Mode of activation of hippocampal pyramidal cells by excitatory synapses on dendrites. **Experimental Brain Research**, v. 2, n. 3, p. 247-60, 1966.

ANDREWS, S. C. et al. Improving working memory: the effect of combining cognitive activity and anodal transcranial direct current stimulation to the left dorsolateral prefrontal cortex. **Brain stimulation**, v. 4, n. 2, p. 84–9, 2011.

ANTAL, A. et al. Direct current stimulation over V5 enhances visuomotor coordination by improving motion perception in humans. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 521-7, 2004.

ARNSTEN, A. F. T. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 410–22, 2009.

ARONIADOU, V. A.; KELLER, A. Mechanisms of LTP induction in rat motor cortex in vitro. **Cerebral Cortex**, v. 5, n. 4, p. 353-62, 1995.

ATKINSON, R. C.; SHIFFRIN, R. M. Human memory: a proposed system and its control processes. In: SPENCE, K. W.; SPENCE, J. T. (Eds.) **The Psychology of Learning and Motivation**. vol. 2. New York: Academic Press, 1968. p. 89-195.

BADDELEY, A. D. Is Working Memory Still Working? **The American Psychologist**, v. 56, n. 11, p. 851-64, 2001.

BADDELEY, A. D. The episodic buffer: a new component of working memory? **Trends in cognitive sciences**, v. 4, n. 11, p. 417–423, 2000.

BADDELEY, A. D. Working memory: looking back and looking forward. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 10, p. 829-39, 2003.

BADDELEY, A. D. Working memory: theories, models, and controversies. **Annual review of psychology**, v. 63, p. 1–29, 2012.

BADDELEY, A. D.; HITCH, G. J. **Working memory**. New York: Academic Press, 1974. p. 47-89.

BADRE, D. Cognitive control, hierarchy, and the rostro-caudal organization of the frontal lobes. **Trends in cognitive sciences**, v. 12, n. 5, p. 193–200, 2008.

BANE, A. et al. Adverse effects of dextromethorphan on the spatial learning of rats in the Morris water maze. **European journal of pharmacology**, v. 302, n. 1-3, p. 7–12, 1996.

BARBAS, H.; HENION, T. H.; DERMON, C. R. Diverse thalamic projections to the prefrontal cortex in the rhesus monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 313, n. 1, p. 65–94, 1991.

BARBAS, H.; PANDYA, D. N. Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus-monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 286, n. 3, p. 353-75, 1989.

BARBEY, A. K.; KRUEGER, F.; GRAFMAN, J. An evolutionarily adaptive neural architecture for social reasoning. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 12, p. 603–610, 2009.

BARCHAS, J. D. et al. Behavioral neurochemistry: neuroregulators and behavioral states. **Science**, v. 200, n. 4344, p. 964-73, 1978.

BARNARD, P. Interacting cognitive subsystems: Modeling working memory phenomena within a multiprocessor architecture. In: MIYAKE, A.; SHAH, P. (Eds.). **Models of working memory: Mechanisms of active maintenance and executive control**. New York: Cambridge University Press, 1999. p. 298-339.

BARNES, C. A.; DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. **The European Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 565-71, 1996.

BASHIR, Z. I.; et al. Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus. **Nature**, v. 349, n. 6305, p. 156–8, 1991.

BAXTER, M. G.; et al. D-cycloserine, a novel cognitive enhancer, improves spatial memory in aged rats. **Neurobiology of Aging**, v. 15, n. 2, p. 207–13, 1994.

BEATTIE, E. C.; et al. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1291–1300, 2000.

BECONI, M. G.; et al. Pharmacokinetics of memantine in rats and mice. **PLoS currents**, p. 1–27, 2012.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261–77, 2007.

BEN TAIB, N. O.; MANTO, M. Trains of transcranial direct current stimulation antagonize motor cortex hypoexcitability induced by acute hemicerebellectomy. **Journal of Neurosurgery**, v. 111, n. 4, p. 796 – 806, 2009.

- BERENDSE, H. W.; GALIS-DE GRAAF, Y.; GROENEWEGEN, H. J. Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 316, n. 3, p. 314–347, 1992.
- BERRYHILL, M. E.; et al. A selective working memory impairment after transcranial direct current stimulation to the right parietal lobe. **Neuroscience letters**, v. 479, n. 3, p. 312–6, 2010.
- BIANCHI, L. **The Mechanism of the Brain and the Function of the Frontal Lobes**. Edinburgh: Livingstone, 1922.
- BIKSON, M.; et al. High-resolution modeling assisted design of customized and individualized transcranial direct current stimulation protocols. **Neuromodulation: journal of the International Neuromodulation Society**, v. 15, n. 4, p. 306–15, 2012.
- BINDMAN, L. J.; LIPPOLD, O. C.; REDFEARN, J. W. Long-lasting changes in the level of the electrical activity of the cerebral cortex produced by polarizing currents. **Nature**, v. 196, p. 584–5, 1962.
- BINDMAN, L. J.; LIPPOLD, O. C.; REDFEARN, J. W. The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. **The Journal of Physiology**, v. 172, p. 369-82, 1964.
- BLACKSTONE, C. D.; et al. Biochemical characterisation and localization of a non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, n. 3, p. 1118-36, 1992.
- BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–9, 1993.
- BLISS, T. V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, n. 2, p. 331-56, 1973.
- BOGGIO, P. S.; et al. Effects of transcranial direct current stimulation on working memory in patients with Parkinson's disease. **Journal of the neurological sciences**, v. 249, n. 1, p. 31–8, 2006.
- BOGGIO, P. S.; et al. Prefrontal cortex modulation using transcranial DC stimulation reduces alcohol craving: a double-blind, sham-controlled study. **Drug and alcohol dependence**, v. 92, n. 1-3, p. 55–60, 2008.
- BOGGIO, P. S.; et al. Prolonged visual memory enhancement after direct current stimulation in Alzheimer's disease. **Brain stimulation**, v. 5, n. 3, p. 223–30, 2012.
- BOGGIO, P. S.; et al. Temporal lobe cortical electrical stimulation during the encoding and retrieval phase reduces false memories. **PLoS One**, v. 4, n. 3, 2009.
- BONTEMPI, B.; et al. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. **Nature**, v. 400, n. 6745, p. 671–5, 1999.
- BOROOJERDI, B., et al. Enhancing analogic reasoning with rTMS over the left prefrontal cortex. **Neurology**, v. 56, n. 4, p. 526–8, 2001.

- BOTVINICK, M. M.; COHEN, J. D.; CARTER, C. S. Conflict monitoring and anterior cingulate cortex: an update. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 8, n. 12, p. 539–46, 2004.
- BROWN, J. A.; et al. Motor cortex stimulation for the enhancement of recovery from stroke: a prospective, multicenter safety study. **Neurosurgery**, v. 58, n. 3, p. 464–73, 2006.
- BRUNONI, A. R.; et al. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. **Brain stimulation**, v. 5, n. 3, p. 175–95, 2012.
- BRUNONI, A. R.; et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) in unipolar vs. bipolar depressive disorder. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 96–101, 2011.
- BRUNONI, A. R.; FREGNI, F.; PAGANO, R. L. Translational research in transcranial direct current stimulation (tDCS): a systematic review of studies in animals. **Reviews in the neurosciences**, v. 22, n. 4, p. 471–81, 2011.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12 ed. New York: McGraw-Hill, 2012.
- BURWELL, R. D.; AMARAL, D. G. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 398, n. 2, p. 179–205, 1998.
- BUTTERFIELD, D. A.; POCERNICH, C. B. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. **CNS Drugs**, v. 17, n. 9, p. 641–52, 2003.
- CALABRESE, E. J. Hormesis and medicine. **British journal of clinical pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 594–617, 2008.
- CAMBIAGHI, M.; et al. Brain transcranial direct current stimulation modulates motor excitability in mice. **The European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 704-9, 2010.
- CAMPBELL, C. B. G.; HODOS, W. The concept of homology and the evolution of the nervous system. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 3, n. 5, p. 353–67, 1970.
- CANAVERO, S.; BONICALZI, V. Therapeutic extradural cortical stimulation for central and neuropathic pain: A review. **The Clinical Journal of Pain**, v. 18, n. 1, p. 48 –55, 2002.
- CARAMANOS, Z.; SHAPIRO, M. L. Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. **Behavioral neuroscience**, v. 108, n. 1, p. 30–43, 1994.
- CAREW, T. J. Molecular enhancement of memory formation. **Neuron**, v. 16, n. 1, p. 5–8, 1996.
- CARNEY, M. W. P. Negative polarisation of the brain in the treatment of manic states. *Irish Journal of Medical Sciences*, v. 8, n. 3, p. 133-5, 1969.
- CARONI, P.; DONATO, F.; MULLER, D. Structural plasticity upon learning: regulation and functions. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 478–90, 2012.
- CASTRO-ALAMANCOS, M.; et al. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 5324-33, 1995.

CAVADA, C.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Posterior parietal cortex in rhesus monkey: I. Parcellation of areas based on distinctive limbic and sensory corticocortical connections. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 287, p. 393–421, 1989.

CENQUIZCA, L. A.; SWANSON, L. W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v. 56, n. 1, p. 1–26, 2007.

CHEERAN, B.; et al. Transcranial magnetic stimulation: from neurophysiology to pharmacology, molecular biology and genomics. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 16, n. 3, p. 210–21, 2010.

CHURCHWELL, J. C.; KESNER, R. P. Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: interactions and independent parallel processing. **Behavioural brain research**, v. 225, n. 2, p. 389–95, 2011.

CLARK, V. P.; et al. TDCS guided using fMRI significantly accelerates learning to identify concealed objects. **NeuroImage**, v. 59, n. 1, p. 117–28, 2010.

CLARK, V. P.; et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) produces localized and specific alterations in neurochemistry: a <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy study. **Neuroscience letters**, v. 500, n. 1, p. 67–71, 2011.

COHEN, L. G.; et al. Effects of coil design on delivery of focal magnetic stimulation. Technical considerations. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 75, n. 4, p. 350–7, 1989.

COHEN-KADOSH, R.; et al. Modulating neuronal activity produces specific and long-lasting changes in numerical competence. **Current Biology**, v. 20, n. 22, p. 2016–20, 2010.

COLLINGRIDGE, G. L.; ISAAC, J. T. R.; WANG, Y. T. Receptor trafficking and synaptic plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 12, p. 952–62, 2004.

COSTAIN, R.; REDFEARN, J. W. T.; LIPPOLD, O. C. J. A controlled trial of the therapeutic effects of polarization of the brain in depressive illness. **The British Journal of Psychiatry**, v. 110, p. 786–99, 1964.

COTELLI, M.; et al. Improved language performance in Alzheimer disease following brain stimulation. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 82, n. 7, p. 794–7, 2011.

COWAN, N. The magical number 4 in short-term memory: a reconsideration of mental storage capacity. **The Behavioral and brain sciences**, v. 24, n. 1, p. 87–114, 2001.

COWANSAGE, K. K.; LEDOUX, J. E.; MONFILS, M.-H. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. **Current molecular pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 12–29, 2010.

CRAMER, S. C.; et al. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. **Brain: a journal of neurology**, v. 134, n. 6, p. 1591–609, 2011.

CREELEY, C.; et al. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. **The Journal of neuroscience**, v. 26, n. 15, p. 3923–32, 2006.

CREUTZFELDT, O. D.; FROMM, G. H.; KAPP, H. Influence of transcortical D-C currents on cortical neuronal activity. *Exp Neurol*, v. 5, p. 436-52, 1962.

CUMMINGS, J. L. Frontal-subcortical circuits and human behavior. *Archives of Neurology*, v. 50, n. 8, p. 873-80, 1993.

CURTIS, C. E.; LEE, D. Beyond working memory: the role of persistent activity in decision making. *Trends in cognitive sciences*, v. 14, n. 5, p. 216–22, 2010.

CUSTODIO, J. C. S.; et al. Epidural direct current stimulation over the left medial prefrontal cortex facilitates spatial working memory performance in rats. *Brain stimulation*, p. 1–9, 2012.

DALLEY, J. W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 28, n. 7, p. 771–84, 2004.

DAMASIO, A. R. The somatic marker hypothesis and the possible functions of the prefrontal cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 351, n. 1346, p. 1413-20, 1996.

DANYSZ, W.; et al. Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents - preclinical studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 21, n. 4, p. 455-68, 1997.

DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 18, n. 1, p. S23–S32, 2003.

DANYSZ, W.; WROBLEWSKI, J. T.; COSTA, E. Learning impairment in rats by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuropharmacology*, v. 27, n. 6, p. 653–6, 1988.

DATTA, A.; et al. Gyri-precise head model of transcranial direct current stimulation: Improved spatial focality using a ring electrode versus conventional rectangular pad. *Brain Stimulation*, v. 2, n. 4, p. 201-7, 2009.

DAVIES, J.; et al. 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of aminoacid-induced and synaptic excitation. *Neuroscience Letters*, v. 21, n. 1, p. 77-81, 1981.

DEMATTEIS, M.; LALLEMENT, G.; MALLARET, M. Dextromethorphan and dextrorphan in rats: Common antitussives - Different behavioural profiles. *Fundam Clin Pharmacol*, p. 526–537, 1998.

DEMIRTAS-TATLIDEDE, A.; VAHABZADEH-HAGH, A. M.; PASCUAL-LEONE, A. Can noninvasive brain stimulation enhance cognition in neuropsychiatric disorders? *Neuropharmacology*, v. 64, n. 1, p. 566–78, 2013.

DERKACH, V. A.; et al. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 8, n. 2, p. 101–13, 2007.

DIAMOND, A. Executive functions. *Annual review of psychology*, v. 64, p. 135–68, 2013.

DIAS, R.; AGGLETON, J. P. Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: Differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioural flexibility. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 4457–66, 2000.

DOCKERY, C. A.; et al. Cumulative benefits of frontal transcranial direct current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 96, n. 3, p. 452–60, 2011.

DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 240–9, 2001.

DYMOND, A. M.; COGER, R. W.; SERAFETINIDES, E. A. Intracerebral current levels in man during electrosleep therapy. **Biological Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 101-4, 1975.

EAGLE, D. M.; et al. Effects of regional striatal lesions on motor, motivational, and executive aspects of progressive-ratio performance in rats, **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 4, p. 718–31, 1999.

EDWARDS, D. J. On the understanding and development of modern physical neurorehabilitation methods: robotics and non-invasive brain stimulation. **Journal of Neuroengineering and Rehabilitation**, v. 6, n. 3, 2009.

ENGLE, R. W.; KANE, M. J.; TUHOLSKI, S. W. Individual differences in working memory capacity and what they tell us about controlled attention, general fluid intelligence, and functions of the prefrontal cortex. In: MIYAKE, A.; SHAH, P. (Eds.). **Models of working memory: Mechanisms of active maintenance and executive control**. New York: Cambridge University Press, 1999. p. 102-34.

ERICSSON, K. A.; DELANEY, P. F. Long-term working memory as an alternative to capacity models of working memory in everyday skilled performance. In: MIYAKE, A.; SHAH, P. (Eds.). **Models of working memory: Mechanisms of active maintenance and executive control**. New York: Cambridge University Press, 1999. p. 257-97.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron**, v. 76, n. 6, p. 1057–70, 2012.

FARBER, N. B. The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1003, p. 119-30, 2003.

FECTEAU, S., et al. Activation of prefrontal cortex by transcranial direct current stimulation reduces appetite for risk during ambiguous decision making. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 23, p. 6212–8, 2007.

FEIL, J.; ZANGEN, A. Brain stimulation in the study and treatment of addiction. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 34, n. 4, p. 559–74, 2010.

FELDMAN, D. E. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 32, p. 33–55, 2009.

FERBINTEANU, J.; SHAPIRO, M. L. Prospective and retrospective memory coding in the hippocampus. **Neuron**, v. 40, n. 6, p. 1227–39, 2003.

- FERRIER, D. **The Functions of the Brain**. London: Smith, Elder, 1876.
- FERRUCCI, R.; et al. Transcranial direct current stimulation improves recognition memory in Alzheimer disease. **Neurology**, v. 71, n. 7, p. 493-8, 2008.
- FERTONANI, A.; et al. Naming facilitation induced by transcranial direct current stimulation. **Behavioral Brain Research**, v. 208, n. 2, p. 311-8, 2010.
- FISCHER, G.; et al. Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 283, n. 3, p. 1285–92, 1997.
- FLOEL, A.; et al. Noninvasive brain stimulation improves language learning. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 20, n. 8, p. 1415–22, 2008.
- FLORESCO, S. B.; GHODS-SHARIFI, S. Amygdala-prefrontal cortical circuitry regulates effort-based decision making. **Cerebral Cortex**, v. 17, n. 2, p. 251–60, 2007.
- FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, A. G. Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D<sub>1</sub> agonist into the rat medial prefrontal cortex. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, n. 4, p. 934-9, 2001.
- FLORESCO, S. B.; SEAMANS, J. K.; PHILLIPS, A. G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 5, p. 1880–90, 1997.
- FORERO, D. A.; et al. Analysis of functional polymorphisms in three synaptic plasticity-related genes (BDNF, COMT AND UCHL1) in Alzheimer's disease in Colombia. **Neuroscience research**, v. 55, n. 3, p. 334–41, 2006.
- FREGNI, F.; et al. A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 2, p. 335-42, 2006.
- FREGNI, F.; et al. Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. **Experimental brain research**, v. 166, n. 1, p. 23–30, 2005.
- FREGNI, F.; et al. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression. **Experimental Neurology**, v. 204, n. 1, p. 462-6, 2007.
- FREGNI, F.; PASCUAL-LEONE, A. Hand motor recovery after stroke: tuning the orchestra to improve hand motor function. **Cognitive and Behavioral Neurology**, v. 19, n. 1, p. 21-33, 2006.
- FRITSCH, B.; et al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. **Neuron**, v. 66, n. 2, p. 198–204, 2010.
- FROHLICH, F.; MCCORMICK, D. A. Endogenous electric fields may guide neocortical network activity. **Neuron**, v. 67, n. 1, p. 129-43, 2010.
- FUNAHASHI, S. Prefrontal cortex and working memory processes. **Neuroscience**, v. 139, n. 1, p. 251–61, 2006.

- FUNAHASHI, S.; BRUCE, C. J.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Dorsolateral prefrontal lesions and oculomotor delayed-response performance: evidence for mnemonic “scotomas”. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 1479–97, 1993.
- FUNAHASHI, S.; BRUCE, C. J.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Mnemonic coding of visual space in the monkey’s dorsolateral prefrontal cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 61, n. 2, p. 331-349, 1989.
- FUSTER, J. M. Cortex and memory: emergence of a new paradigm. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 21, n. 11, p. 2047–72, 2009.
- FUSTER, J. M. The prefrontal cortex - an update: time is of the essence. **Neuron**, v. 30, n. 2, p. 319–33, 2001.
- FUSTER, J. M. Upper processing stages of the perception-action cycle. **Trends in cognitive sciences**, v. 8, n. 4, p. 143–5, 2004.
- FUSTER, J. M.; ALEXANDER, G. E. Neuron activity related to short-term memory. **Science**, v. 173, n. 3997, p. 652–4, 1971.
- FUSTER, J. M.; BRESSLER, S. L. Cognit activation: a mechanism enabling temporal integration in working memory. **Trends in cognitive sciences**, v. 16, n. 4, p. 207–18, 2012.
- GABBOTT, P. L. A; et al. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **The Journal of comparative neurology**, v. 492, n. 2, p. 145–77, 2005.
- GALEA, J. M.; CELNIK, P. Brain polarization enhances the formation and retention of motor memories. **Journal of Neurophysiology**, v. 102, n. 1, p. 294-301, 2009.
- GANDIGA, P. C.; HUMMEL, F. C.; COHEN, L. G. Transcranial DC stimulation (tDCS): a tool for double-blind sham-controlled clinical studies in brain stimulation. **Clinical Neurophysiology**, v. 117, n. 4, p. 845-50, 2006.
- GARTSIDE, I. B. Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurons in the rat cerebral cortex after polarization: reverberating circuits or modification of synaptic conductance? **Nature**, v. 220, n. 5165, p. 382-3, 1968a.
- GARTSIDE, I. B. Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurons in the rat cerebral cortex after polarization: role of protein synthesis. **Nature**, v. 220, n. 5165, p. 383-4, 1968b.
- GHASEMI, M.; SCHACHTER, S. C. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 617–40, 2011.
- GIGUERE, M.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Mediodorsal nucleus: areal, laminar, and tangential distribution of afferents and efferents in the frontal lobe of rhesus monkeys. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 277, n. 2, p. 195–213, 1988.
- GOGTAY, N.; et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 21, p. 8174-9, 2004.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cortical localization of working memory. In: MCGAUGH, J. L.; WEINBERGER, N. M.; LINCH, G. (Orgs). **Brain organization and memory. Cells, systems and circuits**. New York: Oxford Science Publications, 1990. p. 285-98.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Regional and cellular fractionation of working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13473–80, 1996.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Working memory dysfunction in schizophrenia. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 6, n. 4, p. 348-57, 1994.

GOTO, Y.; GRACE, A. A. Dopamine modulation of hippocampal-prefrontal cortical interaction drives memory-guided behavior. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 6, p. 1407-14, 2008.

GOTO, Y.; YANG, C. R.; OTANI, S. Functional and dysfunctional synaptic plasticity in prefrontal cortex: roles in psychiatric disorders. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 199–207, 2010.

GROENEWEGEN, H. J.; WRIGHT, C. I.; UYLINGS, H. B. The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. **Journal of Psychopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 99-106, 1997.

HALLETT, M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. **Neuron**, v. 55, n. 2, p. 187-99, 2007.

HARDER, J. A.; et al. Learning impairments induced by glutamate blockade using dizocilpine (MK-801) in monkeys. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 5, p. 1013-8, 1998.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 2, p. 81–9, 2003.

HARLOW, J. M. Passage of an iron rod through the head. **Boston Medical Surgery Journal**, v. 39, p. 389-93, 1848.

HATTORI, Y.; MORIWAKI, A.; HORI, Y. Biphasic effects of polarizing current on adenosine-sensitive generation of cyclic AMP in rat cerebral cortex. **Neuroscience Letters**, v. 116, n. 3, p. 320-4, 1990.

HEBB, D. O. **The organization of behaviour**. New York: Wiley, 1949.

HEIDBREder, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 6, p. 555–579, 2003.

HESSELINK, M. B.; et al. The role of probenecid-sensitive organic acid transport in the pharmacokinetics of N-methyl-D- aspartate receptor antagonists acting at the glycine(B)-site: microdialysis and maximum electroshock seizures studies. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, n. 2, p. 543-50, 1999.

HIKOSAKA, O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 503-13, 2010.

- HLINAK, Z.; KREJCI, I. Kynurenic acid and 5,7-dichlorokynurenic acid improve social and object recognition in male rats. **Psychopharmacology**, v. 120, n. 4, p. 463-9, 1995.
- HOFMANN, W.; SCHMEICHEL, B. J.; BADDELEY, A. D. Executive functions and self-regulation. **Trends in cognitive sciences**, v. 16, n. 3, p. 174–80, 2012.
- HOLROYD, C. B.; COLES, M. G.; NIEUWENHUIS, S. Medial prefrontal cortex and error potentials. *Science*, v. 296, n. 5573, p. 1610-1, 2002.
- HOLTMAAT, A.; SVOBODA, K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 10, p. 647-58, 2009.
- HORST, N. K.; LAUBACH, M. The role of rat dorsomedial prefrontal cortex in spatial working memory. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 444-56, 2009.
- HUTTENLOCHER, P. R.; DABHOLKAR, A. S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. **The Journal of comparative neurology**, v. 387, n. 2, p. 167-78, 1997.
- ISLAM, N.; et al. Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain. **Brain Research**, v. 684, n. 2, p. 206-8, 1995.
- ITOI, K.; SUGIMOTO, N. The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 5, p. 355-61, 2010.
- IYER, M. B.; et al. Safety and cognitive effect of frontal DC brain polarization in healthy individuals. **Neurology**, v. 64, n. 5, p. 872-5, 2005.
- IYER, M. B.; SCHLEPER, N.; WASSERMANN, E. M. Priming stimulation enhances the depressant effect of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 34, p. 10867-72, 2003.
- JACOBSON, S.; TROJANOWSKI, J. Q. Prefrontal granular cortex of the rhesus monkey. I. Intrahemispheric cortical afferents. **Brain Research**, v. 132, n. 2, p. 209–33, 1977.
- JASMIN, L.; et al. Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 3, p. 425-40, 2004.
- JAY, T. M.; WITTER, M. P. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 313, n. 4, p. 574-86, 1991.
- JENTSCH, J. D.; ROTH, R. H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 201–25, 1999.
- JO, J. M.; et al. Enhancing the working memory of stroke patients using tDCS. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 88, n. 5, p. 404-9, 2009.
- JOHNSON, J. W.; KOTERMANSKI, S. E. Mechanism of action of memantine. **Current opinion in pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 61–7, 2006.
- JONES, M. W. A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory. **Current molecular medicine**, v. 2, n. 7, p. 639–47, 2002.

JONES, M. W.; WILSON, M. A. Theta rhythms coordinate hippocampo-prefrontal interactions in a spatial memory task. **PLoS Biology**, v. 3, n. 12, p. 2187-99, 2005.

JUNG, M. W.; et al. Firing characteristics of deep layer neurons in prefrontal cortex in rats performing spatial working memory tasks. **Cerebral Cortex**, v. 8, n. 5, p. 437-50, 1998.

JUNG, M. W.; WIENER, S. I.; MCNAUGHTON, B. L. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 12, p. 7347-56, 1994.

KAMETANI, H.; KESNER, R. P. Retrospective and prospective coding of information: dissociation of parietal cortex and hippocampal formation. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 1, p. 84-9, 1989.

KATO, K.; et al. Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. **Nature**, v. 367, n. 6459, p. 175-79, 1994.

KEESER, D.; et al. Prefrontal transcranial direct current stimulation changes connectivity of resting-state networks during fMRI. **The Journal of neuroscience**, v. 31, n. 43, p. 15284-93, 2011.

KEMP, J. A.; et al. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 85, n. 17, p. 6547-50, 1988.

KESNER, R. P. Retrospective and prospective coding of information: role of the medial prefrontal cortex. **Experimental Brain Research**, v. 74, n. 1, p. 163-7, 1989.

KESNER, R. P.; CHURCHWELL, J. C. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. **Neurobiology of learning and memory**, v. 96, n. 3, p. 417-31, 2011.

KHAN, Z. U.; MULY, E. C. Molecular mechanisms of working memory. **Behavioural brain research**, v. 219, n. 2, p. 329-41, 2011.

KINCES, T. Z.; et al. Facilitation of probabilistic classification learning by transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex in the human. **Neuropsychologia**, v. 42, n. 1, p. 113-7, 2004.

KIRSCHEN, M. P.; et al. Enhancement of phonological memory following transcranial magnetic stimulation (TMS). **Behavioral Neurology**, v. 17, n. 3-4, p. 187-94, 2006.

KJELSTRUP, K. B.; et al. Finite scale of spatial representation in the hippocampus. **Science**, v. 321, n. 5885, p. 140-3, 2008.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217-38, 2010.

KOSKI, L.; PAUS, T. Functional connectivity of the anterior cingulate cortex within the human frontal lobe: A brain-mapping meta-analysis. **Experimental Brain Research**, v. 133, n. 1, p. 55-65, 2000.

KRANZ, G. S.; KASPER, S.; LANZENBERGER, R. Reward and the serotonergic system. **Neuroscience**, v. 166, n. 4, p. 1023-35, 2010.

- KRINGELBACH, M. L. The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 691–702, 2005.
- KUBOTA, K.; NIKI, H. Prefrontal cortical unit activity and delayed alternation performance in monkeys. **Journal of Neurophysiology**, v. 34, n. 3, p. 337–47, 1971.
- KUO, M.-F.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M. A. Boosting focally-induced brain plasticity by dopamine. **Cerebral cortex**, v. 18, n. 3, p. 648–51, 2008.
- KUO, M.-F.; et al. Focusing effect of acetylcholine on neuroplasticity in the human motor cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 52, p. 14442–7, 2007.
- LAMPRECHT, R.; LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 45–54, 2004.
- LANG, N.; et al. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? **The European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 495–504, 2005.
- LASTE, G.; et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Experimental brain research**. v. 221, n. 1, p. 75–83, 2012.
- LAU, C. G.; ZUKIN, R. S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 413–26, 2007.
- LEE, I.; KESNER, R. P. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 1517–23, 2003.
- LEFAUCHEUR, J.-P. Principles of therapeutic use of transcranial and epidural cortical stimulation. **Clinical neurophysiology**, v. 119, n. 10, p. 2179–84, 2008.
- LEVIN, E. D.; et al. Nicotine-dizocilpine interactions and working and reference memory performance of rats in the radial arm maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 61, n. 3, p. 335–40, 1998.
- LIAO, D.; HESSLER, N. A.; MALINOW, R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 400–4, 1995.
- LIEBETANZ, D.; et al. After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. **Neuroscience letters**, v. 398, n. 1–2, p. 85–90, 2006a.
- LIEBETANZ, D.; et al. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 7, p. 1216–24, 2006b.
- LIEBETANZ, D.; et al. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. **Brain**, v. 125, n. 10, p. 2238–47, 2002.
- LIEBETANZ, D.; et al. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. **Clinical neurophysiology**, v. 120, n. 6, p. 1161–7, 2009.

- LIPTON, S. A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 2, p. 160–70, 2006.
- LIVINGSTON, A.; WATERMAN, A. E. The development of tolerance to ketamine in rats and the significance of hepatic metabolism. **British Journal of Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 63-9, 1978.
- LOGIE, R.; et al. Visual similarity effects in immediate verbal serial recall. **The Quarterly Journal of Experimental Psychology**, v. 53, n. 3, p. 626-46, 2000.
- LORKE, D. E.; et al. TUNEL and growth factor expression in the prefrontal cortex of Alzheimer patients over 80 years old. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 13–23, 2010.
- LUBY, E. D.; et al. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. **AMA Archives of Neurology and Psychiatry**, v. 81, n. 3, p. 363-9, 1959.
- LUKOYANOV, N. V.; PAULA-BARBOSA, M. M. Memantine, but not dizocilpine, ameliorates cognitive deficits in adult rats withdrawn from chronic ingestion of alcohol. **Neuroscience Letters**, v. 309, n. 1, p. 45-8, 2001.
- LUSCHER, C.; et al. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 545-50, 2000.
- LYNCH, G. Glutamate-based therapeutic approaches: ampakines. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 82–8, 2006.
- MAGISTRETTI, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 12, p. 2304-11, 2006.
- MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotrophin-releasing factor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 829-41, 2005.
- MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 5–21, 2004.
- MALINOW, R.; MALENKA, R. C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 25, p. 103-26, 2002.
- MALINOW, R.; SCHULMAN, H.; TSIEN, R. W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. **Science**, v. 245, n. 4920, p. 862-6, 1989.
- MANOLA, L.; et al. Modelling motor cortex stimulation for chronic pain control: electrical potential field, activating functions and responses of simple nerve fibre models. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 43, n. 3, p. 335-43, 2005.
- MARSDEN, W. N. Synaptic plasticity in depression: Molecular, cellular and functional correlates. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 43C, p. 168–184, 2013.
- MARSHALL, L.; et al. Bifrontal transcranial direct current stimulation slows reaction time in a working memory task. **BMC neuroscience**, v. 6, p. 23, 2005.

- MARSHALL, L.; et al. Transcranial direct current stimulation during sleep improves declarative memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9985-92, 2004.
- MARVANOVA, M.; et al. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 18, n. 3, p. 247-58, 2001.
- MAY, L. T.; et al. Allosteric modulation of G protein coupled receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 1-51, 2007.
- MCBAIN, C. J.; MAYER, M. L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 723-60, 1994.
- MCBRIDE, T.; ARNOLD, S. E.; GUR, R. C. A comparative volumetric analysis of the prefrontal cortex in human and baboon MRI. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 54, n. 3, p. 159-66, 1999.
- MCCREERY, D. B.; et al. Charge density and charge per phase as cofactors in neural injury induced by electrical stimulation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 37, n. 10, p. 996-1001, 1990.
- MCKINLEY, R. A.; et al. Modulating the brain at work using noninvasive transcranial stimulation. **NeuroImage**, v. 59, n. 1, p. 129-37, 2012.
- MESULAM, M. M. A plasticity-based theory of the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 924, p. 42-52, 2000.
- MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 167-202, 2001.
- MILLER, G.; GALANTER, E.; PRIBRAM, K. H. **Plans and the structure of behavior**. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1960.
- MIRANDA, P. C.; FARIA, P.; HALLETT, M. What does the ratio of injected current to electrode area tell us about current density in the brain during tDCS? **Clinical Neurophysiology**, v. 120, n. 6, p. 1183-7, 2009.
- MIRANDA, P. C.; LOMAREV, M.; HALLET, M. Modeling the current distribution during transcranial direct current stimulation. **Clinical Neurophysiology**, v. 117, n. 7, p. 1623-9, 2006.
- MONTE-SILVA, K.; et al. D<sub>2</sub> receptor block abolishes theta burst stimulation- induced neuroplasticity in the human motor cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 10, p. 2097-102, 2011.
- MONTE-SILVA, K.; et al. Dose-dependent inverted U-shaped effect of dopamine (D<sub>2</sub>-like) receptor activation on focal and nonfocal plasticity in humans. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 19, p. 6124-31, 2009.
- MONTI, A.; et al. Improved naming after transcranial direct current stimulation in aphasia. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 451-3, 2008.
- MORGAN, C. J. A.; CURRAN, H. V. Ketamine use: a review. **Addiction**, v. 107, n. 1, p. 27-38, 2012.

MOTES, M. A; RYPMA, B. Working memory component processes: isolating BOLD signal changes. **NeuroImage**, v. 49, n. 2, p. 1933–41, 2010.

MOTTAGHY, F.; SPARING, R.; TÖPPER, R. Enhancing picture naming with transcranial magnetic stimulation. **Behavioral Neurology**, v. 17, n. 3-4, p. 177-86, 2006.

MYHRER, T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. **Brain Research Reviews**, v. 41, n. 2-3, p. 268–287, 2003.

NADLEWSKA, A. et al. Behavioral effects of D-AP7 in rats subjected to experimental hypoxia. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 337–44, 2003.

NAHAS, Z.; et al. Bilateral epidural prefrontal cortical stimulation for treatment-resistant depression. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 101–9, 2010.

NAKAMURA, E. M.; et al. Reversible effects of acute and long-term administration of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 28, n. 2, p. 167-75, 1991.

NAKAMURA-PALACIOS, E. M. Working Memory and Prefrontal Cortex and Their Relation with the Brain Reward System and Drug Addiction. In: LEVIN, E. S. (Org.). **Working Memory: Capability, Developments and Improvement Techniques**. New York: NOVA Publishers, 2011. p. 109-40.

NAKAMURA-PALACIOS, E. M.; et al. Auditory event-related potentials (P3) and cognitive changes induced by frontal direct current stimulation in alcoholics according to Lesch alcoholism typology. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 601-16, 2011.

NAKAMURA-PALACIOS, E. M.; ROELKE, C. E. Effects of acute or daily administration of diazepam on spatial learning and working memory. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 46, n. 3, p. 181-90, 1997.

NARAYANAN, N. S.; HORST, N. K.; LAUBACH, M. Reversible inactivations of rat medial prefrontal cortex impair the ability to wait for a stimulus. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 865-76, 2006.

NARAYANAN, N. S.; LAUBACH, M. Top-down control of motor cortex ensembles by dorsomedial prefrontal cortex. **Neuron**, v. 52, n. 5, p. 921-31, 2006.

NATHAN, P. J.; et al. Studying synaptic plasticity in the human brain and opportunities for drug discovery. **Current opinion in pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 540–8, 2011.

NEAFSEY, E. J.; et al. Anterior cingulate cortex in rodents: connections, visceral control functions, and implications for emotion. In: VOGT, B. A.; GABRIEL, M. (Eds.). **Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus: A Comprehensive Handbook**. Cambridge: Birkhaeuser, 1993. p. 206-23.

NEILL, J. C.; et al. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. **Pharmacology & therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 419–32, 2010.

NEKHENDZY, V.; et al. The antinociceptive effect of transcranial electrostimulation with combined direct and alternating current in freely moving rats. **Anesthesia and Analgesia**, v. 98, n. 3, p. 730-7, 2004.

NELSON, R. J.; TRAINOR, B. C. Neural mechanisms of aggression. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 536-46, 2007.

NETZER, R.; PFLIMLIN, P.; TRUBE, G. Dextromethorphan blocks N-methyl-D- aspartate-induced currents and voltage-operated inward currents in cultured cortical neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 238, n. 2-3, p. 209-16, 1993.

NITSCHKE, M. A.; et al. Catecholaminergic consolidation of motor cortical neuroplasticity in humans. **Cerebral Cortex**, v. 14, n. 11, p. 1240-5, 2004b.

NITSCHKE, M. A.; et al. Dopaminergic modulation of long-lasting direct current-induced cortical excitability changes in the human motor cortex. **The European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 6, p. 1651-7, 2006.

NITSCHKE, M. A.; et al. GABAergic modulation of DC stimulation-induced motor cortex excitability shifts in humans. **The European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 2720-6, 2004c.

NITSCHKE, M. A.; et al. MRI study of human brain exposed to weak direct current stimulation of the frontal cortex. **Clinical Neurophysiology**, v. 115, n. 10, p. 2419-23, 2004.

NITSCHKE, M. A.; et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. **The Journal of physiology**, v. 553, n. Pt 1, p. 293–301, 2003c.

NITSCHKE, M. A.; et al. Safety criteria for transcranial direct current stimulation (tDCS) in humans. **Clinical Neurophysiology**, v.114, n. 11, p. 2220-2, 2003b.

NITSCHKE, M. A.; PAULUS, W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. **The Journal of Physiology**, v. 527, 633-9, 2000.

NITSCHKE, M. A.; PAULUS, W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. **Neurology**, v. 57, n. 10, p. 1899-901, 2001.

NITSCHKE, M. A; et al. Consolidation of human motor cortical neuroplasticity by D-cycloserine. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 8, p. 1573–8, 2004a.

NITSCHKE, M. A; et al. D1-receptor impact on neuroplasticity in humans. **The Journal of neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 2648–53, 2009.

NITSCHKE, M. A; et al. Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 619–26, 2003.

NITSCHKE, M. A; et al. Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation-technical, safety and functional aspects. **Supplements to Clinical neurophysiology**, v. 56, p. 255–76, 2003a.

NITSCHKE, M. A; et al. Serotonin affects transcranial direct current-induced neuroplasticity in humans. **Biological psychiatry**, v. 66, n. 5, p. 503–8, 2009.

NITSCHKE, M. A.; et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. **Brain stimulation**, v. 1, n. 3, p. 206–23, 2008.

NOVAK, L.; et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, v. 307, n. 5950, p. 462-5, 1984.

O'CONNELL, N. E.; et al. Non-invasive brain stimulation techniques for chronic pain. A report of a Cochrane systematic review and meta-analysis. **European Journal of Physical and rehabilitation medicine**, v. 47, n. 2, p. 309-26, 2011.

O'DELL, T. J.; KANDEL, E. R.; GRANT, S. G. Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. **Nature**, v. 353, n. 6344, p. 558-60, 1991.

OHN, S. H.; et al. Time-dependent effect of transcranial direct current stimulation on the enhancement of working memory. **Neuroreport**, v. 19, n. 1, p. 43–7, 2008.

OLNEY, J. W.; NEWCOMER, J. W.; FARBER, N. B. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research**, v. 33, n. 6, p. 523-33, 1999.

OLTON, D. S. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. **Physiology & behavior**, v. 40, n. 6, p. 793–7, 1987.

OLTON, D. S.; BECKER, J. T.; HANDELMANN, G. E. Hippocampus, space and memory. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 2, n. 3, p. 313-65, 1979.

OLTON, D. S.; SAMUELSON, R. J. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. **Journal of Experimental Psychology - Animal Behavior Processes**, v. 2, n. 2, p. 97-116, 1976.

ONGÜR, D.; PRICE, J. L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cerebral cortex**, v. 10, n. 3, p. 206–19, 2000.

PARASURMAN, R.; RIZZO, M. **Neuroergonomics: The Brain at Work**. New York: Oxford University Press, 2008.

PARSONS, C. G.; et al. Amino-alkylcyclohexanes are novel uncompetitive NMDA receptor antagonists with strong voltage-dependency and fast blocking kinetics: in vitro and in vivo characterization. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 1, p. 85-108, 1999.

PARSONS, C. G.; et al. Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of *N*-methyl- D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). **Neuropharmacology**, v. 32, n. 12, p. 1337-50, 1993.

PARSONS, C. G.; STÖFFLER, A.; DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 6, p. 699–723, 2007.

PASCUAL-LEONE, A., et al. Characterizing brain cortical plasticity and network dynamics across the age-span in health and disease with TMS-EEG and TMS-fMRI. **Brain Topography**, v. 24, n. 3-4, p. 302-15, 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Amsterdam: Academic Press, 2005.

- PETERCHEV, A. V.; et al. Fundamentals of transcranial electric and magnetic stimulation dose: definition, selection, and reporting practices. **Brain stimulation**, v. 5, n. 4, p. 435–53, 2012.
- PFURTSCHHELLER, G. [Changes in the evoked and spontaneous brain activity of man during extracranial polarization]. **Z. Gesamte Exp. Med.**, v. 152, n. 4, p. 284-93, 1970.
- PIETÁ DIAS, C.; et al. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. **Neuroscience**, v. 146, n. 4, p. 1719–25, 2007.
- PLOW, E. B.; et al. Combining visual rehabilitative training and noninvasive brain stimulation to enhance visual function in patients with hemianopia: a comparative case study. **PM & R: The Journal of injury, function, and rehabilitation**, v. 3, n. 9, p. 825-35, 2011.
- POPOLI, M.; et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 22–37, 2012.
- POREISZ, C.; et al. Safety aspects of transcranial direct current stimulation concerning healthy subjects and patients. **Brain Research Bulletin**, v. 72, n. 4-6, p. 208-14, 2007.
- POSNER, M. I.; et al. Localization of cognitive operations in the human brain. **Science**, v. 240, n. 4859, p. 1627-31, 1988.
- POSNER, M. I.; PETERSEN, S. E. The attention system of the human brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 13, p. 25-42, 1990.
- POWELL, K. B.; VOELLER, K. K. S. Prefrontal executive function syndromes in children. **Journal of child neurology**, v. 19, n. 10, p. 785–97, 2004.
- PRATT, W. E.; MIZUMORI, S. J. Neurons in rat medial prefrontal cortex show anticipatory rate changes to predictable differential rewards in a spatial memory task. **Behavioral Brain Research**, v. 123, n. 2, p. 165-83, 2001.
- PRIORI, A. Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged non-invasive modulation of brain excitability. **Clinical Neurophysiology**, v. 114, n. 4, p. 589-95, 2003.
- PRIORI, A.; LEFAUCHEUR, J. P. Chronic epidural motor cortical stimulation for movement disorders. **Lancet Neurology**, v. 6, n. 3, p. 279-86, 2007.
- PURPURA, D. P.; MCMURTRY, J. G. Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 28, p. 166-85, 1965.
- QUAN, M.N.; et al. Possible antidepressant effects and mechanisms of memantine in behaviors and synaptic plasticity of a depression rat model. **Neuroscience**, v. 182, p. 88–97, 2011.
- RAIMUNDO, R. J. S.; URIBE, C. E.; BRASIL-NETO, J. P. Lack of clinically detectable acute changes on autonomic or thermoregulatory functions in healthy subjects after transcranial direct current stimulation (tDCS). **Brain stimulation**, v. 5, n. 3, p. 196–200, 2012.
- RAMMES, G.; DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Pharmacodynamics of memantine: an update. **Current neuropharmacology**, v. 6, n. 1, p. 55–78, 2008.

RAYMOND, C. R. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the “long” in long-term potentiation. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 4, p.167-75, 2007.

REIS, J.; et al. Noninvasive cortical stimulation enhances motor skill acquisition over multiple days through an effect on consolidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 5, p. 1590-5, 2009.

REPOVŠ, G.; BADDELEY, A. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. **Neuroscience**, v. 139, n. 1, p. 5–21, 2006.

RÉUS, G. Z.; et al. Neurochemical and behavioural effects of acute and chronic memantine administration in rats: further support for NMDA as a new pharmacological target for the treatment of depression? **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 6, p. 585-9, 2010.

RIDDERINKHOF, K. R.; et al. Neurocognitive mechanisms of cognitive control: the role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. **Brain and cognition**, v. 56, n. 2, p. 129–40, 2004.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural brain research**, v. 140, n. 1-2, p. 1–47, 2003.

RIGONATTI, S. P.; et al. Transcranial direct stimulation and fluoxetine for the treatment of depression. **European Psychiatry**, v. 23, n. 1, p. 74-6, 2008.

RISSMAN, J.; WAGNER, A. D. Distributed representations in memory: insights from functional brain imaging. **Annual review of psychology**, v. 63, p. 101–28, 2012.

ROESLER, R.; SCHRÖDER, N. Cognitive enhancers: focus on modulatory signaling influencing memory consolidation. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 99, n. 2, p. 155–63, 2011.

ROMANIDES, A. J.; DUFFY, P.; KALIVAS, P. W. Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 97-106, 1999.

ROSEN, S. C.; STAMM, J. S. Transcortical polarization: facilitation of delayed response performance by monkeys. **Experimental Neurology**, v. 35, n. 2, p. 282-9, 1972.

ROTEM, A.; MOSES, E. Magnetic stimulation of one-dimensional neuronal cultures. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 12, p. 5065-78, 2008.

RUSH, S.; DRISCOLL, D. A. Current distribution in the brain from surface electrodes. **Anesthesia and Analgesia**, v. 47, n. 6, p. 717-23, 1968.

RUSHWORTH, M. F.; et al. Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. **Neuron**, v. 70, n. 6, p. 1054-69, 2011.

SAINT BLANQUAT, P.; et al. Tagging items in spatial working memory: a unit-recording study in the rat medial prefrontal cortex. **Behavioural brain research**, v. 209, n. 2, p. 267–73, 2010.

SAKAI, K. Task set and prefrontal cortex. **Annual review of neuroscience**, v. 31, p. 219–45, 2008.

- SANACORA, G.; et al. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 5, p. 426–37, 2008.
- SAPER, C. B. The hypothalamus. In: PAXINOS, G. (Ed.). **The Human Nervous System**. San Diego: Academic Press, 2003. p. 513-50.
- SCARPINI, E.; SCHELTENS, P.; FELDMAN, P. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. **Lancet Neurology**, v. 2, n. 9, p. 539-47, 2003.
- SCHULTZ, W. Reward signaling by dopamine neurons. **Neuroscientist**, v. 7, n. 4, p. 293-302, 2001.
- SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. **Science**, v. 254, n. 5037, p. 1503-6, 1991.
- SEAMANS, J. K.; FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, A. G. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. **Behavioral Neuroscience**, v. 109, n. 6, p. 1063-73, 1995.
- SEAMANS, J. K.; YANG, C. R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. **Progress in neurobiology**, v. 74, n. 1, p. 1–58, 2004.
- SEMENDEFERI, K.; et al. Humans and great apes share a large frontal cortex. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 272-6, 2002.
- SI, A.; HELLIWELL, P.; MALESZKA, R. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.77, n. 2, p. 191-7, 2004.
- SJOSTROM, P. J.; TURRIGIANO, G. G.; NELSON, S. B. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. **Neuron**, v. 39, n. 4, p. 641-54, 2003.
- SLUTZKY, M. W.; et al. Optimal spacing of surface electrode arrays for brain-machine interface applications. **Journal of neural engineering**, v. 7, n. 2, p. 26004, 2010.
- SMITH, E. E.; JONIDES, J. Storage and executive processes in the frontal lobes. **Science**, v. 283, n. 5408, p. 1657-61, 1999.
- SOWELL, E. R.; et al. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. **Nature**, v. 2, n. 10, p. 859–60, 1999.
- SPARING, R.; et al. Bidirectional alterations of interhemispheric parietal balance by non-invasive cortical stimulation. **Brain**, v. 132, n. 11, p. 3011-20, 2009.
- STAAAY, F. J.; et al. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. **Behavioural brain research**, v. 220, n. 1, p. 215–29, 2011.
- STAGG, C. J.; et al. Polarity-sensitive modulation of cortical neurotransmitters by transcranial stimulation. **The Journal of neuroscience**, v. 29, n. 16, p. 5202–6, 2009.
- STAGG, C. J.; NITSCHKE, M. A. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. **The Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 37–53, 2011.

SUL, J. H.; et al. Distinct roles of rodent orbitofrontal and medial prefrontal cortex in decision making. **Neuron**, v. 66, n. 3, p. 449-60, 2010.

SWAIN, H. A.; SIGSTAD, C.; SCALZO, F. M. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 6, p. 725-9, 2004.

SWANSON, L. W. **Brain maps: structure of the rat brain**. 2nd Ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

TAKANO, Y.; et al. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. **Neuroscience letters**, v. 491, n. 1, p. 40–3, 2011.

TAYLOR, C. L.; LATIMER, M. P.; WINN, P. Impaired delayed spatial win-shift behaviour on the eight arm radial maze following excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in the rat. **Behavioral Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 107–14, 2003.

TERZUOLO, C. A.; BULLOCK, T. H. Measurement of imposed voltage gradient adequate to modulate neuronal firing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 42, n. 9, p. 687-94, 1956.

THICKBROOM, G. W. Transcranial magnetic stimulation and synaptic plasticity: experimental framework and human models. **Experimental Brain Research**, v. 180, n. 4, p. 583-93, 2007.

TSIEN, J. Z.; HUERTA, P. T; TONEGAWA, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1327-38, 1996.

TSUBOKAWA, T.; et al. Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. **Acta Neurochir Suppl**, v. 52, p. 137-9, 1991.

UEXKÜLL, J. **Theoretical Biology**. Harcourt, Brace & Co, 1926.

VAN ESSEN, D. C.; ANDERSON, C. H.; FELLEMAN, D. J. Information processing in the primate visual system: an integrated systems perspective. **Science**, v. 255, n. 5043, p. 419-23, 1992.

VERFAELLIE, M.; HEILMAN, K. M. Response preparation and response inhibition after lesions of the medial frontal lobe. **Archives of Neurology**, v. 44, n. 12, p. 1265-71, 1987.

VERTES, R. P.; et al. Nucleus reunions of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v. 71, n. 6, p. 601-9, 2007.

VOLKOW, N.; LI, T. Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 3–10, 2004.

VOLLE, E.; et al. Specific cerebral networks for maintenance and response organization within working memory as evidenced by the “double delay/double response” paradigm. **Cerebral cortex**, v. 15, n. 7, p. 1064–74, 2005.

VRIES, M. H.; et al. Electrical stimulation of Broca’s area enhances implicit learning of an artificial grammar. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 2427-36, 2010.

- WACHTER, D.; et al. Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. **Experimental neurology**, v. 227, n. 2, p. 322–7, 2011.
- WAGNER, T.; et al. Transcranial direct current stimulation: a computer-based human model study. **NeuroImage**, v. 35, n. 3, p. 1113–24, 2007.
- WAGNER, T.; VALERO-CABRE, A.; PASCUAL-LEONE, A. Noninvasive human brain stimulation. **Annual review of biomedical engineering**, v. 9, n. Figure 1, p. 527–65, 2007.
- WALLACE, T. L.; et al. Drug targets for cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 99, n. 2, p. 130–45, 2011.
- WANG, G. W.; CAI, J. X. Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic cortical circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 2, p. 365-73, 2008.
- WANG, X.-J. Discovering spatial working memory fields in prefrontal cortex. **Journal of neurophysiology**, v. 93, n. 6, p. 3027–8, 2005.
- WASSERMANN, E. M., GRAFMAN, J. Recharging cognition with DC brain polarization. **Trends in Cognitive Neurosciences**, v. 9, n. 11, p. 503-5, 2005.
- WATKINS, J. C. The NMDA receptor concept: origins and development. In: Collingridge, G. L.; Watkins, J. C. **The NMDA receptor**. 2nd Ed. Oxford University Press, 1994.
- WESTENBROEK, R. E.; AHLIJANIAN, M. K.; CATTERALL, W. A. Clustering of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. **Nature**, v. 347, n. 6290, p. 281-4, 1990.
- WILLIAMS, J. A.; IMAMURA, M.; FREGNI, F. Updates on the use of non-invasive brain stimulation in physical and rehabilitation medicine. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 41, n. 5, p. 305-11, 2009.
- WILLIAMS, K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 851-9, 1993.
- WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1-16, 1984.
- WILSON, M. A.; MCNAUGHTON, B.L. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. **Science**, v. 261, n. 5124, p. 1055-8, 1993.
- WISE, L. E.; LICHTMAN, A. H. The uncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine prolongs spatial memory in a rat delayed radial-arm maze memory task. **European journal of pharmacology**, v. 575, n. 1-3, p. 98–102, 2007.
- WISE, S. P. Forward frontal fields: phylogeny and fundamental function. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 12, p. 599–608, 2008.
- WOOD, J. N.; GRAFMAN, J. Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 139–47, 2003.

XU, X.; et al. NMDA receptor antagonist AP5 and nitric oxide synthase inhibitor 7-NI affect different phases of learning and memory in goldfish. **Brain Research**, v. 889, n. 1-2, p. 274-7, 2001.

YUAN, K.; et al. Working memory, fluid intelligence, and science learning. **Educational Research Review**, v. 1, n. 2, p. 83–98, 2006.

YUEDE, C. M.; DONG, H.; CSERNANSKY, J. G. Anti-dementia drugs and hippocampal-dependent memory in rodents. **Behavioral Pharmacology**, v. 18, n. 5-6, p. 347-63, 2007.

YUEN, T. G.; et al. Histological evaluation of neural damage from electrical stimulation: considerations for the selection of parameters for clinical application. **Neurosurgery**, v. 9, n. 3, p. 292-9, 1981.

ZIEMANN, U. TMS induced plasticity in human cortex. **Reviews in Neurosciences**, v. 15, n. 4, p. 253-66, 2004.

ZIEMANN, U.; et al. Consensus: Motor cortex plasticity protocols. **Brain Stimulation**, v. 1, n. 3, p. 164-82, 2008.

ZOLADZ, P. R.; et al. Enhancement of long-term spatial memory in adult rats by the noncompetitive NMDA receptor antagonists, memantine and neramexane. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 85, n. 2, p. 298–306, 2006.