

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

MARCELO DI MARCELLO VALLADÃO LUGON

**EFEITOS DA MODULAÇÃO NICOTÍNICA SOBRE A
NEUROPLASTICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM HUMANOS**

**VITÓRIA
2015**

EFEITOS DA MODULAÇÃO NICOTÍNICA SOBRE A NEUROPLASTICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM HUMANOS

MARCELO DI MARCELLO VALLADÃO LUGON

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

Tese 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 obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Neurociências e Farmacologia

**VITÓRIA
2015**

EFEITOS DA MODULAÇÃO NICOTÍNICA SOBRE A NEUROPLASTICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM HUMANOS

MARCELO DI MARCELLO VALLADÃO LUGON

Tese 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 obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 01/07/2015 por:

Profª Drª Ester Miyuki Nakamura-Palacios - Orientadora – UFES

Prof Dr Michael A. Nitsche – Uni-Goettingen

Profª Drª Ângela Cristina do Valle – USP

Prof Dr Luiz Carlos Schenberg - PPGCF – UFES

Profª Drª Rita Gomes Wanderley Pires - PPGBF – UFES

Profª Drª Ivanita Stefanon - Coordenadora do PPGCF – UFES

**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 de catalogação na publicação
Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo



“Esta tese é dedicada à minha avó Lia.”

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo por possibilitar a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ester Miyuki Nakamura Palacios, minha tão estimada orientadora, pelos ensinamentos, conselhos, apoio e confiança em mim depositada proporcionando um grande crescimento pessoal e profissional. Sua orientação foi um presente.

Ao Professor Doutor Michael A. Nitsche pela coorientação e por me receber em seu laboratório com tanta atenção e amizade. Obrigado por todo o conhecimento e oportunidade tão singular na minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro, tão importante ao andamento e conclusão deste trabalho.

À minha mãe pelo suporte e conselhos que me ajudaram muito em mais este ciclo da minha vida.

À minha avó Lia, pelo amor incondicional e apoio. Mesmo distante seu amor e suas preces foram essenciais para me ajudar a seguir sempre em frente.

Aos colegas de pós-graduação do Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia pela amizade e apoio.

Aos colegas de pós-graduação do Laboratório de Neurologia de Goettingen pela amizade e apoio, que foram extremamente importantes para conseguir seguir com a minha jornada. Shane, Nathzidy, Asif e Giorgi, sem a ajuda de vocês este trabalho não seria concluído.

À Monique, minha companheira nesta fase tão importante da minha vida, muito obrigado pelo seu apoio tão importante nos momentos mais difíceis.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, quero expressar o meu mais sincero e profundo agradecimento.

"Às vezes é necessário dar um passo a trás para aumentar o campo de visão."

(Hélio Magri Filho)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Neuroplasticidade	16
1.1.1 Plasticidade Sináptica e Modulação Glutamatérgica no Sistema Nervoso Central	16
1.1.2 O Córtex Motor como Modelo para o Estudo da Plasticidade	19
1.1.3 Estimulação Elétrica no SNC: História do Uso da Corrente Elétrica	20
1.1.4 Estimulação Cerebral no Século XX	22
1.1.5 Neuromodulação no Século XXI	24
1.2 Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua	25
1.2.1 Mecanismos de Ação	25
1.2.2 Funções Motoras	27
1.2.3 Aspectos Técnicos da ETCC	29
1.3 EMT	32
1.3.1 Mecanismos de Funcionamento e Ação	32
1.3.2 Aspectos Técnicos da EMT	35
1.4 Neuromoduladores	37
1.4.1 Nicotina	38
1.4.2 Dextrometorfano	40
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos Específicos	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Sujeitos	44
3.2 ETCC	44
3.3 Monitoramento da Excitabilidade do Córtex Motor	44
3.4 Intervenção Farmacológica	45
3.5 Análise Estatística	46
3.6 Procedimento Experimental	48
4. RESULTADOS	51
4.1 Características das Amostras e Análises Gerais	52
4.2 Efeito do DMO na Plasticidade Induzida pela ETCC	53
4.3 O Impacto da Nicotina na Plasticidade Induzida pela ETCC sob Influência do DMO	56

4.4	Comparação entre a Nicotina e Diferentes Doses de DMO até 30 min Após a ETCC Anódica.....	58
5.	DISCUSSÃO	60
6.	CONCLUSÕES	66
7.	REFERÊNCIAS.....	68
8.	ANEXO.....	79
8.1	Manuscrito.....	80

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias das amplitudes dos MEPs \pm SEM e as médias das intensidade de estimulação (porcentagem máxima de saída do estimulador, %MSO) \pm SEM das linhas de base 1 e 2.

Lista de Ilustrações

Figura 1. A entrada de cálcio através de receptores pós-sinápticos do tipo NMDA pode iniciar duas diferentes formas de plasticidade sináptica: potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD).

Figura 2. Localização do córtex motor primário.

Figura 3. Foto ilustrativa da técnica de Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) por meio de um par de eletrodos (catodo e anodo), conectados a um estimulador de corrente elétrica.

Figura 4. Circuito elétrico básico do equipamento de ETCC.

Figura 5. Representação das diferentes regiões cerebrais estimuladas por EMT aplicada na mesma posição, quando utilizadas bobinas de forma circular ou em forma de oito.

Figura 6. Foto representativa da EMT.

Figura 7. Fotografias representativas dos procedimentos. (A) sujeito acomodado confortavelmente em uma cadeira com encosto para os braços e a cabeça e com os eletrodos eletromiográficos colocados no MADM direito. (B) adesivo de nicotina/placebo aderido na parte superior do braço esquerdo. (C) aplicação da ETCC anódica; o aparelho para aplicação da ETCC, bem como da EMT podem ser vistos atrás à direita na foto.

Figura 8. Curso do experimento.

Figura 9. Efeitos do DMO, um antagonista de receptor NMDA, sobre a plasticidade facilitatória induzida pela ETCC.

Figura 10. Efeito da nicotina e sua interação com diferentes doses de DMO sobre a neuroplasticidade induzida pela ETCC.

Figura 11. Impacto da NIC e diferentes dosagens de DMO na plasticidade facilitatória induzida pela ETCC anódica para os MEPs obtidos até o intervalo de tempo de 30 min após a estimulação.

Lista de Abreviaturas e/ou Siglas

% MSO	porcentagem máxima de saída do estimulador
MADM	músculo abductor do dedo mínimo direito
AMPA	ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANOVA	análise de variância
AVC	acidente vascular cerebral
b1	linha de base 1
b2	linha de base 2
DMO	dextrometorfano
EEG	eletroencefalograma
EMT	estimulação magnética transcraniana
ETCC	estimulação transcraniana por corrente contínua
LTD	<i>Long-Term Depression</i>
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i>
mAChR	receptores colinérgicos muscarínicos
MDSE	manhã do dia seguinte ao experimento
MEP	potenciais motores evocados
nAChRs	receptores colinérgicos nicotínicos
NE	noite do experimento
NIC	nicotina
NMDAR	receptor N-metil-D-aspartato
PAS	estimulação associativa pareada
PLC	placebo
SEM	erro padrão da média
SNC	sistema nervoso central
tDCS	<i>transcranial direct current stimulation</i>

TDSE tarde do dia seguinte ao experimento

TMS *transcranial magnetic stimulation*

Resumo

A nicotina (NIC) altera as funções cognitivas modulando a neuroplasticidade e a excitabilidade cortical em animais e humanos. Como recentemente mostrado, a nicotina não apenas estabiliza, mas também influencia a formação da plasticidade glutamatérgica no córtex cerebral humano. Acredita-se que o efeito da NIC na plasticidade seja primariamente determinado pela ativação dos receptores nicotínicos permeáveis aos íons cálcio. A plasticidade glutamatérgica, que é cálcio-dependente, é provavelmente modulada pelo influxo de cálcio gerado pela ativação de receptores nicotínicos neuronais. Nós testamos essa hipótese na plasticidade de longo prazo induzida pela estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC), a qual é abolida por nicotina em indivíduos não fumantes e saudáveis, possivelmente devido a um sobrefluxo celular de cálcio. Nós aplicamos ETCC anódica em 13 indivíduos não fumantes, combinada com adesivos contendo 15 mg de nicotina e um bloqueador de receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), o dextrometorfano (DMO), em 3 diferentes doses (50, 100 and 150 mg) ou placebo. A excitabilidade corticoespinal foi monitorada pelas amplitudes dos potenciais motores evocados (MEP) induzidos pela estimulação magnética transcraniana (EMT) até 36 h após a indução da plasticidade. A NIC suprimiu o aumento da excitabilidade do córtex motor induzido por ETCC anódica, que foi, entretanto, restituída sob a administração da dosagem média de DMO. Em contraste, a baixa dosagem de DMO não afetou o efeito da nicotina na plasticidade induzida por ETCC e a dose mais alta de DMO aboliu a plasticidade. Com a administração de apenas DMO, a dose mais baixa não teve efeito, mas as doses médias e altas aboliram a plasticidade induzida pela ETCC. Esses resultados aprimoraram nosso conhecimento sobre o sugerido impacto da nicotina, dependente de cálcio, na plasticidade e pode ser relevante para o desenvolvimento de novos tratamentos nicotínicos para a disfunção cognitiva.

Palavras-chave: dextrometorfano, estimulação transcraniana por corrente contínua, neuroplasticidade, nicotina, receptores nicotínicos.

Abstract

Nicotine (NIC) alters cognitive functions by modulating neuroplasticity and cortical excitability in animals and humans. It was recently shown that NIC can not only stabilize, but also disrupt formation of glutamatergic plasticity in the human cerebral cortex. The impact of NIC on plasticity is thought to be primarily determined via calcium channel properties of nicotinic receptor subtypes, and glutamatergic plasticity is likewise calcium-dependent. Therefore glutamatergic plasticity is likely modulated by the impact of nicotinic receptor-dependent neuronal calcium influx. We tested this hypothesis for transcranial direct current stimulation (tDCS) -induced long-term potentiation-like plasticity, which is abolished by nicotine in healthy non-smokers, possibly due to calcium overflow. To reduce calcium influx under NIC, we blocked NMDA receptors, which have calcium channel properties. We hypothesized that NMDA receptor block alone will prevent tDCS-induced plasticity, but should re-establish it under nicotine due to reduction of calcium influx. We applied anodal tDCS in 13 healthy non-smokers combined with 15 mg nicotine patches and the NMDA receptor antagonist dextromethorphan (DMO) in three different doses (50, 100 and 150 mg) or placebo medication. Corticospinal excitability was monitored by single-pulse transcranial magnetic stimulation (TMS)-induced motor evoked potential (MEP) amplitudes for up to 36 h after plasticity induction. NIC abolished the anodal tDCS-induced motor cortex excitability enhancement, which was however restituted under the medium dosage of DMO. In contrast, low-dosage DMO did not affect the impact of nicotine on tDCS-induced plasticity and high-dosage DMO abolished plasticity. For DMO alone, the low dosage had no effect, but medium and high dosages abolished tDCS-induced plasticity. These results enhance our knowledge about the proposed calcium-dependent impact of nicotine on plasticity and might be relevant for the development of novel nicotinic treatments for cognitive dysfunction.

Keywords: dextromethorphan, neuroplasticity, nicotine, nicotinic receptors, transcranial direct current stimulation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neuroplasticidade

1.1.1 Plasticidade Sináptica e Modulação Glutamatérgica no Sistema Nervoso Central

Neuroplasticidade pode ser definida como qualquer alteração, duradoura ou mesmo permanente, das propriedades do sistema nervoso, quer sejam elas morfológicas ou funcionais, ao longo do desenvolvimento neuronal ou em resposta a mudanças fisiológicas, alterações do ambiente ou lesões (Donoghue 1995; Citri e Malenka 2008). A plasticidade funcional realizada por mudanças de longa duração no Sistema Nervoso Central (SNC), tal como a potenciação de longa duração (LTP – de *Long-Term Potentiation*) e a depressão de longa duração (LTD – de *Long-Term Depression*), é considerada um mecanismo de formação da memória e do aprendizado (Bliss e Collingridge 1993; Malenka e Bear 2004). Além disso, essa plasticidade está envolvida em doenças neuropsiquiátricas e processos de neuroreabilitação, como a reorganização das redes neurais na esquizofrenia e a reaprendizagem das funções motoras após o acidente vascular cerebral (AVC) (Cramer *et al.* 2011).

A LTP e LTD são processos dependentes de cálcio e podem ser classicamente induzidas pelo influxo de cálcio através da ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) (Malenka e Bear 2004). O NMDAR é um receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico (glutamato), com cinética relativamente lenta, permeável ao Ca^{2+} , em adição ao Na^+ e ao K^+ . O canal contém um sítio de ligação para o Mg^{2+} voltagem dependente, o que torna o canal inativo em repouso, sendo esse íon liberado por despolarização pós-sináptica (Novak 1984). Com a liberação do Mg^{2+} , os NMDARs podem ser ativados pela ação combinada de duas moléculas de glutamato e duas moléculas do co-agonista glicina ou D-serina, permitindo o influxo de Ca^{2+} . A elevada permeabilidade ao Ca^{2+} 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 e Bading 2003).

A LTP e LTD têm sido as formas de plasticidade sináptica mais intensivamente investigadas, principalmente no hipocampo (Bliss e collingridge 1993; Thickbroom 2007) e no neocórtex (Feldman 2009). O principal fator que determina a direção da plasticidade em uma sinapse é a concentração de cálcio pós-sináptica (Lisman 2001). Baixas concentrações de cálcio pós-sinápticas resultam em LTD, enquanto que altas concentrações em LTP, e a uma concentração média não tem efeito algum na plasticidade, uma condição denominada de “terra de ninguém” por alguns autores (Cho *et al.* 2001; Lisman 2001). Concentrações de Ca^{2+} muito altas também podem resultar em nenhuma plasticidade devido à ativação de condutâncias hiperpolarizantes de potássio (Misonou *et al.* 2004). Baixa concentração de cálcio intracelular desencadeia uma cascata de reações intracelulares que conduzem à remoção de receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico - receptores de glutamato do tipo não-NMDA) da membrana sináptica e enfraquecimento da conexão sináptica, resultando em LTD. Em contraste, o influxo elevado de cálcio nos neurônios resulta na ativação do mecanismo oposto, aumentando a inserção de receptores AMPA na membrana subsináptica, resultando em LTP (Cummings *et al.* 1996; Malenka e Bear 2004) (Fig. 1).

Recentemente, protocolos de estimulação cerebral não-invasivos têm sido desenvolvidos, os quais permitem a geração de plasticidade do tipo LTP e LTD em seres humanos (Ziemann *et al.* 2008). A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) induz plasticidade dependente do canal NMDA e de cálcio (Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b, 2004). A estimulação associativa pareada (PAS – de *paired associative stimulation*) é uma outra técnica, glutamatérgica e dependente de cálcio, de estimulação cerebral não invasiva, que induz a plasticidade mais focal com ativação combinada do córtex motor primário e aferentes somatossensoriais (Stefan *et al.* 2000; Wolters *et al.* 2003). O impacto do sistema colinérgico em ambos os tipos de plasticidade foi estudado nos últimos anos no córtex motor humano como sistema modelo.

Explorar os mecanismos de neuroplasticidade em seres humanos é relevante para melhorar o nosso entendimento da fisiologia do cérebro na saúde e na doença, bem

como a compreensão da base neural da aprendizagem e o mecanismo da memória no homem.

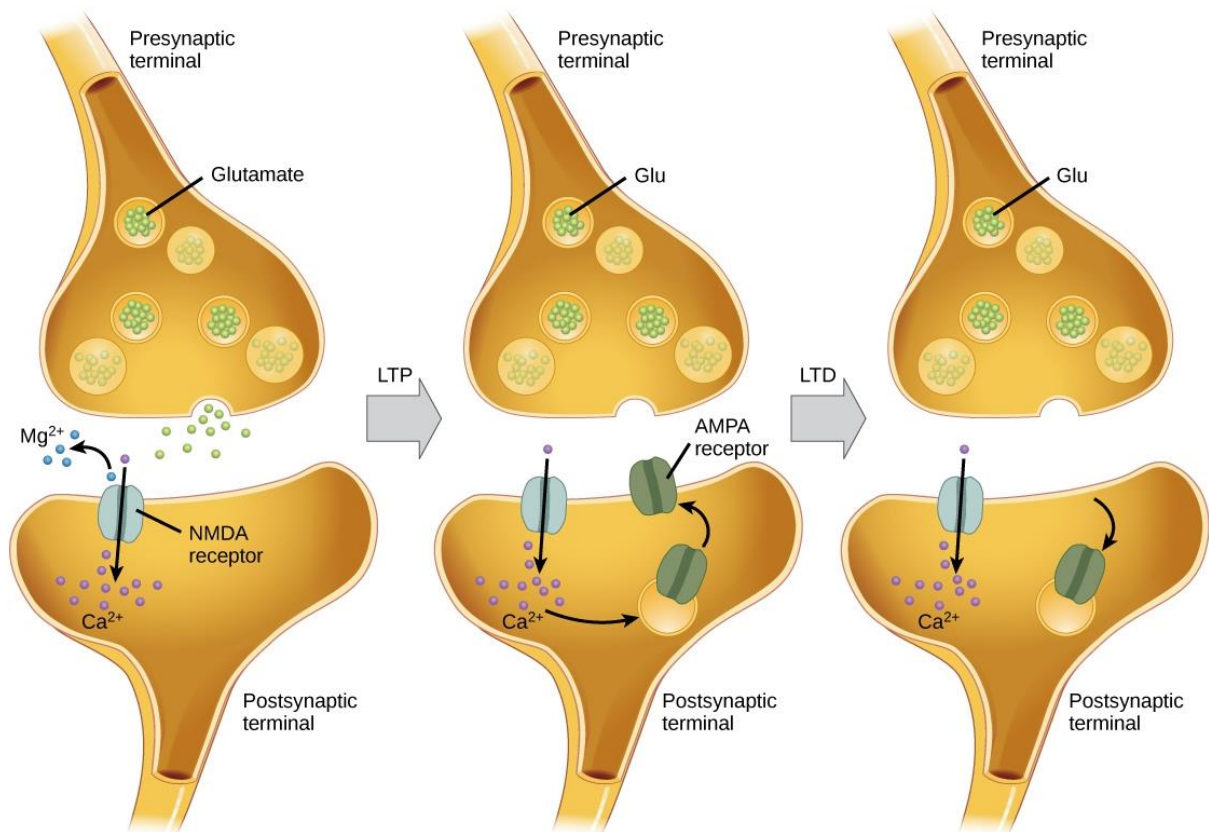


Figura 1. A entrada de cálcio através de receptores pós-sinápticos do tipo NMDA pode iniciar duas diferentes formas de plasticidade sináptica: potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD). LTP surge quando uma única sinapse é repetidamente estimulada. Essa estimulação inicia uma cascata celular dependente de cálcio e CaMKII, o que resulta na inserção de mais receptores AMPA na membrana pós-sináptica. Na próxima vez que glutamato for liberado a partir da célula pré-sináptica, irá ligar-se a ambos os receptores NMDA e recentemente inseridos AMPA, assim, despolarizando a membrana mais eficientemente. LTD ocorre quando algumas moléculas de glutamato se ligam a receptores NMDA na sinapse (devido a uma baixa taxa de disparo do neurônio pré-sináptico). O influxo de cálcio através de receptores NMDA inicia uma outra cascata dependente da proteína fosfatase 1 e calcineurina, o que resulta na endocitose dos receptores AMPA. Isso faz com que o neurônio pós-sináptico fique menos sensível ao glutamato liberado do neurônio pré-sináptico. (Adaptado de Hauser, L. 2013. Derived copy of Biology 102. OpenStax-CNX, 27 de maio de 2015. <http://cnx.org/content/col11541/1.1/>.)

1.1.20 Córtex Motor como Modelo para o Estudo da Plasticidade

O córtex motor primário (M1 ou área 4 de Brodmann) (Fig. 2) é uma região do cérebro humano localizada na porção posterior do lobo frontal, no giro pré-central. Ele funciona em associação com o córtex pré-motor, a área motora suplementar, o córtex parietal posterior e várias outras regiões subcorticais, para planejar e executar movimentos. O córtex motor primário é definido citoarquiteticamente como a região do córtex que contém neurônios grandes, como as células Betz. Essas, junto com outros neurônios corticais, enviam axônios à medula espinhal para fazer sinapses com interneurônios ou diretamente com os neurônios motores alfa, que se conectam com os músculos (Pruszynski *et al.* 2007; Rioult-Pedotti *et al.* 1998b).

Embora tenha sido considerado apenas como uma área de início dos movimentos, a plasticidade do córtex motor primário é bem documentada (Pascual-Leone *et al.* 2005), e, de acordo com estudos recentemente publicados, esta área é mais ativamente envolvida no aprendizado motor e na formação da memória do que se pensava (Rioult-Pedotti *et al.* 2000; Muellbacher *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b). Assim, essa região é bem adequada para o estudo da plasticidade e das interações fisiológicas cognitivas/comportamentais no cérebro humano. Além de as características anatômicas, fisiológicas e as propriedades funcionais serem bem conhecidas, o córtex motor é facilmente alcançado pela estimulação magnética transcraniana (EMT) ou pela ETCC por estar situado na superfície cerebral e os potenciais motores evocados (MEPs) são parâmetros facilmente monitorados para medidas de mudanças da excitabilidade cortical (Rothwell 1993; Ziemann 2004).

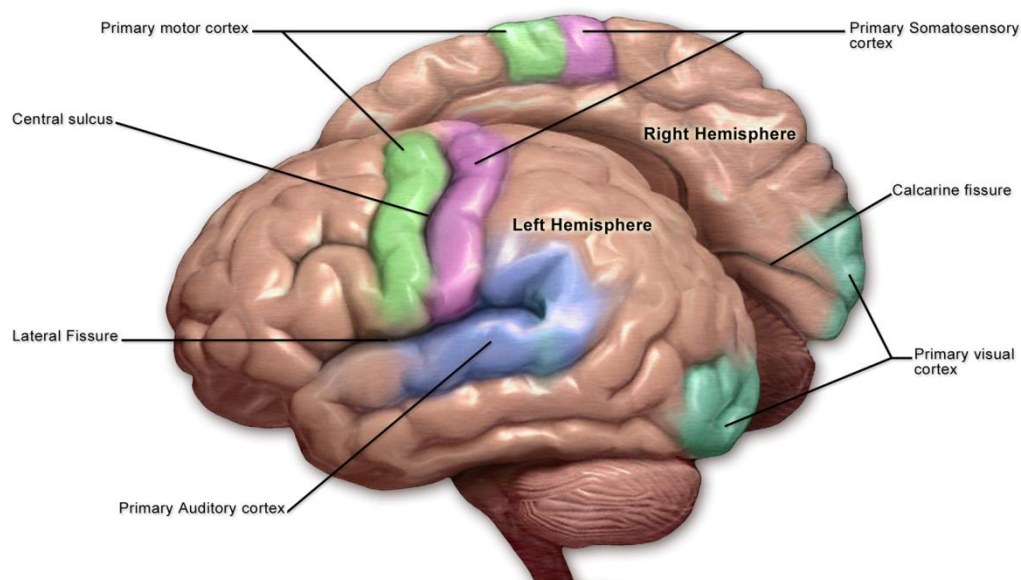


Figura 2. Localização do córtex motor primário. Localiza-se na primeira convulsão do lobo frontal, anterior ao sulco central, sendo o córtex motor primário a principal fonte de projeções dos neurônios motores na medula espinhal e nervo cranial. Além disso, envia axônios à medula espinhal fazendo sinapses com interneurônios ou diretamente com os neurônios motores, os quais se conectam com os músculos.

1.1.3 Estimulação Elétrica no SNC: História do Uso da Corrente Elétrica

Há relatos históricos do uso terapêutico da estimulação elétrica no cérebro, os quais remontam desde a antiguidade, época em que o homem ainda era incapaz de armazenar e descarregar energia elétrica de maneira segura e confiável. Scribonius Largus, médico do imperador romano Claudius (43-48 d.C.), descreveu a aplicação da descarga elétrica do “peixe-torpedo” para aliviar dores de cabeça em seu livro *Compositiones Medicae* (Piccolino 1998; Fregni *et al.* 2011).

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

No século XVIII, ocorreu o desenvolvimento da pilha voltaica e, logo, a possibilidade de geração de eletricidade e seu uso de forma mais sistemática. Grande parte desse desenvolvimento se deu na Itália, tendo como personagens centrais Luigi Galvani e Alessandro Volta (Piccolino 1998; Fregni *et al.* 2011).

Galvani, Professor da Universidade de Bolonha (Itália) e membro da Academia *Delle Scienze*, realizou diversos experimentos sobre eletricidade, sendo boa parte descritos em seu trabalho publicado em 1791: “*De Viribus Electricitatis in Motu Musculari Commentarius*”. Observações importantes foram realizadas em estudos com sapos, mas boa parte de suas interpretações seguiu em uma direção errada. A constatação de Galvani de que o contato de duas estruturas metálicas com o tecido muscular resultava em contração fez com que ele levantasse a hipótese da existência de uma eletricidade animal. A primeira observação foi acidental, um de seus assistentes tocou a ponta de um equipamento no nervo interno da coxa de uma rã e notou uma série de contrações. A partir disso, Galvani começou a alterar as condições experimentais chegando a considerar que as condições atmosféricas fossem capazes de interferir nas questões elétricas envolvidas. Galvani poderia ter seguido na direção de uma hipótese eletrolítica, entretanto ele acreditava existir uma eletricidade animal inerente (Piccolino 1998; Fregni *et al.* 2011).

A hipótese de eletricidade animal foi calorosamente criticada por outro pesquisador italiano de seu tempo: Alessandro Giuseppe Antonio Anastasio Volta. Nascido em Como, na Itália, Volta lecionou Física na Universidade de Pávia. Ele replicou alguns dos estudos de Galvani, entretanto utilizando as mesmas composições metálicas nos dois eletrodos, mas nenhuma resposta com essa montagem foi observada. Segundo Volta, os resultados de Galvani eram dependentes do material utilizado nos eletrodos, e esses sim estavam gerando uma diferença de potencial entre os pólos e subsequente circulação de corrente elétrica – tratava-se de eletrodos metálicos dissimilares, o que gerava entre eles fluxo de elétrons; logo a conclusão seria que, em vez de eletricidade animal, a estrutura que sofria contração poderia ser considerada como um condutor de corrente. Volta seguiu adiante com essa ideia, culminando na elaboração da chamada pilha voltaica (Parent 2004).

O sobrinho de Galvani, Giovanni Aldini, dando continuidade aos trabalhos do tio, mas também considerando as colocações de Volta, realizou estudos importantes com a aplicação de eletricidade em seres humanos e forneceu elementos centrais para o desenvolvimento posterior de aspectos da fisiologia do Sistema Nervoso. Aldini aplicou corrente elétrica inicialmente em cadáveres, observando durante as aplicações, movimentos obviamente involuntários de membros, contrações de face, etc., tais demonstrações impressionaram seus contemporâneos. Além disso, fez ensaios de aplicação de corrente elétrica em pacientes sofrendo de melancolia encontrando resultados importantes nessa modalidade de tratamento. Entretanto, a carga aplicada, localização dos eletrodos, caracterização dos pacientes, entre outros fatores, não eram variáveis bem controladas nessa época (Parent 2004).

1.1.4 Estimulação Cerebral no Século XX

Em contraste com o lento avanço no campo da estimulação cerebral nas primeiras três décadas do século XX, pode-se dizer que a neuromodulação sofreu uma revolução em meados desse século. Surpreendentemente, em apenas 40 anos alguns métodos de estimulação cerebral, tais como a eletroconvulsoterapia, foram descobertos, amplamente utilizados no mundo inteiro e logo rejeitados pela comunidade leiga e científica. Outros métodos, como a estimulação cerebral transcraniana por corrente contínua e alternada, começaram a ser estudados, porém foram ofuscados pelos avanços da psicofarmacologia (Goldring *et al.* 1950).

A aplicação de estimulação por corrente contínua, dentro de um rigor metodológico mais apropriado, pode ser observada em uma série de estudos com animais ainda no século XX. Goldring e O'Leary (1950) apresentaram resultados de diversos experimentos realizados com coelhos. Em um desses experimentos, eles investigaram os efeitos da polarização superficial positiva no potencial de ação. Os autores verificaram que a polarização positiva aplicada na superfície do córtex resultou no desenvolvimento de descargas paroxísticas. Também verificaram que a intensidade da corrente necessária para isso variava de experimento para experimento, sendo encontrada no geral com correntes variando entre 1-3 mA após

polarização de 20-30 segundos. Também observaram uma duração do efeito após o término da estimulação variando de 1 a 2 minutos. Nos casos em que a corrente foi de 0,1-0,5 mA, nenhuma mudança foi observada (Goldring *et al.* 1950).

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

Em um artigo de 1964, Purpura e McMurtry apresentaram resultados obtidos em um estudo com gatos, eles observaram, em células do trato piramidal, os efeitos no disparo espontâneo após aplicação de corrente contínua anódica ou catódica. A densidade de corrente aplicada variou de 30 a 400 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$. Não foi observada atividade convulsiva. Os autores verificaram aumento da atividade neuronal espontânea após passagem de corrente anódica e redução após catódica. Nas situações em que havia ausência de atividade espontânea, foi verificado que a estimulação anódica iniciou descargas fixas de frequência entre 10 e 30 Hz. Essas atividades cessaram quando a estimulação foi interrompida. No caso dos períodos de atividade espontânea de baixa frequência, a estimulação catódica abruptamente silenciou a atividade. Essa atividade reapareceu aproximadamente com a mesma frequência após a interrupção da estimulação com catodo. Os autores verificaram que a estimulação anódica produziu uma despolarização do corpo celular de neurônios piramidais; já a estimulação catódica gerou resultados opostos, produzindo uma hiperpolarização. A despolarização produzida pela polarização positiva inicia disparo, ou aumenta as descargas espontâneas das células piramidais. Além disso, a estimulação anódica inicia oscilações de membrana relativamente de alta frequência e baixa amplitude durante a despolarização (Purpura *et al.* 1964).

1.1.5 Neuromodulação no Século XXI

No campo da estimulação cerebral não invasiva, observou-se, na última década, o ressurgimento da técnica da aplicação de correntes elétricas diretas, de baixa intensidade, através do crânio, sendo muito semelhante à polarização cerebral pesquisada em 1960 e 1970: trata-se da “estimulação transcraniana por corrente contínua”. Em 1998, Priori *et al.* relataram os efeitos da estimulação cerebral por corrente contínua na excitabilidade cortical de 15 voluntários saudáveis. Os pesquisadores utilizaram doses atualmente consideradas ínfimas de corrente elétrica (0,5 mA por menos de 1 minuto). Mesmo assim, foram capazes de demonstrar os efeitos neuromodulatórios da técnica. Em 2000, Nitsche e Paulus aprofundaram os achados do grupo de Priori em uma série de elegantes experimentos, demonstrando de maneira inequívoca que a estimulação cerebral por corrente contínua consegue alterar a excitabilidade cortical e que tais efeitos são dependentes dos parâmetros de aplicação, notadamente a polaridade elétrica – a estimulação anódica aumenta a excitabilidade cortical, enquanto a estimulação catódica diminui (Priori *et al.* 1998; Nitsche e Paulus 2000).

A estimulação de certas áreas do córtex também é estudada para o tratamento da dor neuropática crônica há cerca de 20 anos. Essa técnica consiste na aplicação de eletrodos sobre o córtex motor, o que leva, por meio de uma série de mecanismos ainda não completamente elucidados, à diminuição dos sintomas dolorosos. Mais recentemente, foram realizados estudos testando a técnica para outras condições, tais como distúrbios do movimento, reabilitação pós-acidente vascular cerebral e doença de Parkinson (Liebetanz *et al.* 2002; Boggio *et al.* 2004; Boggio *et al.* 2005).

1.2 Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua

1.2.1 Mecanismos de Ação

A ETCC (Fig. 3) é um processo contínuo de condução ôhmica, aplicada com correntes de intensidade constante, invariáveis com o tempo, com aumento gradual, apenas no início da estimulação, até o valor ideal (Wagner *et al.* 2007). A técnica de ETCC envolve a aplicação de correntes elétricas de baixa intensidade (0,5-2 mA), diretamente sobre o escalpo intacto, por um período pré-estipulado de tempo (5-30 min) (Priori 2003). A estimulação é fornecida por um par de eletrodos de 3,5 a 35 cm², conectados a um estimulador que gera um campo elétrico indolor e modulador da atividade neuronal, de acordo com os parâmetros escolhidos na aplicação (Wagner *et al.* 2007; Brunoni *et al.* 2012).

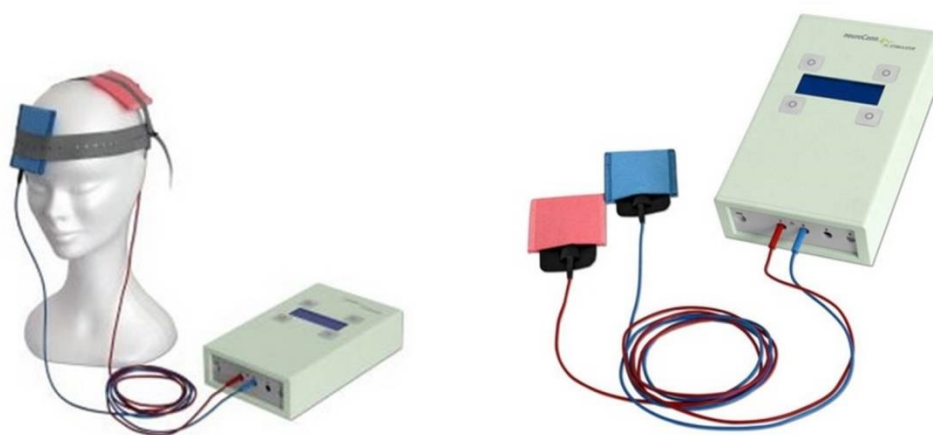


Figura 3. Foto ilustrativa da técnica de Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) por meio de um par de eletrodos (catodo e anodo), conectados a um estimulador de corrente elétrica.

Os eletrodos específicos para a ETCC podem ser encontrados comercialmente, mas esponjas cobertas com gel condutor ou embebidas com solução salina também podem ser utilizadas. No circuito elétrico uma fonte de corrente direta é colocada em

série com os eletrodos e um potenciômetro, a fim de ajustar a corrente constante (Wagner *et al.* 2007).

A ETCC altera o potencial da membrana neuronal, polarizando-a, mas não é suficiente para provocar potenciais de ação. A ETCC catódica reduz as taxas de disparo neuronal espontâneo enquanto a anódica tem o efeito oposto. A ETCC não induz potenciais de ação, apenas 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. 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 (Nitsche e Paulus 2000, 2001; Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003a).

Em 2002, Liebetanz *et al.* estudaram os efeitos da ETCC aplicada no córtex motor em condição anódica ou catódica e de que maneira a administração de bloqueador de canais de sódio dependentes de voltagem (carbamazepina) ou de antagonista de receptor NMDA (dextrometorfano) interferem nos efeitos observados. Como em outros estudos, os autores observaram que a ETCC anódica resultou em aumento da excitabilidade cortical e ETCC catódica em diminuição. Entretanto, a administração de dextrometorfano suprimiu os efeitos pós-estimulação, usualmente observados (Liebetanz *et al.* 2002).

No ano seguinte, Nitsche *et al.* deram continuidade a esse estudo. Investigaram os efeitos da ETCC quando aplicada em conjunto com a carbamazepina ou o dextrometorfano, além de estudarem os efeitos da flunarizina, um bloqueador de canais de cálcio, observando a importância de outros canais iônicos nos mecanismos de ação da ETCC. A relação da ETCC com os canais de cálcio ficou em evidência após se verificar um aumento nos níveis de cálcio intracelular pós-estimulação anódica, além do que já era conhecida a participação do cálcio nos processos de liberação de neurotransmissores. Já no caso de efeitos após a estimulação, os resultados em relação ao bloqueio de receptores NMDA foram para outra direção. O bloqueio desses receptores interferiu tanto no aumento da excitabilidade cortical quanto na redução promovida pela ETCC catódica. Os

autores consideraram que tais resultados mostravam a importância que esses receptores devem ter na promoção dos efeitos a longo prazo, principalmente quando se considera o crescente conhecimento sobre o envolvimento de receptores NMDA em mecanismos de plasticidade cortical, como potenciação ou depressão de longo prazo (Nitsche *et al.* 2003b).

Já em 2004, Lang *et al.* investigaram os efeitos da ETCC anódica ou catódica quando aplicada em conjunto com a administração de D-Cicloserina, um agonista parcial de receptores NMDA. Os autores observaram uma potencialização dos efeitos de aumento da excitabilidade cortical induzida pela ETCC anódica. Considerando esses mecanismos de neuroplasticidade como centrais em processos de aprendizagem e memória, a ETCC aparece como uma interessante ferramenta de pesquisa nas áreas de neurociência e reabilitação neuropsicológica (Lang *et al.* 2004).

1.2.2 Funções Motoras

Em 2000, Nitsche e Paulus iniciaram uma série de publicações a respeito da aplicação de ETCC no córtex motor. Eles investigaram os efeitos da ETCC na modulação da excitabilidade cortical e a sua mensuração se deu com a análise de potenciais motores evocados (MEPs) produzidos com o uso da EMT no córtex motor. Os autores verificaram aumento na excitabilidade após a ETCC anódica e diminuição após a ETCC catódica. Além disso, observaram que os efeitos não ficaram restritos ao momento da aplicação, durando até 5 minutos após a interrupção da aplicação da corrente. Por fim, a variação da intensidade de corrente e da duração da aplicação interferiram na variação da excitabilidade e da duração dos efeitos pós-estimulação (Nitsche e Paulus 2000).

No ano seguinte, em 2001, os mesmos autores demonstraram a manutenção das mudanças de excitabilidade cortical produzidas pela estimulação mesmo após o seu término. Nesse estudo, os autores mostraram que a ETCC poderia produzir

aumento na excitabilidade cortical motora de aproximadamente 150%, com duração de até 90 minutos após o término da aplicação (Nitsche e Paulus 2001).

Já em 2003, Liebetanz, Nitsche e Paulus investigaram o impacto da ETCC anódica em tarefa de tempo de reação envolvendo aprendizado motor implícito. Eles estimularam em momentos diferentes as áreas relativas ao córtex motor primário, pré-motor e pré-frontal. Esses pesquisadores observaram melhora no desempenho após a ETCC na área motora primária, mas não nas outras áreas. Com esse estudo, passou-se a considerar a possibilidade de inserção dessa técnica de estimulação em áreas de reabilitação e facilitação de aprendizado de funções motoras. Ainda no mesmo ano, investigaram o impacto da ETCC catódica como técnica de redução dos padrões de excitabilidade cortical. A estimulação foi na área M1 e a duração das aplicações variou entre cinco e nove minutos. Eles observaram que a ETCC catódica de 5 a 7 minutos resultou em redução da excitabilidade cortical com efeitos pós-estímulo de alguns minutos. Já a ETCC catódica de 9 minutos resultou também em redução da excitabilidade cortical, mas com duração de até uma hora após o término da aplicação. A importância desses resultados abriu a possibilidade do uso dessa técnica de estimulação como ferramenta terapêutica em disfunções que têm, entre suas características, padrões elevados de excitabilidade cortical como, por exemplo, epilepsia, enxaqueca e distonia (Nitsche *et al.* 2003a).

Em 2005, Hummel *et al.* investigaram o impacto da ETCC no funcionamento motor de pacientes que sofreram AVC. Eles investigaram o desempenho motor da mão parética pelo teste de Jebsen-Taylor. A estimulação se deu pela aplicação do anodo em área motora primária do hemisfério lesionado e foi comparada com estimulação placebo. Como resultados, observaram que a ETCC anódica produziu um aumento significativo no desempenho motor de todos os pacientes. Além disso, através de estimulação magnética transcraniana, os autores investigaram o padrão de excitabilidade cortical verificando que o aumento no desempenho motor se correlacionou com um aumento na excitabilidade (Hummel *et al.* 2005).

Por fim, em 2006, Vines, Nair e Schlaug investigaram os efeitos da ETCC tanto no membro contralateral quanto no ipsilateral em relação ao hemisfério estimulado. Os autores aplicaram ETCC anódica ou catódica na área M1. Os resultados indicaram que a ETCC anódica facilitou o desempenho do membro contralateral e a ETCC catódica facilitou o desempenho do membro ipsilateral. Dessa forma, verificou-se que a estimulação cerebral pode ter seus efeitos pela aplicação direta na região motora investigada ou, também, por mecanismos indiretos via modulação da atividade da região homóloga do hemisfério oposto. Eles concluíram que tais resultados estão relacionados ao papel da inibição interhemisférica no funcionamento cortico-motor (Vines *et al.* 2006).

1.2.3 Aspectos Técnicos da ETCC

1.2.3.1 O Equipamento

O equipamento utilizado para gerar corrente contínua é constituído basicamente por quatro componentes principais: eletrodos (anodo e catodo), amperímetro (medidor de intensidade de corrente elétrica), potenciômetro (componente que permite a manipulação da intensidade da corrente) e um jogo de baterias para gerar a corrente aplicada (Fig. 4). A fonte de energia elétrica é obtida através da associação em série de 3 baterias de 9 volts resultando em uma tensão total de 27 volts. Esta tensão é aplicada nos extremos de um potenciômetro (reostato) com resistência igual a 100 kOhms. A função do potenciômetro é de possibilitar uma tensão ajustável variando de 0 até 27 volts. 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.

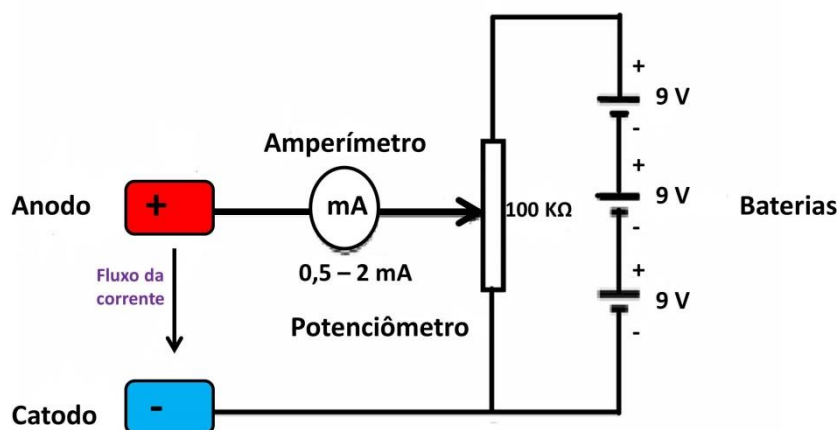


Figura 4. Circuito elétrico básico do equipamento ETCC.

1.2.3.2 Parâmetros de Segurança na Aplicação da ETCC

Até o presente momento, nenhuma pesquisa apresentou dados de efeitos colaterais produzidos pela ETCC (Brunoni *et al.* 2012; Fresnoza *et al.* 2014; Grundey *et al.* 2015; Batsikadze *et al.* 2015). 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). Entretanto, critérios sobre a utilização de corrente contínua aplicada sobre o escalpe devem ser investigados e utilizados para garantir a segurança da aplicação (Nitsche *et al.* 2003c), tais como:

- 1) Intensidade de corrente aplicada: i (mA);
- 2) Duração da sessão de estimulação: t (seg);
- 3) Tamanho do eletrodo: A (cm²);
- 4) Densidade da corrente: i/A (mA/cm²);
- 5) Carga total aplicada: $(i/A) \cdot t$.

Segundo McCreery, no que tange à ETCC, um bom parâmetro para verificar a segurança da técnica é a densidade da corrente. Em estudos com animais, densidades da corrente inferiores a 25 mA/cm² não são capazes de induzir lesões no tecido cerebral, mesmo quando aplicadas por horas e com frequências altas. Nos

protocolos atuais de ETCC, o valor da densidade da corrente varia de 0,02857 (para $i = 1$ mA e eletrodo de 35 cm^2) a 0,05714 (para $i = 2$ mA e eletrodo de 35 cm^2) ficando, portanto, muito abaixo dos valores recomendados (875 e 437,5 vezes inferior, respectivamente). Além disso, em função dos protocolos também utilizarem a duração da sessão como variável, a carga total aplicada por sessão deve ser considerada. Em 1981, Yuen *et al.* observaram lesão no tecido cerebral a partir de 216 C/cm^2 de carga total. Se considerarmos tempo de sessão de 30 minutos, $i = 2$ mA e eletrodo de 35 cm^2 a carga total aplicada será de $0,103 \text{ C/cm}^2$, ou seja, 2100 vezes abaixo do valor observado por Yuen *et al.* em 1981 (Nitsche *et al.* 2003).

Estudos detalhados para avaliar a segurança da ETCC não encontraram nenhuma evidência de dano neuronal avaliado pela dosagem da enolase sérica neurônio-específica (Nitsche e Paulus 2001; Nitsche *et al.* 2003c), edema, perturbações na barreira hematoencefálica ou alterações cerebrais detectáveis pela ressonância magnética por imagem (Nitsche *et al.* 2004), ou efeitos autonômicos considerados clinicamente significativos (Raimundo *et al.* 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).

Entre os critérios de exclusão para a estimulação cerebral não invasiva cita-se a presença de condições médicas que podem ser agravadas com a estimulação, como em casos de epilepsia não controlada, embora convulsões epiléticas não tenham sido observadas num estudo piloto em pacientes com epilepsia (Fregni *et al.* 2006). Além disso, os indivíduos não devem possuir implantes metálicos cerebrais (Brunoni *et al.* 2012).

1.3 EMT

1.3.1 Mecanismos de Funcionamento e Ação

O aparelho de EMT é composto por uma unidade fixa e uma móvel. A unidade fixa contém um ou mais capacitores de armazenamento, um alternador de carga e circuitos para modelar a forma do pulso e a recuperação de energia, além do painel de controle. A parte móvel é composta pela bobina e pelo cabo que a conecta à parte fixa. É necessário que o aparelho contenha capacitores com grande capacidade de armazenamento e sistema eficiente de transmissão para a bobina. Existem dois tipos de bobinas usualmente utilizadas: em forma de 8 ou também chamada borboleta e a bobina circular (Fig. 5). A bobina em forma de 8 é a mais focal, enquanto a circular é a mais utilizada quando se deseja estimular uma área maior (Walsh e Pascual-Leone 2003). Outras bobinas como a bobina em H e a em cone vêm sendo testadas para aumentar a profundidade da estimulação.

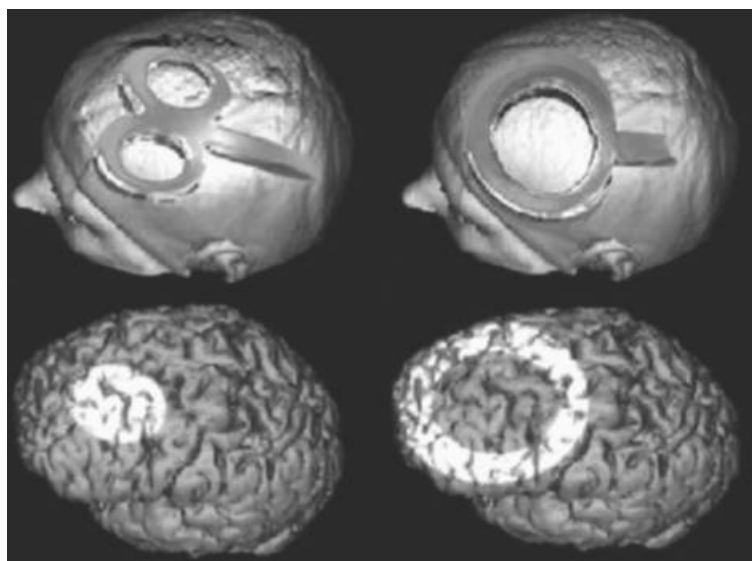


Figura 5. Representação das diferentes regiões cerebrais estimuladas por EMT aplicada na mesma posição, quando utilizadas bobinas de forma circular ou em forma de oito.

Quando a energia elétrica, que está armazenada nos capacitores, é liberada, ela gera corrente elétrica, que passa rapidamente pela bobina, configurando um pulso, o qual deve ser de alta intensidade e de breve duração. Em relação ao tipo de pulso, existem três diferentes: monofásico, bifásico e polifásico. O pulso monofásico é o ideal para aplicações do tipo pulso simples, sendo o bifásico melhor para pulsos repetitivos. A duração do pulso monofásico é de cerca de 600 ms, e do bifásico, de 200-300 ms. A energia dispensada na bobina é de cerca de 500 J, suficiente para arremessar um peso de 1 Kg à altura de 50 m. A bobina deve estar posicionada paralelamente ao crânio do indivíduo (Fig. 6), assim, no momento do disparo, surge um campo magnético perpendicularmente à bobina, que usualmente é da ordem de 1,5 a 2 T (40.000 vezes o campo magnético da Terra e aproximadamente da mesma intensidade do campo magnético estático produzido por um aparelho de ressonância magnética), o qual irá atravessar o escalpe e o crânio atingindo o tecido cortical. É importante notar que a variação em relação ao tempo do campo magnético é mais importante do que a intensidade por si só.



Figura 6. Foto representativa da EMT. A posição ideal da bobina para a estimulação do córtex motor primário deve ser em um ângulo de 45° em relação ao plano parasagital, nesse caso se obtém a maior intensidade da corrente elétrica induzida.

Embora não seja consenso, com pequenas diferenças baseadas em modelos matemáticos, pode-se dizer que esse campo magnético alcança uma profundidade

de 2 a 3 cm. Para bobinas em forma de 8, a 0,5 cm abaixo da bobina, a área estimulada é de 7 X 6 cm e a 2 cm abaixo é de 3 X 4 cm, o que dá uma ideia tridimensional de um cone com seu ápice para baixo (Walsh e Pascual-Leone 2003). Esse campo eletromagnético, através da indução de cargas elétricas no parênquima cerebral (indução eletromagnética – lei de Faraday), transforma-se em campo elétrico no córtex com sentido oposto ao produzido na bobina e paralelo a ela. Por isso, a EMT atinge preferencialmente neurônios dispostos horizontalmente, usualmente os interneurônios da substância cinzenta (Wassermann *et al.* 2008; Fregni *et al.* 2011).

A estimulação elétrica cerebral, de forma diferente, produz corrente elétrica transversal, estimulando diretamente neurônios piramidais na substância branca (dispostos verticalmente). Podemos observar essa diferença através do tempo de latência dos potenciais motores evocados (MEP), que é cerca de 2 ms maior com a EMT em relação à estimulação elétrica. A força do campo elétrico, na prática, deve ser de 100 mV/mm para estimulação eficiente do córtex motor e consequente contração muscular, induzindo corrente elétrica no tecido cerebral de cerca de 10 mA/cm². É importante reafirmar que os efeitos obtidos com o uso da EMT não são devidos ao campo magnético, mas sim ao campo elétrico que leva à despolarização do neurônio, movimentando a carga através da membrana neuronal excitável, o que acaba por criar um potencial transmembrana que, se de intensidade suficiente, causa despolarização e inicia o potencial de ação que se propaga pelo nervo. A EMT não envolve passagem direta da corrente elétrica pelo corpo celular como na estimulação elétrica, entretanto, em nível celular os mecanismos de estimulação são os mesmos. Em outras palavras, a estimulação magnética deve ser imaginada como estimulação elétrica sem eletrodos (Wassermann *et al.* 2008).

Os efeitos da EMT não são apenas na área cortical atingida diretamente pelo campo magnético, mas uma série de circuitos e conexões cerebrais se encarregam de levá-los a áreas distantes do cérebro. A EMT pode ser de pulsos únicos ou repetitivos; nesse último caso, são emitidos vários pulsos seguidamente de acordo com a frequência determinada, passando a ser denominada estimulação magnética transcraniana repetitiva (EMTr). Em relação ao número de pulsos repetitivos por unidade de tempo, existem dois tipos de EMTr: baixa frequência (≤ 1 Hz) e alta

frequência (> 1Hz), com efeitos opostos. O uso da EMTr de alta frequência aumenta o fluxo sanguíneo cerebral na área, medido através de PET, com consequente aumento da atividade cerebral. A EMTr de baixa frequência, por outro lado, diminui a atividade cerebral (Wassermann *et al.* 2008).

Durante a aplicação, o ângulo da bobina é um parâmetro importante. Por exemplo, para a estimulação do córtex motor primário, ela deve ser posicionada em um ângulo de 45° em relação ao plano parasagital para se obter a maior intensidade da corrente elétrica induzida no córtex cerebral (Fregni *et al.* 2011).

1.3.2 Aspectos Técnicos da EMT

1.3.2.1 Aquecimento da Bobina

A EMT rápida com bobina convencional e centenas de joules por pulso rapidamente resulta em aquecimento da bobina. Sistemas de refrigeração são geralmente necessários em bobinas utilizadas em estimulação prolongada de alta velocidade, embora aumentem substancialmente seu peso e volume. A água tem um alto calor específico e é um refrigerante eficaz, mas também pode ser perigosa se utilizada em EMT com altas tensões. As flutuações de temperatura e outros tipos de estresse associados com o uso da bobina podem, eventualmente, quebrar o invólucro da bobina, levando a água a ter contacto com os componentes de alta tensão e com o ambiente externo. Óleo tem sido proposto como um fluido de arrefecimento mais seguro, mas tem um calor específico muito mais baixo, exigindo a circulação mais rápida. Ar em movimento parece ser o refrigerante mais simples e mais seguro para bobinas de EMT, mas a circulação é barulhenta e os sistemas necessários para seu funcionamento são grandes. Bobinas que são vulneráveis ao superaquecimento devem ter um sensor de calor interno que desligue o sistema se a temperatura subir muito (41 °C) (Wassermann *et al.* 2008).

1.3.2.2 Parâmetros de Segurança na Aplicação da EMT

Uma força tarefa da Organização Mundial de Saúde, em 1987, relatou que não existem evidências de efeitos adversos na saúde humana em decorrência à exposição a curto prazo a campos magnéticos estáticos com intensidade de até 2T. O campo magnético produzido pela EMT (intensidade de 1,5 a 2T) é de pulsos breves e não há razão para se supor que os efeitos magnéticos devam ser maiores com esse tipo de campo magnético (pulsado) do que com um campo estático (Hallett e Chokroverty 2005).

O efeito colateral mais comum da EMT é a cefaléia, que costuma ser transitória e cede com analgésicos comuns. Também pode ocorrer tensão muscular em musculatura próxima à aplicação e na nuca (Fregni *et al.* 2011). Diversos estudos com ratos, utilizando um número de pulsos e intensidade de campo magnético maiores do que os utilizados habitualmente em seres humanos falharam em demonstrar qualquer efeito colateral grave, alterações histológicas ou da barreira hematoencefálica com uso da EMTr (Wassermann *et al.* 2008). Dois pacientes epiléticos que seriam operados receberam, no lobo temporal, estímulos a 50 Hz com densidade de corrente muito acima da que os aparelhos usuais utilizados nas pesquisas com EMTr produzem, antes da ressecção. À microscopia, nenhuma lesão histológica foi observada (Brasil-Neto *et al.* 2004; Wassermann *et al.* 2008).

Dezesseis casos de crises convulsivas foram descritos na literatura médica com o uso da EMTr, sendo que nenhum desses indivíduos apresentou sequelas e na maioria o eletroencefalograma retornou ao normal em 1 a 2 dias (Brasil-Neto *et al.* 2004). A maior parte das crises foram desencadeadas com EMTr de alta frequência. Não há descrição da EMTr piorando a epilepsia, pelo contrário, estudos com EMTr de baixa frequência em epiléticos têm demonstrado potencial terapêutico dessa técnica (Walsh e Pascual-Leone 2003).

Após a aplicação de EMTr em animais, esses desenvolveram aumento permanente no limiar auditivo. Em humanos, entretanto, em 2003 Pascual-Leone *et al.* demonstraram não haver perda auditiva após a aplicação de EMTr. Aumento no

número de linfócitos foi observado após EMT de pulso único, entretanto, esse aumento terminava em 48 horas e era comparável ao que ocorre no ciclo menstrual e ritmo circadiano normal (Walsh e Pascual-Leone 2003; Wassermann *et al.* 2008; Fregni *et al.* 2011).

Pascual-Leone *et al.*, em 1992, mensuraram os níveis séricos de prolactina, hormônio estimulante da tireoide, hormônio luteinizante, hormônio folículo-estimulante e hormônio adrenocorticotrófico, não observando alterações após aplicação de EMTr. Ainda no mesmo ano, em relação aos possíveis efeitos na cognição, esses autores também aplicaram bateria de testes cognitivos em nove voluntários antes e após a aplicação de EMTr com diversas intensidades e frequências, não observando nenhum prejuízo cognitivo ou alteração no exame clínico-neurológico.

1.4 Neuromoduladores

Neuromoduladores são transmissores que podem alterar a plasticidade, mas não são essenciais para a sua ocorrência (Malenka e Bear 2004). Eles induzem pouca ou nenhuma alteração na atividade neuronal basal, mas potencializam ou atenuam respostas evocadas por outras substâncias transmissoras (Barchas *et al.* 1978).

Estudos recentes sugerem que a plasticidade sináptica nem sempre depende apenas da atividade neuronal pré e pós-sináptica, mas também da presença de neuromoduladores (Malenka e Bear 2004). Ao contrário de sinapses químicas clássicas, em que o neurônio pré-sináptico afeta diretamente a célula alvo, as sinapses neuromoduladoras regulam populações neuronais relativamente grandes e acredita-se serem importantes para a aprendizagem e a memória. Foi mostrado que neuromoduladores influenciam LTP, bem como LTD em animais e em experiências com cortes histológicos de uma maneira não-linear (Kojic *et al.* 1997; Fujii *et al.* 2000; Matsuyama *et al.* 2000; Fujii e Sumikawa 2001b; Mori *et al.* 2001; Huang *et al.* 2004b; Ge e Dani 2005; Kemp e Manahan-Vaughan 2005; Huang e Kandel 2007; Luo *et al.* 2008; Costa *et al.* 2012; Park *et al.* 2012; Batsikadze *et al.* 2013,2014).

Estudos em humanos e animais têm demonstrado um impacto das substâncias neuromoduladoras sobre os processos cognitivos, funções motoras, aprendizagem motora, atenção, memórias de trabalho e episódicas. Além disso, vários distúrbios neurológicos mostram níveis alterados de neuromoduladores que normalmente levam a falhas em funções cognitivas (doença de Parkinson, esquizofrenia, doença de Alzheimer, demência do corpo de Lewy, depressão, etc), cuja base fisiológica pode ser do impacto dos neuromoduladores sobre a plasticidade (Provost e Woodward 1991; Knecht *et al.* 2004; Winters e Bussey 2005; Floel *et al.* 2008; Heishman *et al.* 2010; Mocking *et al.* 2012; Batsikadze *et al.* 2013,2014).

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 e Nitsche 2011) e a investigação dos seus efeitos nos diferentes tipos de plasticidade pode ser conduzida por agentes farmacológicos ou técnicas não-invasivas de estimulação cerebral (Kuo *et al.* 2007; Kuo *et al.* 2008; Monte-Silva *et al.* 2009; Nitsche *et al.* 2009; Monte-Silva *et al.* 2010b; Thirugnanasambandam *et al.* 2012). Por exemplo, a ativação colinérgica inespecífica (receptores muscarínicos e nicotínicos) pelo inibidor da colinesterase rivastigmina, bem como a ativação dos receptores nicotínicos pela administração de nicotina, aboliu a plasticidade do tipo LTP induzida pela ETCC anódica (Kuo *et al.* 2007; Thirugnanasambandam *et al.* 2011).

1.4.1 Nicotina

O sistema colinérgico está envolvido em atenção, memória de curto prazo, estimulação e percepção sensorial (Provost e Woodward 1991; Hahn e Stolerman 2002; Kumari *et al.* 2003; Jubelt *et al.* 2008; Heishman *et al.* 2010). Estados patológicos do sistema colinérgico são observados em esquizofrenia e na doença de Alzheimer (Jones *et al.* 1992; White e Levin 1999). A modulação colinérgica é realizada por meio de dois tipos de receptores: receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) e muscarínicos (mAChR). Os nAChRs são canais catiônicos dependentes

de ligantes que são ativados por acetilcolina e nicotina, não seletivamente (Burnashev 1998; Dajas-Bailador e Wonnacott 2004).

A nicotina (NIC), um composto de amina terciária, é o principal agente psicoactivo do tabaco e é responsável por suas propriedades aditivas (Heishman *et al.* 1994;. Levin *et al.* 2006). Além de sua propriedade aditiva, a nicotina tem efeitos importantes sobre a cognição (Grundey *et al.* 2012a, 2012b). Estudos em animais e humanos têm mostrado que a nicotina aumenta a aquisição, consolidação, e recuperação da informação memorizada (Arendash *et al.* 1995a; Puma *et al.* 1999; Levin *et al.* 2006), bem como melhora a atenção, funções motoras, memória de trabalho e episódica (Min *et al.* 2001; Hahn e Stolerman 2002; Kumari *et al.* 2003; jubelt *et al.* 2008;. Froeliger *et al.* 2009; Heishman *et al.* 2010). A nicotina também melhora a aprendizagem e atenção em pacientes que sofrem de doença de Alzheimer (Wilson *et al.* 1995; White e Levin 1999).

Os receptores nicotínicos formam uma família heterogênea de canais iônicos (receptores ionotrópicos), os quais são encontrados em várias regiões do SNC, e modulam os efeitos de uma grande variedade de transmissores químicos – como dopamina, serotonina, norepinefrina, glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), opióides, assim como do próprio sistema colinérgico por mecanismos pós e pré-sinápticos (Levin e Simon 1998; Gotti e Clementi 2004) – os quais estão envolvidos na geração e modulação da plasticidade, que se acredita ser o principal fundamento fisiológico da aprendizagem e da formação da memória (Riult-Pedotti *et al.* 1998, 2000). A base molecular para a heterogeneidade funcional de nAChRs é a existência de uma família de genes que codifica, pelo menos, nove subunidades α " α_2 - α_{10} " e três β " β_2 - β_4 " (Gotti e Clementi 2004).

Ambos os receptores nicotínicos $\alpha_4\beta_2$ e α_7 , que são canais de cátions, parecem ser críticos para os efeitos funcionais da nicotina, bem como para seu impacto sobre a excitabilidade cortical e neuroplasticidade (Burnashev 1998; Dajas-Bailador e Wonnacott 2004). Esses receptores, que são amplamente expressos no SNC, influenciam a plasticidade sináptica e a função cognitiva por regulação da permeabilidade celular de cálcio, bem como da liberação de neurotransmissores (Lisman 2001; Gotti e Clementi 2004; Browne *et al.* 2010; Huang *et al.* 2010).

1.4.2 Dextrometorfano

Dextrometorfano (D-3-metoxi-N-metilmorfina – DMO) é o D-isômero do análogo da codeína, metorfano. Os sítios de ligação nos quais se liga o DMO com alta afinidade foram identificados em membranas de várias regiões cerebrais. Embora seja conhecido por ser bloqueador de receptor NMDA, os sítios de ligação para essa substância não estão limitadas à distribuição conhecida dos receptores NMDA (Brunton *et al.* 2012).

O DMO já é utilizado como antitussígeno há mais de 40 anos (Bem e Peck 1992), e está amplamente disponível no Brasil nas formas de Trimedal Tosse (Novartis) ou Benalet TSC (Johnson & Johnson), bem como pode ser encontrado na Alemanha na forma de pastilhas ou cápsulas Hustenstiller-ratiopharm (Ratiopharm). Os primeiros casos documentados de uso abusivo dessa droga ocorreram em meados dos anos 1960 nos Estados Unidos e em vários outros países (Bem e Peck 1992). Ao longo dos últimos 10 anos houve um brutal crescimento do número de casos de doses excessivas de DMO, com efeito recreativo, confirmados por pesquisas e dados epidemiológicos por todo o mundo (Ziaee *et al.* 2005; Banken e Foster 2008; Romanelli e Smith 2009; Forrester 2011; Wilson *et al.* 2011). O uso abusivo, como forma de recreação, por vezes referido como “Dexing” ou “Robotripping” parece ser mais frequente em adolescentes e adultos jovens (Boyer 2004; Bobo *et al.* 2005; Bryner *et al.* 2006).

Estudos *in vitro* sugerem que o mecanismo principal de ação do DMO é o bloqueio do receptor NMDA (Church 1990; Church *et al.* 1994), similar ao mecanismo da fenciclidina (Morris *et al.* 2005; Newell *et al.* 2007) e da ketamina (Sinner e Graf 2008). Esses estudos são consistentes com estudos sobre ligantes, os quais mostram que o DMO inibe a ligação da fenciclidina nas membranas sinápticas em cérebros de roedores (Murray e Leid 1984). Para o DMO, o pico de concentração no plasma ocorre após 2 horas da administração oral (Silvasti *et al.* 1987; Schadel *et al.* 1995), e as doses utilizadas nesta pesquisa são suficientes para induzir proeminentes efeitos no SNC (Ziemann *et al.* 1998; Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b; Monte-Silva *et al.* 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo foi elucidar o mecanismo pelo qual a ativação de receptores nicotínicos altera a neuroplasticidade em seres humanos, especialmente no que diz respeito aos mecanismos dependentes do cálcio e a interação com o sistema glutamatérgico.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar se a redução do influxo de cálcio provocada pelo DMO restituiria o aumento da excitabilidade induzida pela ETCC, suprimida pela nicotina.

Verificar os efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua anódica, indutora de plasticidade LTP não focal, sob os efeitos da administração prévia de nicotina e do dextrometorfano, assim como pela combinação dessas substâncias.

Verificar se o bloqueio de receptores NMDA em diferentes graus teria efeitos não lineares sobre a plasticidade induzida pela ETCC anódica: pequenas e médias dosagens de DMO deveriam restabelecer a plasticidade facilitadora sob nicotina, devido a uma diminuição gradual do influxo de cálcio, enquanto que alta dosagem de DMO deveria suprimir a plasticidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Treze voluntários saudáveis (5 masculinos / 8 femininos) com idade média de $26,4 \pm 4,0$ (DP) anos foram recrutados. Nenhum deles havia fumado tabaco por pelo menos 3 anos antes do estudo ou estava fazendo uso de qualquer tipo de medicação. Todos os selecionados eram destros de acordo com *Edinburgh handedness inventory* (Oldfield 1971). Indivíduos que tivessem algum metal no cérebro ou crânio (lascas, fragmentos, pinos, etc.), história de epilepsia, desordem neuropsiquiátrica, traumatismo craniano grave ou gravidez foram excluídos. Todos os voluntários assinaram documento consentindo a participação. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade de Goettingen e estava em conformidade com a Declaração de Helsinki.

3.2 ETCC

Foi utilizado um estimulador de corrente contínua movido a bateria (*Schneider Electronics*, Gleichen, Alemanha), com uma potência máxima de 2 mA. A ETCC foi administrada através de eletrodos cobertos por esponjas embebidas em solução salina ($7 \times 5 \text{ cm} = 35 \text{ cm}^2$). Um eletrodo (ânodo) foi posicionado na região representativa do córtex motor do músculo abductor do dedo mínimo direito (MADM), o outro eletrodo (catodo) acima da órbita direita. Todos os sujeitos receberam 1 mA de estimulação anódica durante 13 minutos (ETCC anódica), o que induz alterações na excitabilidade do córtex motor com durabilidade de aproximadamente 60 min após o término da estimulação (Nitsche e Paulus 2001; Nitsche *et al.* 2003a), combinado com nicotina, dextrometorfano ou o respectivo placebo em diferentes sessões experimentais.

3.3 Monitoramento da Excitabilidade do Córtex Motor

Potenciais Motores Evocados (MEPs) induzidos por Estimulação magnética transcraniana (EMT) foram registrados para medir as mudanças de excitabilidade da

área motora cortical representacional do MADM direito. EMT de pulso simples foi conduzida por um estimulador magnético 200 Magstim (*Magstim Company*, Whitland, Dyfed, Reino Unido) a uma frequência de 0,25 Hz, com uma bobina em forma de oito (diâmetro de enrolamento de 70 mm, campo magnético máximo, 2,2 T). A bobina foi apoiada de forma tangencial com o couro cabeludo em um ângulo de 45° em relação ao plano sagital com o cabo da bobina apontando lateralmente. A posição ótima foi definida como o local onde a estimulação resultou consistentemente em maiores MEPs. A eletromiografia de superfície foi gravada a partir do MADM direito com eletrodos de Ag-AgCl em uma montagem ventre-tendão. Os sinais foram amplificados e filtrados com uma constante de tempo de 10 ms e um filtro canal-baixo de 2,5 kHz, então digitalizados com uma taxa de analógico para digital de 5 kHz e retransmitida para um computador do laboratório usando o *software Signal e hardware CED 1401* (Cambridge Electronic Design). A intensidade foi ajustada para induzir, em média, MEPs de 1 mV de amplitude pico-a-pico e foi mantida constante para todas as medidas pós-ETCC.

3.4 Intervenção Farmacológica

Adesivos transdérmicos contendo nicotina (*Nicorette Depotpflaster*, Pfizer, com capacidade de liberação de 15 mg de nicotina em aproximadamente 16 h) ou contendo placebo foram aplicados em todos os indivíduos em combinação com DMO ou cápsulas de placebo antes da aplicação da ETCC anódica. Essa dose de nicotina têm demonstrado afetar a cognição (Min *et al.* 2001; Myers *et al.* 2004; Poltavski e Petros 2005) e assim ser suficiente para influenciar as funções do SNC (Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2012a, 2013, 2015). O adesivo foi aplicado 6 h antes da estimulação, sendo esse o tempo aproximado para que a nicotina atinja o pico da concentração plasmática sanguínea (Nørregaard *et al.* 1992) e mantido no paciente até o final do segundo dia de experimento. A fim de evitar ou amenizar possíveis efeitos colaterais, os participantes foram instruídos a tomar domperidona 20 mg, um antagonista periférico de receptor dopaminérgico D₂ (Barone JA 1999), com efeitos antieméticos, em caso de necessidade. Esse

medicamento não exerce qualquer efeito sobre a excitabilidade cortical motora (Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2013).

O dextrometorfano foi administrado em doses de 50, 100, ou 150 mg em diferentes sessões experimentais, com a função de bloqueio de receptores NMDA (Wong *et al.* 1988; Tortella *et al.* 1989; Franklin e Murray 1992; Netzer *et al.* 1993), atingindo pico de concentração plasmática após 2 horas de sua administração por via oral (Silvasti *et al.* 1987; Schadel *et al.* 1995).

3.5 Análise Estatística

O tamanho da amostra para este estudo foi planejado para um tamanho de efeito moderado, dada a hipótese de que o DMO inibe o efeito da NIC sobre a plasticidade facilitatória induzida pela ETCC. Assim, assumindo um tamanho de efeito de 0,4, considerando análise de variância de medidas repetidas (ANOVA), com interação intra e entre indivíduos como principal teste estatístico com um poder de 80% de probabilidade de dois lados de um erro tipo I de 5%, um mínimo de 12 indivíduos seria necessário; entretanto, com a finalidade de prevenção em caso de desistência, nós aumentamos a amostra estimada em 10%, resultando assim em 13 indivíduos.

As médias das 25 amplitudes dos MEPs registradas para as linhas de base 1 e 2 e em cada ponto de tempo foram calculadas para todos os indivíduos. As médias das amplitudes dos MEPs, após as ETCC anódicas de cada indivíduo foram normalizadas para as respectivas médias das amplitudes dos MEPs (quociente de amplitudes pós- versus pré intervenção de MEP) da linha de base individual (linha de base 2). Então, essas amplitudes normalizadas foram reunidas e organizadas por sessões, calculando a média final entre os indivíduos para cada condição e tempo. ANOVA de medidas repetidas foi realizada nos dados normalizados. A amplitude do MEP foi a variável dependente incluindo todos os pontos de tempo até a tarde seguinte após a ETCC. Nicotina (NIC/PLC), dextrometorfano (50, 100, 150 mg DMO/PLC) e os tempos foram incluídos como intra-fatores dos indivíduos.

Adicionalmente, a homocedasticidade foi avaliada pelo teste de esfericidade de Mauchly, aplicando-se a correção de Greenhouse-Geisser sempre que necessária.

Para comparar os efeitos principais da nicotina e diferentes dosagens de DMO sobre a plasticidade, as médias dos MEPs para os primeiros 30 minutos após a estimulação foram calculadas para cada indivíduo por sessão experimental e normalizados à linha de base 2. Em seguida, esses valores médios dos MEPs para cada condição de dosagem foram comparados com a respectiva condição placebo por ANOVA de uma via, seguido por teste *post hoc* LSD.

Para verificar se houve alterações nas amplitudes dos MEPs induzidas pelas drogas e a porcentagem máxima de saída do estimulador TMS (% MSO) para adquirir a amplitude do MEP da linha de base de 1 mV, bem como para a identidade das amplitudes dos MEPs e % MSO entre as condições de medicação, esses valores foram comparados antes (linha de base 1 = Lb1) e após a administração das drogas (linha de base 2 = Lb2), e entre Lb1 e Lb2 nos grupos de medicamentos. Uma análise de variância foi realizada para os valores de amplitude dos MEPs e % MSO para as linhas de base 1 e 2, e condições de medicação intraindivíduos.

Conicionados aos resultados significativos detectados pela ANOVA, testes *t* de *Student* (amostras pareadas, bicaudal, $p < 0,05$, não corrigido para comparações múltiplas) foram realizados para comparar as amplitudes dos MEPs antes e depois das estimulações cerebrais em cada condição e entre as condições das drogas para cada ponto de tempo, bem como para as intensidades dos MEPs entre diferentes condições de medicações dentro de um determinado intervalo de tempo.

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para todas as análises estatísticas. Todos os resultados são apresentados na forma de média e erro padrão da média (SEM).

3.6 Procedimento Experimental

Inicialmente os indivíduos foram acomodados confortavelmente em uma cadeira com encosto para os braços e a cabeça (Fig. 7). Eletrodos eletromiográficos foram colocados no MADM direito como descrito anteriormente. Então a EMT foi aplicada sobre a área representacional esquerda do MADM direito para determinar a área com os MEPs consistentemente maiores, a qual foi marcada com uma caneta a prova d'água. A intensidade da EMT foi ajustada para obter amplitudes pico-a-pico com média de 1 mV. Em seguida, 25 MEPs foram registrados para a determinação da primeira linha de base. Após o registro da linha de base, o adesivo de nicotina ou de placebo foi colocado na parte superior do braço esquerdo e lá permaneceu até o final do experimento (Fig. 7).

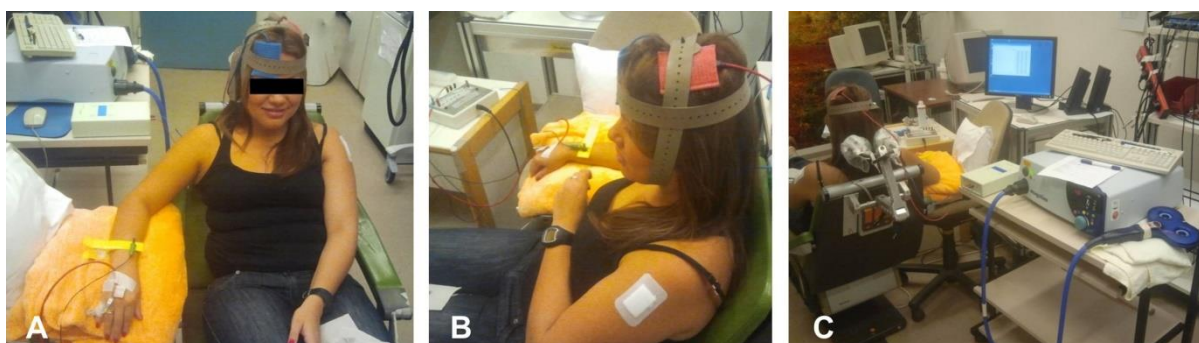
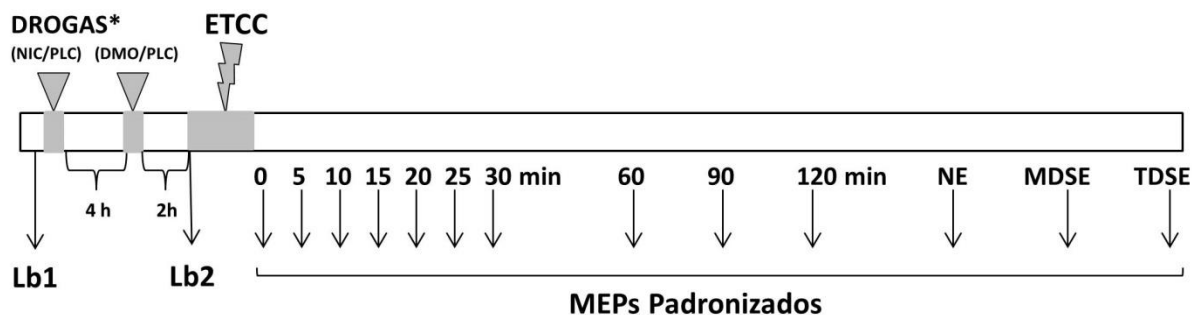


Figura 7. Fotografias representativas dos procedimentos. (A) sujeito acomodado confortavelmente em uma cadeira com encosto para os braços e a cabeça e com os eletrodos eletromiográficos colocados no MADM direito. (B) adesivo de nicotina/placebo aderido na parte superior do braço esquerdo. (C) aplicação da ETCC anódica; o aparelho para aplicação da ETCC, bem como da EMT podem ser vistos atrás à direita na foto.

Quatro horas após a aplicação do adesivo, o dextrometorfano, em uma das doses já mencionadas ou placebo foi administrado. Seis horas após a aplicação dos adesivos, novamente 25 MEPs foram gravados e, se necessário, a intensidade da EMT foi ajustada para 1 mV (linha de base 2). Após esse procedimento, a ETCC anódica foi aplicada, seguida por imediata gravação de pelo menos 25 MEPs nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 e 120 minutos. Além disso pós-medidas

também foram conduzidas na noite do experimento (NE), na manhã (MDSE) e tarde (TDSE) do dia seguinte ao experimento. As sessões foram realizadas em ordem aleatória, e um intervalo entre as sessões de pelo menos uma semana era obrigatório para evitar interferências. Todos os participantes receberam ETCC anódica sob apenas nicotina, apenas dextrometorfano, placebo apenas, e combinações de dextrometorfano e nicotina (Fig. 8). Isso resultou em 8 sessões por indivíduo.



***DROGAS:** (1) PLC + PLC, (2) PLC + DMO 50, (3) PLC + DMO 100, (4) PLC + DMO 150
 (5) NIC + PLC, (6) NIC + DMO 50, (7) NIC + DMO 100, (8) NIC + DMO 150

Figura 8. Curso do experimento: após ajuste da intensidade da EMT para provocar amplitudes de MEPS de 1 mV (S1mV), 25 MEPS foram registrados nessa intensidade de estímulo e a média das amplitudes dos MEPS foi calculada (Lb1). Em seguida o adesivo de NIC ou PLC foi aderido na parte superior do braço esquerdo. 4 h após a aplicação do adesivo, DMO em uma das dosagens de 0 (placebo), 50, 100 ou 150 mg foi administrado. 6 horas após a aplicação do adesivo, novamente 25 MEPS foram registrados em uma intensidade de estímulo ajustada para a linha de base e as amplitudes dos MEPS foram calculadas (Lb2). Em seguida ETCC anódica foi aplicada, seguida por imediato registro de pelo menos 25 MEPS nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 e 120 minutos, bem como na noite do experimento (NE), na manhã (MDSE) e tarde (TDSE) do dia seguinte ao experimento.

4. RESULTADOS

4.1 Características das Amostras e Análises Gerais

4 horas após a aplicação do adesivo contendo nicotina, 3 indivíduos apresentaram náusea moderada e 2 indivíduos vomitaram. 6 horas após a aplicação de nicotina com administração de 150 mg de dextrometorfano 5 indivíduos apresentaram náusea moderada. Todos os indivíduos foram instruídos a tomar 20 mg de domperidona em caso de necessidade. Nenhum efeito colateral foi reportado para as doses de 50 e 100 mg de dextrometorfano. Os demais participantes foram tolerantes às drogas.

Comparando os valores da linhas de base 1 e 2 houve significância para o fator tempo, utilizando-se ANOVA para a intensidade da EMT [$F_{(1,12)} = 5,28, p = 0,04$]. Isso foi causado por uma significativa diferença entre a linha de base 1 e 2 para a condição NIC/DMO150 (Tabela 1). Nenhuma outra diferença entre os valores das linhas de base foi identificado.

A ANOVA revelou principais efeitos significativos para o fator tempo [$F_{(13,143)} = 4,511; p < 0,0001$] e interação de 3 vias entre NIC, doses de DMO e tempo [$F_{(39,429)} = 1,716; p < 0,01$].

Amplitudes dos MEPs e a intensidade da estimulação antes e após a administração das drogas

Parâmetro da EMT	Medicação	Linha de base 1	Linha de base 2
MEP	PLC/PLC	0,91 ± 0,04	0,92 ± 0,04
%MSO		59,69 ± 2,13	61,00 ± 2,29
MEP	PLC/DMO50	0,94 ± 0,05	0,97 ± 0,03
%MSO		63,38 ± 3,17	62,77 ± 3,26
MEP	PLC/DMO100	0,93 ± 0,05	1,04 ± 0,06
%MSO		62,23 ± 2,74	60,46 ± 3,34
MEP	PLC/DMO150	0,96 ± 0,03	1,04 ± 0,03
%MSO		64,15 ± 3,40	63,08 ± 3,29
MEP	NIC/PLC	0,96 ± 0,03	0,96 ± 0,03
%MSO		63,00 ± 3,55	62,92 ± 3,76
MEP	NIC/DMO50	0,88 ± 0,04	0,99 ± 0,03
%MSO		63,15 ± 3,81	61,92 ± 3,28
MEP	NIC/DMO100	0,99 ± 0,03	0,98 ± 0,03
%MSO		63,54 ± 3,41	63,31 ± 3,39
MEP	NIC/DMO150	0,95 ± 0,03	0,95 ± 0,04
%MSO		64,77 ± 2,94	60,69 ± 3,01**

Tabela 1. Médias das amplitudes dos MEPs ± SEM e as médias das intensidades de estimulação (porcentagem máxima de saída do estimulador, %MSO) ± SEM das linhas de base 1 e 2. A intensidade da EMT foi ajustada para provocar MEPs com amplitude de 1 mV (Lb1). A segunda linha de base (Lb2) foi registrada 6 horas após a aplicação do adesivo para determinar o impacto das drogas na excitabilidade cortical. ** $p < 0,01$ quando comparado com a linha de base 1 (ANOVA de medidas repetidas).

4.2 Efeito do DMO na Plasticidade Induzida pela ETCC

Como revelado pelo teste *post-hoc t* de *student*, nas condições de medicação placebo os MEPs foram significativamente ($p < 0,05$) aumentados por até 30 min após a ETCC anódica, quando comparados com os respectivos valores das linhas de base. Com a dose de 50 mg de DMO, os MEPs obtidos não foram diferentes daqueles obtidos com medicação placebo por até 90 min após a ETCC. Com a dose de 100 mg de DMO, a análise *post-hoc* mostrou que as amplitudes dos MEPs não foram diferentes dos valores das linhas de base para nenhum tempo, mas foram diferentes significativamente da medicação placebo imediatamente após a ETCC ($p < 0,01$), 10 min ($p < 0,05$), 20 min ($p < 0,05$) e 30 min após a ETCC ($p < 0,05$). As

amplitudes dos MEPs obtidas para a maior dose de DMO também não diferiram dos valores da linha de base para até a última medida no dia da estimulação, e foram significativamente alteradas quando comparadas com a respectiva medicação placebo no intervalo de 25 min ($p < 0,05$) (Fig. 9).

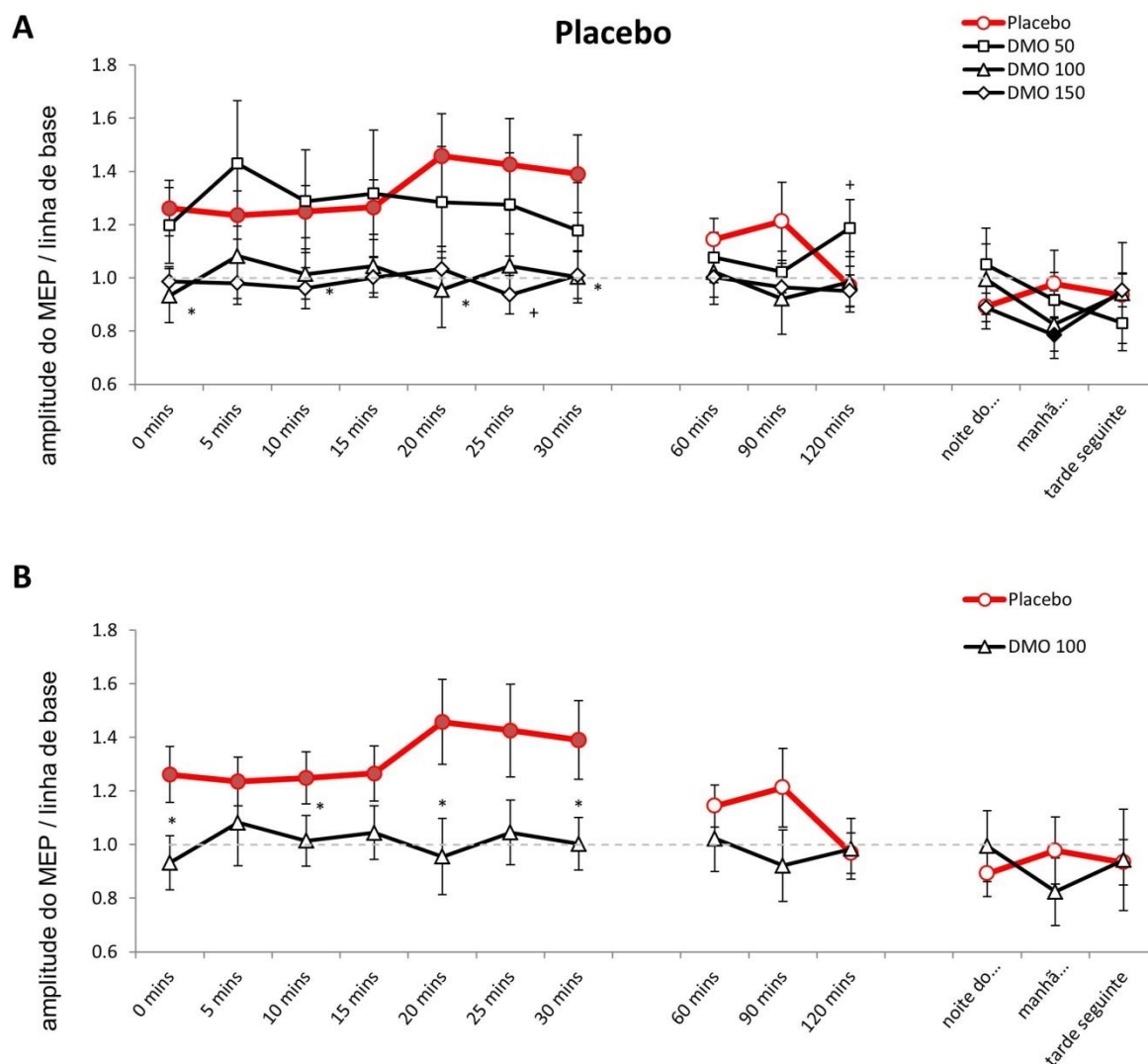


Figura 9. Efeitos do DMO, um antagonista de receptor NMDA, sobre a plasticidade facilitatória induzida pela ETCC. **A:** Os gráficos mostram os valores das amplitudes dos MEPs das linhas de base normalizadas no eixo Y, plotados em diferentes intervalos de tempo, após ETCC anódica e sob administração de placebo ou DMO de 50, 100 ou 150 mg, registrados até a tarde do dia seguinte ao da estimulação. Nos casos em que se administrou placebo a ETCC anódica induziu uma elevação significativa da excitabilidade por até 30 min após a estimulação, a qual foi anulada por 100 e 150 mg de DMO. A dose de 50 mg de DMO não afetou a plasticidade induzida pela ETCC. **B:** Gráfico com destaque para o efeito da dose de 100 mg de DMO, que apresentou o efeito mais significativo. Os símbolos preenchidos indicam desvios estatisticamente significantes das amplitudes dos MEPs pós-estimulatórios quando comparados com os respectivos valores das linhas de base, bem como * indicam diferenças significantes entre placebo e a dose de 100 mg de DMO e + indicam diferenças significantes entre placebo e a dose de 150 mg de DMO para os mesmos intervalos de tempo. (Teste *t* de *Student* bicaudal e com amostra pareada, $p < 0,05$). As barras de erro indicam erro padrão da média.

4.3 O Impacto da Nicotina na Plasticidade Induzida pela ETCC sob Influência do DMO

Sob administração de nicotina sem DMO, o teste *t* de *Student* mostrou que a excitabilidade induzida pela ETCC foi anulada. Entretanto, quando combinada com 100 mg de DMO, a plasticidade facilitatória foi restabelecida. MEPs foram significativamente aumentados por 25 min após ETCC anódica quando comparados com os valores da respectiva linha de base. Os MEPs obtidos sob essa combinação de drogas foram diferentes dos obtidos com nicotina sem administração de DMO nos intervalos de 10 ($p < 0,01$), 15 ($p < 0,01$) e 20 min após a ETCC ($p < 0,05$). MEPs obtidos após administração de nicotina combinada com a menor dose de DMO não divergiram daqueles obtidos para a linha de base ou daqueles obtidos da administração de apenas nicotina em nenhum intervalo de tempo. Com relação à maior dose de DMO combinada com nicotina, os MEPs foram diferentes dos valores das respectivas linhas de base e dos valores obtidos sob apenas administração de nicotina em um único intervalo de tempo (Fig. 10).

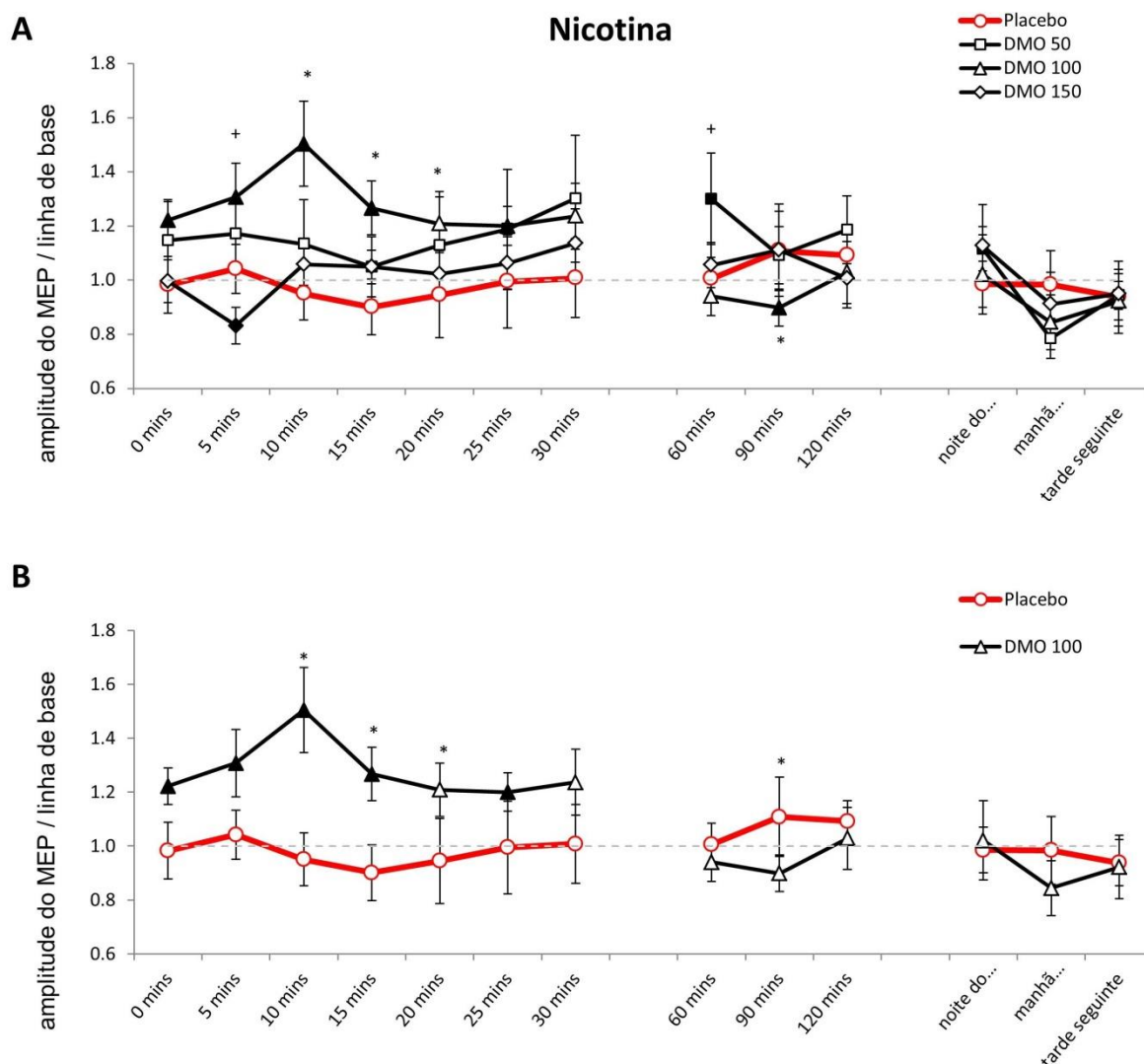


Figura 10. Efeito da nicotina e sua interação com diferentes doses de DMO sobre a neuroplasticidade induzida pela ETCC. **A:** Os gráficos mostram as linhas de base normalizadas das amplitudes dos MEPs no eixo Y, plotados em diferentes intervalos de tempo após a ETCC anódica sob administração de NIC, doses de 50, 100 ou 150 mg de DMO ou PLC até a tarde do dia seguinte ao da estimulação. Sob administração de NIC/PLC o aumento da excitabilidade induzido pela ETCC foi anulada. Sob NIC/DMO 100 mg, a plasticidade facilitatória foi restabelecida e os MEPs foram significativamente aumentados por 25 min após a ETCC anódica, quando comparados com os respectivos valores das linhas de base. Os MEPS obtidos após administração de NIC/DMO nas doses de 50 e 150 mg de DMO não foram significativamente diferentes da respectiva linha de base, bem como também em relação à administração de NIC/PLC considerando-se todos os intervalos de tempo. **B:** Gráfico com destaque para o efeito da dose de 100 mg de DMO, que apresentou o efeito mais significativo. Os símbolos preenchidos indicam desvios estatisticamente significantes das amplitudes dos MEPs pós-estimulatórios quando comparados com os respectivos valores das linhas de base, bem como * indicam diferenças significantes entre as condições de NIC/PLC e NIC/DMO100 e + indicam diferenças significantes entre as condições de NIC/PLC e NIC/DMO150 para os mesmos intervalos de tempo. (Teste *t* de *Student* bicaudal e com amostra pareada, $p < 0,05$). As barras de erro indicam erro padrão da média.

4.4 Comparação entre a Nicotina e Diferentes Doses de DMO até 30 min Após a ETCC Anódica

Para as médias calculadas para os primeiros 30 min, a ANOVA revelou efeitos significativos para a interação de 2 vias entre NIC e as doses de DMO [$F_{(3,36)} = 4,222$; $p < 0,05$].

O teste *t* de *Student* mostrou que a dose média de DMO restabeleceu o efeito da plasticidade facilitatória induzida pela ETCC de forma mais significante e que sob administração de apenas nicotina esse efeito foi abolido ($p < 0,01$). As doses de 50 e 150 mg de DMO não mostraram esse efeito inibitório. Sob medicação placebo, as doses de 100 e 150 mg de DMO aboliram de forma significativa o aumento da excitabilidade induzida pela ETCC ($p < 0,05$) (Fig. 11).

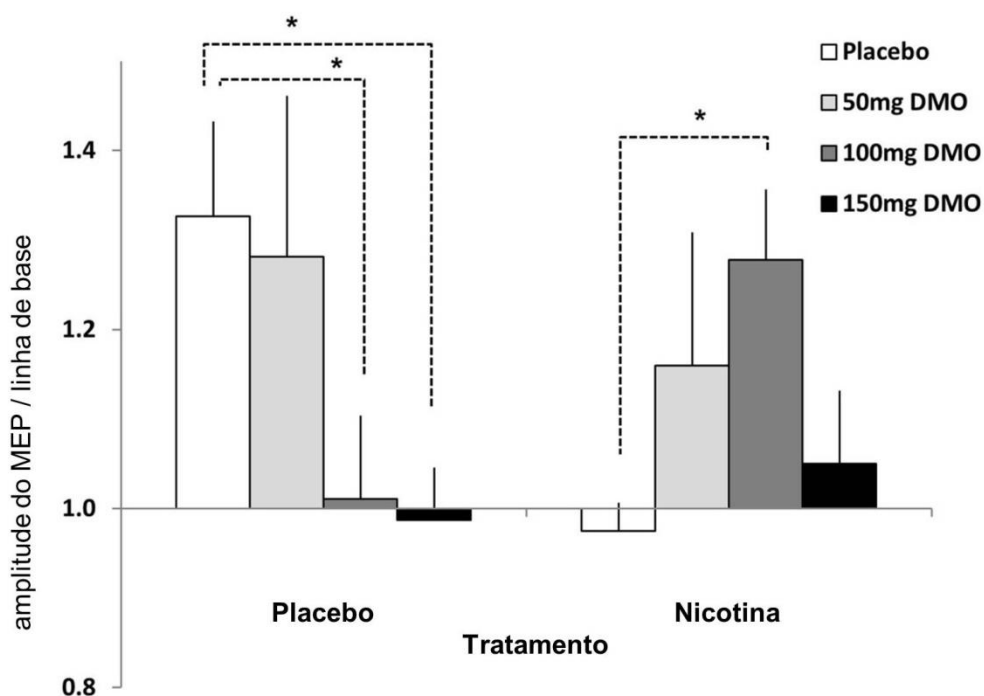


Figura 11. Impacto da NIC e diferentes dosagens de DMO na plasticidade facilitatória induzida pela ETCC anódica para os MEPs obtidos até o intervalo de tempo de 30 min após a estimulação. A plasticidade facilitatória é seletivamente restabelecida pela dose de 100 mg de DMO sob administração de nicotina. Sob administração de NIC a plasticidade facilitatória induzida pela ETCC é abolida. As doses de 100 e 150 mg de DMO aboliram a plasticidade facilitatória induzida pela ETCC quando administradas com placebo. Cada coluna representa a média das linhas de base dos MEPs normalizados \pm SEM até 30 min após a estimulação. * indicam diferenças significantes entre as condições de PLC/DMO e PLC/PLC ou NIC/DMO e NIC/PLC. (Teste *t* de *Student*, bicaudal e com amostra pareada, $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram uma relevante interação entre a ativação do receptor nicotínico e a plasticidade glutamatérgica controlada por alterações do influxo celular de cálcio. A nicotina inibiu a plasticidade do tipo LTP induzida pela ETCC anódica, provavelmente por causar sobrefluxo de cálcio celular. A redução do influxo de cálcio pelo bloqueador de receptor NMDA restabeleceu a plasticidade de forma dose-dependente. Esses resultados aprimoram a nossa compreensão dos efeitos neuromodulatórios da nicotina sobre a plasticidade glutamatérgica. Tomando-se em conta que a LTP é uma base fisiológica fundamental do aprendizado e da formação da memória, isso poderia explicar, pelo menos parcialmente os efeitos heterogêneos da nicotina sobre os processos cognitivos.

Quando levadas em conta as administrações de nicotina e DMO 150 mg separadamente, os resultados são idênticos aos obtidos em estudos prévios, nos quais foram explorados os impactos dessas drogas sobre a plasticidade induzida pela ETCC (Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche 2003b; Kuo *et al.* 2007; Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2012a, 2012b, 2013). De acordo com a hipótese de focalidade da acetilcolina, a plasticidade facilitatória não focal gerada pela ETCC foi abolida sob administração do inibidor da colinesterase rivastigmina (Kuo *et al.* 2007). Esses efeitos parecem ser controlados principalmente por receptores nicotínicos, já que em não-fumantes a nicotina igualmente inibiu os efeitos não-focais da ETCC anódica e prolongou os efeitos da indução da plasticidade focal (Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2012a, 2012b, 2013). Além disso, esses efeitos dependem dos receptores nicotínicos com propriedades de canal de cálcio, uma vez que a vareniclina, um agonista parcial de alta afinidade para $\alpha_4\beta_2$ e agonista para α_7 tiveram efeitos comparáveis sobre plasticidade induzida pela ETCC e PAS (Batsikadze *et al.* 2014). Já em relação ao dextrometorfano, vários autores observaram que a administração prévia dessa substância, com o consequente bloqueio de receptores NMDA, suprimiu os efeitos pós-estimulação das ETCC anódica ou catódica (Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b).

Com relação às comparações das linhas de base entre as drogas administradas, sobre o efeito significativo mostrado para a intensidade da EMT na condição NIC/DMO150 pode-se especular ter sido causada por efeitos colaterais, entretanto,

não deve afetar relevantemente os resultados, já que os MEPs foram idênticos às outras condições de medicação após o ajuste da linha de base.

Mecanismo de Ação Proposto

Receptores de acetilcolina nicotínicos são amplamente expressos no sistema nervoso central e são conhecidos por estarem envolvidos em várias funções cognitivas complexas, tais como a atenção, a aprendizagem, a consolidação da memória, despertar e percepção sensorial (Levin *et al.* 1992; Albuquerque *et al.* 2009).

No cérebro, os subtipos de nAChR predominantemente funcionais são os α_7 homoméricos e os $\alpha_4\beta_2$ heteroméricos (Alkondon e Albuquerque 2004; Machaalani *et al.* 2010). Ambos os receptores aumentam os níveis de cálcio intracelular quando ativados, servindo como canais de cálcio pré e pós-sinápticos (Burnashev 1998; Dajas-Bailador e Wonnacott 2004). Vários estudos têm mostrado que os nAChRs α_7 podem modular a liberação de diversos neurotransmissores, incluindo glutamato, GABA, dopamina e noradrenalina, portanto, têm o potencial para participar numa série de funções neurológicas (Alkondon *et al.* 1997, 1999; Summers *et al.* 1997; Li *et al.* 1998; Schilstrom *et al.* 1998; Maggi *et al.* 2001; Huang *et al.* 2010).

Neste estudo, a hipótese principal foi a de que a administração de nicotina seguida de ETCC anódica iria aumentar a concentração de cálcio em um nível tal que ultrapassaria a janela de concentração para a indução da LTP (Grundey *et al.* 2012a, 2012b; Thirugnanasambandam *et al.* 2012). Para testar essa hipótese, nós bloqueamos o influxo de cálcio com um bloqueador de receptor NMDA. Como esperado, a administração de 100 mg de DMO restabeleceu a plasticidade facilitatória da ETCC anódica que se encontrava suprimida pela administração prévia da nicotina, sugerindo que o decréscimo do influxo de cálcio causado pelo dextrometorfano nessa dose foi suficiente para reduzir a concentração de cálcio a um nível capaz de induzir LTP.

A administração de 50 mg de DMO em conjunto com nicotina, entretanto, não foi capaz de restabelecer a plasticidade facilitatória gerada pela ETCC, provavelmente por uma insuficiente redução do influxo de cálcio nessa dosagem, o que está de acordo com a ausência de efeitos na plasticidade induzida pela ETCC quando a menor dose de DMO foi administrada sozinha. A dosagem de 150 mg de DMO foi utilizada em 2002, por Liebetanz *et al.*, combinada com ETCC anódica e catódica, e, em ambos os casos, inibiu os efeitos pós-estimulação, concluindo-se que em altas doses essa substância bloqueava canais de Na^+ e Ca^{2+} . Já em 2003, Nitsche *et al.* utilizando a mesma dose, observaram o mesmo resultado, confirmando a importância do receptor NMDA em relação à plasticidade induzida pela ETCC. Por fim, em 2013, Monte-Silva *et al.* observaram que a dose de 150 mg de DMO foi capaz de inibir a plasticidade facilitatória prolongada, induzida pela ETCC anódica aplicada de forma repetida, mesmo quando a droga foi administrada horas após o término das estimulações. Portanto, o DMO em altas doses já é conhecido por inibir a plasticidade gerada pela ETCC, independente da ativação dos receptores nicotínicos (Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b; Monte-Silva *et al.* 2013), assim como também mostrado neste estudo. É provável que essa dose bloqueie receptores NMDA, inibindo o influxo de cálcio em um nível tal, que não possa ser compensado pelo influxo de cálcio causado pela nicotina.

Esses mecanismos sugeridos poderiam explicar o efeito de aumento da relação “sinal-ruído”, provocado pela nicotina em relação à plasticidade do tipo LTP. O ruído sináptico refere-se ao bombardeio constante de atividade sináptica em neurônios. Isto ocorre rotineiramente em uma célula, quando potenciais são produzidos sem a estimulação nervosa de um potencial de ação, e são devido à natureza inerentemente aleatória das sinapses. Já o sinal refere-se à uma ativação da atividade sináptica além do ruído sináptico, geralmente ocorrendo de forma organizada (Dideriksen *et al.* 2012). A ativação de redes corticais ruidosas pela nicotina irá, provavelmente, resultar em maior influxo de cálcio quando comparada com condições relativamente não-ruidosas, nas quais um número mais limitado de neurônios é ativado com duração menor. Portanto, os padrões de atividade cortical ruidosos podem ser mais propensos a sobrefluxo de cálcio e, portanto, à conversão de plasticidade do tipo LTP. Essa explicação hipotética deve ser explorada mais diretamente em estudos futuros.

Estes mecanismos fisiológicos também podem explicar, pelo menos parcialmente, os efeitos da nicotina na cognição. Além dos efeitos positivos sobre vários processos cognitivos, nenhum efeito ou efeitos negativos também foram descritos (Levin 2002; Kumari *et al.* 2003; Jacobsen *et al.* 2005; Swan *et al.* 2007; Grundey *et al.* 2015). Este resultado, pelo menos parcialmente heterogêneo da nicotina, pode ser explicado pelos seus efeitos fisiológicos não-lineares, ou seja, o efeito é relacionado com a dose (Grundey *et al.* 2015).

Além disso, o impacto da nicotina na fisiologia e nos processos cognitivos é dependente da condição do indivíduo. Ao contrário do que vimos quanto aos efeitos da nicotina em pessoas não fumantes neste estudo, e que já foi observado em outros estudos anteriormente, em fumantes, durante a abstinência de nicotina, a plasticidade do tipo LTP não é induzida pela ETCC ou PAS, mas foi restituída quando a própria nicotina foi administrada (Grundey *et al.* 2012a). Da mesma forma os fumantes apresentaram redução de desempenho em uma tarefa de memória de trabalho quando em abstinência de nicotina em comparação a não-fumantes, prejuízo este que foi, recuperado seletivamente por uma nova administração de nicotina (Grundey *et al.* 2015).

Uma vez que os receptores nicotínicos ionotrópicos que permitem influxo de cálcio são dessensibilizados em fumantes, esses resultados podem ser explicados pela redução do influxo de cálcio sob a retirada da nicotina, sendo restabelecido pelo consumo novamente da droga, pois volta a aumentar o influxo celular de cálcio. Por outro lado, em não-fumantes, a concentração de cálcio máxima "ideal" sem a administração de nicotina irá impedir uma melhoria adicional por essa substância.

Este mecanismo dependente da condição também pode ser relevante para os efeitos da nicotina em doenças neuropsiquiátricas, em que o sistema colinérgico é hipo-ativo, como na doença de Alzheimer. Aqui, a ativação dos receptores nicotínicos pode ser capaz de restituir esses respectivos processos (Wilson *et al.* 1995; White e Levin 1999).

Os resultados do presente estudo sugerem, além disso, que a administração da nicotina pode ter que ser ajustada para resultar em efeitos ótimos, uma vez que

ambos, concentração muito alta ou muito baixa de cálcio intracelular, irão provavelmente comprometer a plasticidade.

Algumas limitações deste estudo devem ser levadas em conta. O adesivo de nicotina foi administrado em uma única dose, portanto, não foi possível determinar um efeito dependente da dose de nicotina na plasticidade, mas que já foi mostrado para outros neuromoduladores, como a dopamina (Monte-Silva *et al.* 2010; Fresnoza *et al.* 2014). Outra limitação é que nós não investigamos as funções cognitivas em nossos participantes, a fim de compará-los diretamente com os resultados neurofisiológicos, o que nos permitiria explorar consequências funcionais dos respectivos efeitos (Gotti e Clementi 2004). No entanto, isso teria resultado em um número excessivo de sessões para cada participante.

Em síntese, este estudo demonstra que o efeito modulatório da nicotina sobre a plasticidade do tipo LTP, induzida pela ETCC, depende de influxo de cálcio e ativação de receptores NMDA. Os resultados ainda sugerem que existe uma quantidade crítica de cálcio intracelular (influxo) necessária para a indução de LTP pela ETCC. O aumento do influxo de cálcio causado pela ativação dos NMDARs resulta em excesso de cálcio intracelular. Esse excesso reduz ou elimina os já citados efeitos modulatórios em indivíduos saudáveis e não-fumantes, como comprovado pelo reaparecimento da plasticidade do tipo LTP após a redução do influxo de cálcio, a qual aconteceu pelo bloqueio do receptor NMDA. Por conseguinte, esse efeito de restabelecimento da plasticidade depende da quantidade do bloqueador do receptor NMDA, uma vez que uma inibição demasiadamente baixa não resultará em suficiente redução do influxo de cálcio, e inibição demasiadamente grande irá reduzir o influxo de cálcio a um grau que não irá mais induzir LTP.

6. CONCLUSÕES

- A nicotina suprimiu a plasticidade do tipo LTP induzida pela ETCC anódica;
- A supressão, pela nicotina, da plasticidade induzida pela ETCC anódica, foi revertida de forma dose-dependente pelo dextrometorfano, um antagonista de receptores NMDA;
- Como a plasticidade do tipo LTP é dependente da ativação de receptores NMDA e, subsequentemente, do consequente influxo de cálcio, os resultados deste estudo são bastante sugestivos de um efeito da nicotina sobre a plasticidade via modulação da concentração de cálcio intracelular.

Estes mecanismos podem ser relevantes para os processos cognitivos e comportamentais relacionados à plasticidade.

7. REFERÊNCIAS

Accornero N, Voti P, La Riccia M, Gregori B. 2006. Visual evoked potentials modulation during direct current cortical polarization. *Exp Brain Res*.

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol*. 89:73–120.

Alkondon M, Pereira EFR, Barbosa CT, Albuquerque EX. 1997. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates γ -amino butyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther*. 283:1396–1411.

Alkondon M, Pereira EFR, Eisenberg HM, Albuquerque EX. 1999. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci*. 19:2693–2705.

Alkondon M, Albuquerque EX. 2004. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog Brain Res*. 145:109–120.

Arendash GW, Sanberg PR, Sengstock GJ. 1995a. Nicotine enhances the learning and memory of aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52:517–523.

Artola A, Singer W. 1987. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature*. 330:649-52.

Banken JA, Foster H. 2008. Dextromethorphan. *Ann N Y Acad Sci* 1139:402–411.

Barchas J, Akil H, Elliott G, Holman R, Watson S. 1978. Behavioral neurochemistry: neuroregulators and behavioral states. *Science* 200:964-973.

Barone JA. 1999. Domperidone: a peripherally acting dopamine D2-receptor antagonist. *Ann Pharmacother*. 33(4):429-40.

Batsikadze G, Moliadze V, Paulus W, Kuo MF, and Nitsche MA. 2013. Partially non-linear stimulation intensity-dependent effects of direct current stimulation on motor cortex excitability in humans. *J. Physiol*. 591:1987–2000.

Batsikadze G, Paulus W, Grundey J, Kuo MF, Nitsche MA. 2014. Effect of the Nicotinic $\alpha 4 \beta 2$ -receptor Partial Agonist Varenicline on Non-invasive Brain Stimulation-Induced Neuroplasticity in the Human Motor Cortex. *Cereb Cortex*. 1:11.

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

Bobo WV, Miller SC, Martin BD. 2005. The abuse liability of dextromethorphan among adolescents: A review. *J Child and Adolesc Substance Abuse* 14(4):55–75.

Boggio PS. 2004. Avaliação Neuropsicológica de pacientes com Doença de Parkinson e depressão submetidos a estimulação magnética transcraniana ou a fluoxetina. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Boggio PS, Fregni F, Berman F, Mansur CG, Rosa M, Rumi DO, Barbosa ER, Odebrecht Rosa M, Pascual-Leone A, Rigonatti SP, Marcolin MA, Araujo Silva MT. 2005. Effect of repetitive TMS and fluoxetine on cognitive function in patients with Parkinson's disease and concurrent depression. *Mov Disord*, 20(9):1178-1184.

Boyer EW. 2004. Dextromethorphan abuse. *Pediatr Emerg Care*. 20:858–863.

Brasil-Neto JP, de Araujo DP, Teixeira WA, Araujo WP, Boechat-Barros R. 2004. Experimental therapy of epilepsy by transcranial magnetic stimulation. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 62:21–25.

Browne CJ, Sharma N, Waters KA, Machaalani R. 2010. The effects of nicotine on the alpha-7 and beta-2 nicotinic acetylcholine receptor subunits in the developing piglet brainstem. *Int J Dev Neurosci*. 28(1):1-7.

Brunoni AR, *et al.* 2012. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. *Brain stimulation* 5:175–95.

Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC. 2012. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill. 12.ed. 2084 pp.

Bryner JK, Wang UK, Hui JW, Bedodo M, MacDougall C, Anderson IB. 2006. Dextromethorphan abuse in adolescence: an increasing trend: 1999–2004. *Arch Pediatr Adolesc Med* 160:1217–1222.

Buisson B, Bertrand D. 2001. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4(beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci*. 21:1819–1829.

Burnashev N. 1998. Calcium permeability of ligand-gated channels *Cell Calcium*. 24:325–332.

Cho K, Aggleton JP, Brown MW, Bashir ZI. 2001. An experimental test of the role of postsynaptic calcium levels in determining synaptic strength using perirhinal cortex of rat. *J Physiol* 532:459-466.

Church J. 1990. Dextromethorphan, dysphoria and NMDA receptors. Neuromodulatory effects of dextromethorphan: role of NMDA receptors in responses. *Trends Pharmacol Sci* 11:146–147.

Church J, Sawyer D, McLarnon JG. 1994. Interactions of dextromethorphan with the N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex: single channel recordings. *Brain Res* 666:189–194.

Citri A, Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18-41.

Cole DM, Beckmann CF, Long CJ, Matthews PM, Durcan MJ, Beaver JD. 2010. Nicotine replacement in abstinent smokers improves cognitive withdrawal symptoms with modulation of resting brain network dynamics. *Neuroimage*. 52:590–599.

Costa L, Spatuzza M, D'Antoni S, Bonaccorso CM, Trovato C, Musumeci SA, Leopoldo M, Lacivita E, Catania MV, Ciranna L. 2012. Activation of 5-HT7 Serotonin Receptors Reverses Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Synaptic Plasticity in Wild-Type and Fmr1 Knockout Mice, a Model of Fragile X Syndrome. *Biol Psychiatry* 72:924-933.

Cramer SC, *et al.* 2011. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain: a journal of neurology* 134:1591–609.

Cummings JA, Mulkey RM, Nicoll RA, Malenka RC. 1996. Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* 16:825-833.

Dajas-Bailador F, Wonnacott S. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 25:317–324.

Dideriksen JL, Negro F, Enoka RM, Farina D. 2012. Motor unit recruitment strategies and muscle properties determine the influence of synaptic noise on force steadiness. *J Neurophysiol* 107: 3357–3369.

Donoghue JP. 1995. Plasticity of adult sensorimotor representations. *Current Opinion in Neurobiology* 5:749-754.

Feldman DE. 2009. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annual Reviews of Neuroscience* 32:33–55.

Floel A, Garraux G, Xu B, Breitenstein C, Knecht S, Herscovitch P, Cohen LG. 2008. Levodopa increases memory encoding and dopamine release in the striatum in the elderly. *Neurobiol Aging* 29:267-279.

Forrester MB. 2011. Dextromethorphan abuse in Texas, 2000–2009. *J Addict Dis* 30:243–247.

Franklin PH, Murray TF. 1992. High affinity [³H]dextrorphan binding in rat brain is localized to a noncompetitive antagonist site of the activated N-methyl-D-aspartate receptor-cation channel. *MolPharmacol.* 41:134-46.

Fregni F, *et al.* 2006. A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 47:335-42.

Fregni F, Boggio PS, Brunoni AR. 2011. *Neuromodulação Terapêutica. Sarvier.* 1.ed. 592 pp.

Fresnoza S, Paulus W, Nitsche MA, Kuo MF. 2014. Nonlinear dose dependent impact of D1 receptor activation on motor cortex plasticity in humans. *J Neurosci.* 34(7):2744–2753.

Froeliger B, Gilbert DG, McClernon FJ. 2009. Effects of nicotine on novelty detection and memory recognition performance: double blind, placebo-controlled studies of smokers and non-smokers. *Psychopharmacology (Berl).* 205:625–633.

Fujii S, Jia Y, Yang A, Sumikawa K. 2000. Nicotine reverses GABAergic inhibition of long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Brain Res* 863:259-265.

Fujii S, Sumikawa K. 2001b. Nicotine accelerates reversal of long-term potentiation and enhances long-term depression in the rat hippocampal CA1 region. *Brain Res* 894:340-346.

Ge S, Dani JA. 2005. Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation. *J Neurosci* 25:6084-6091.

Goldring S, O'Leary JL. 1950. Experimentally derived correlates between ECG and Steady Cortical Potential.

Gotti C, Clementi F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog.Neurobiol.* 74(6):363–396.

Grundey J, Thirugnanasambandam N, Kaminsky K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W, Nitsche MA. 2012a. Neuroplasticity in cigarette smokers is altered under withdrawal and partially restituted by nicotine exposition. *J Neurosci.* 32:4156–4162.

Grundey J, Thirugnanasambandam N, Kaminsky K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W, Nitsche MA. 2012b. Rapid effect of nicotine intake on neuroplasticity in non-smoking humans. *Front Pharmacol.* 3:186.

Grundey J, Freznosa S, Klinker F, Lang N, Paulus W, Nitsche MA. 2013. Cortical excitability in smoking and not smoking individuals with and without nicotine. *Psychopharmacology.* 229:653–664.

Grundey J, Amu R, Ambrus GG, Batsikadze G, Paulus W, Nitsche MA .2015. Double dissociation of working memory and attentional processes in smokers and non-smokers with and without nicotine. *Psychopharmacology (Berl).*

Hahn B, Stolerman IP. 2002. Nicotine-induced attentional enhancement in rats: effects of chronic exposure to nicotine. *Neuropsychopharmacology.* 27:712–722.

Hallett M, Chokroverty S. 2005. Magnetic stimulation in clinical neurophysiology. Philadelphia, Pa.: Elsevier Butterworth-Heinemann. 2 ed.

Heishman SJ, Taylor RC, Henningfield JE 1994. Nicotine and smoking: a review of effects on human performance. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2:1–51.

Hardingham GE, Bading H. 2003. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in neurosciences* 26:81–9.

Heishman SJ, Kleykamp BA, Singleton EG. 2010. Meta-analysis of the acute effects of nicotine and smoking on human performance. *Psychopharmacology (Berl).* 210:453–469.

Hess G, Jacobs KM, Donoghue JP. 1994. N-methyl-D-aspartate receptor mediated component of field potentials evoked in horizontal pathways of rat motor cortex. *Neuroscience.* 61:225-35.

Hess G, Aizenman CD, Donoghue JP. 1996. Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J Neurophysiol.* 75:1765-78.

Huang YY, Simpson E, Kellendonk C, Kandel ER. 2004b. Genetic evidence for the bidirectional modulation of synaptic plasticity in the prefrontal cortex by D1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3236-3241.

Huang YY, Kandel ER. 2007. 5-Hydroxytryptamine induces a protein kinase A/mitogen-activated protein kinase-mediated and macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation in the amygdala. *J Neurosci* 27:3111-3119.

Huang LT, Sherwood JL, Sun YJ, Lodge D, Wang Y. 2010. Activation of presynaptic alpha7 nicotinic receptors evokes an excitatory response in hippocampal CA3 neurons in anaesthetized rats: an in vivo iontophoretic study. *Br J Pharmacol.* 159(3):554-65.

Hummel F, Celnik P, Giraux P, Floel A, Wu WH, Gerloff C, Cohen LG. 2005. Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke. *Brain* 128(3):490-499.

Iriki A, Pavlides C, Keller A, Asanuma H. 1989. Long-term potentiation in the motor cortex. *Science.* 245:1385-7.

Iyer MB *et al.*. 2005. Safety and cognitive effect of frontal DC brain polarization in healthy individuals. *Neurology* 64:872-5.

Jacobsen LK, Krystal JH, Menci WE, Westerveld M, Frost SJ, Pugh KR. 2005. Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers. *Biological Psychiatry*. 57:56-66.

Jones GM, Sahakian BJ, Levy R, Warburton DM, Gray JA. 1992. Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 108:485-494.

Jubelt LE, Barr RS, Goff DC, Logvinenko T, Weiss AP, Evins AE. 2008. Effects of transdermal nicotine on episodic memory in nonsmokers with and without schizophrenia. *Psychopharmacology. (Berl)*. 199:89–98.

Kemp A, Manahan-Vaughan D. 2005. The 5-hydroxytryptamine₄ receptor exhibits frequency-dependent properties in synaptic plasticity and behavioural metaplasticity in the hippocampal CA1 region in vivo. *Cereb Cortex* 15:1037-1043.

Kirkwood A, Dudek SM, Gold JT, Aizenman CD, Bear MF. 1993. Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science*. 260:1518-21.

Knecht S, Breitenstein C, Bushuven S, Wailke S, Kamping S, Floel A, Zwitserlood P, Ringelstein EB. 2004. Levodopa: faster and better word learning in normal humans. *Ann Neurol* 56:20-26.

Kojic L, Gu Q, Douglas RM, Cynader MS. 1997. Serotonin facilitates synaptic plasticity in kitten visual cortex: an in vitro study. *Brain Res Dev Brain Res* 101:299-304.

Kumari V, Gray JA, ffytche DH, Mitterschiffthaler MT, Das M, Zachariah E, Vythelingum GN, Williams SC, Simmons A, Sharma T. 2003. Cognitive effects of nicotine in humans: an fMRI study *Neuroimage*. 19:1002–1013.

Kuo MF, Grosch J, Fregni F, Paulus W, Nitsche MA. 2007. Focusing effect of acetylcholine on neuroplasticity in the human motor cortex. *JNeurosci*. 27(52):14442.

Kuo MF, Paulus W, Nitsche MA. 2008. Boosting focally-induced brain plasticity by dopamine. *Cereb Cortex*. 18:648-651.

Lang N, Nitsche MA, Paulus W, Rothwell JC, Lemon RN. 2004. Effects of transcranial direct current stimulation over the human motor cortex on corticospinal and transcallosal excitability. *Exp Brain Res* 156(4):439-443.

Lang N, Hasan A, Sueske E, Paulus W, Nitsche MA. 2008. Cortical hypo excitability in chronic smokers? A transcranial magnetic stimulation study. *Neuropsychopharmacology*. 33:2517–2523.

Levin ED, Briggs SJ, Christopher NC, Rose JE. 1992. Persistence of chronic nicotine-induced cognitive facilitation. *Behav Neural Biol*. 58:152–158.

Levin ED, Simon BB. 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*. 138:217–230.

Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH. 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioural characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*. 184(3-4):523-39.

Li X, Rainnie DG, McCarley RW, Greene RW. 1998. Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci.* 18:1904–1912.

Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W. 2002. Pharmacological approach to synaptic and membrane mechanisms of DC-induced neuroplasticity in man. *Brain.* 125:2238–2247.

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

Luo L, Chen WH, Wang M, Zhu DM, She JQ, Ruan DY. 2008. Modulation of long-term potentiation by individual subtypes of muscarinic acetylcholine receptor in the rat dentate gyrus. *Hippocampus* 18:989-995.

Machaalani, R, PK Kashi, and KA Waters. 2010. Distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and beta2 in the human brainstem and hippocampal formation. *Journal of chemical neuroanatomy.* 40(3):223-31.

Maggi L, Sher E, Cherubini E. 2001. Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol.* 536:89–100.

Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.

Matsuyama S, Matsumoto A, Enomoto T, Nishizaki T. 2000. Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 12:3741-3747.

Min SK, Moon IW, Ko RW, Shin HS. 2001. Effects of transdermal nicotine on attention and memory in healthy elderly non-smokers. *Psychopharmacology (Berl).* 159(1):83-8.

Misonou H, Mohapatra DP, Park EW, Leung V, Zhen D, Misonou K, Anderson AE, Trimmer JS. 2004. Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci.* 7:711–718.

Mocking RJ, Patrick Pflanz C, Pringle A, Parsons E, McTavish SF, Cowen PJ, Harmer CJ. 2012. Effects of short-term varenicline administration on emotional and cognitive processing in healthy, non-smoking adults: a randomized, double-blind, study. *Neuropsychopharmacology* 38:476-484.

Monte-Silva K, Kuo MF, Thirugnanasambandam N, Liebetanz D, Paulus W, Nitsche MA. 2009. Dose-dependent inverted U-shaped effect of dopamine (D2-like) receptor activation on focal and nonfocal plasticity in humans. *J Neurosci.* 29:6124-6131.

Monte-Silva K, Liebetanz D, Grundey J, Paulus W, Nitsche MA. 2010. Dosage-dependent non-linear effect of L-DOPA on human motor cortex plasticity. *J Physiol.* 588:3415–3424.

Monte-Silva K, Kuo MF, Hessenthaler S, Fresnoza S, Liebetanz D, Paulus W, Nitsche MA. 2013. Induction of late LTP-like plasticity in the human motor cortex by repeated non-invasive brain stimulation. *Brain Stimul.* 6:424–432.

Mori K, Togashi H, Kojima T, Matsumoto M, Ohashi S, Ueno K, Yoshioka M. 2001. Different effects of anxiolytic agents, diazepam and 5-HT(1A) agonist tandospirone, on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Pharmacol Biochem Behav* 69:367-372.

Morris BJ, Cochran SM, Pratt JA. 2005. PCP: from pharmacology to modelling schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol* 5:101–106.

Muellbacher W, Ziemann U, Wissel J, Dang N, Kofler M, Facchini S, Boroojerdi B, Poewe W, Hallett M. 2002. Early consolidation in human primary motor cortex. *Nature* 415:640-644.

Murray TF, Leid ME. 1984. Interaction of dextrorotatory opioids with phencyclidine recognition sites in rat brain membranes. *Life Sci* 34:1899–1911.

Myers CS, Robles O, Kakoyannis AN, Sherr JD, Avila MT, Blaxton TA, Thaker GK. 2004. Nicotine improves delayed recognition in schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 174(3):334-40.

Netzer R, Pimlin P, Trube G. 1993. Dextromethorphan blocks N-methyl-D-aspartate-induced currents and voltage-operated inward currents in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol*. 238:209-16.

Newell KA, Zavitsanou K, Huang XF. 2007. Short and long term changes in NMDA receptor binding in mouse brain following chronic phencyclidine treatment. *J Neural Transm* 114:995–1001.

Nitsche MA, Paulus W. 2000. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol*. 527:633-639.

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

Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. 2003a. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*. 114:600-604.

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

Nitsche MA, Liebetanz D, Lang N, Antal A, Tergau F, Paulus W. 2003c. Safety criteria for transcranial direct current stimulation (tDCS) in humans. *Clin Neurophysiol*. 114:2220–2222

Nitsche MA, Liebetanz D, Schlitterlau A, Henschke U, Fricke K, Frommann K, Lang N, Henning S, Paulus W, Tergau F. 2004. GABAergic modulation of DC stimulation-induced motor cortex excitability shifts in humans. *Eur J Neurosci*. 19:2720–2726.

Nitsche MA, Kuo MF, Karrasch R, Wachter B, Liebetanz D, Paulus W. 2009. Serotonin affects transcranial direct current-induced neuroplasticity in humans. *Biol Psychiatry*. 66:503-508.

Nørregaard J, Tønnesen P, Simonsen K, Sawe U. 1992. Long-term nicotine substitution after application of a 16-h nicotine patch in smoking cessation. *Eur J Clin Pharmacol*. 43:57– 60.

Novak L, *et al.* 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-5.

Parent A. 2004. Giovanni Aldini: from animal electricity to human brain stimulation. *Can J Neurol Sci* 31(4):576-584.

Park SW, Jang HJ, Cho KH, Kim MJ, Yoon SH, Rhie DJ. 2012. Developmental Switch of the Serotonergic Role in the Induction of Synaptic Long-term Potentiation in the Rat Visual Cortex. *Korean J Physiol Pharmacol* 16:65-70.

Pascual-Leone A, Houser CM, Reese K, Shotland LI, Grafman J, Sato S, Valls-Sole J, Brasil-Neto JP, Wassermann EM, Cohen LG, Hallett M. 1992. Safety of rapid-rate transcranial magnetic stimulation in normal volunteers. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 89:120–130.

Pascual-Leone A, Amedi A, Fregni F, Merabet LB. 2005. The plastic human brain cortex. *Annu Rev Neurosci* 28:377-401.

Piccolino M. 1998. Animal electricity and the birth of electrophysiology: The legacy of Luigi Galvani. *Brain Research Bulletin* 46(5):381–407.

Poltavski DV, Petros T. 2005. Effects of transdermal nicotine on prose memory and attention in smokers and non-smokers. *Physiology and Behavior*. 83:833–843.

Poreisz C, *et al.* 2007. Safety aspects of transcranial direct current stimulation concerning healthy subjects and patients. *Brain Research Bulletin* 72:208-14.

Priori A, Berardelli A, Rona S, Accornero N, Manfredi M. 1998. Polarization of the human motor cortex through the scalp. *Neuroreport* 9:2257–2260.

Priori A. 2003. Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged noninvasive modulation of brain excitability. *Clinical Neurophysiology* 114:589-95.

Provost SC, Woodward R. 1991. Effects of nicotine gum on repeated administration of the Stroop test. *Psychopharmacology (Berl)* 104:536-540.

Pruszynski JA, Coderre AM, Lillicrap TP, Kurtzer I. 2007. Temporal Encoding of Movement in Motor Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience* 27:10076-10077.

Puma C, Deschaux O, Molimard R, Bizot JC. 1999. Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 9:323–327.

Purpura DP, McMurtry JG. 1964. Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *Journal of Neurophysiology* 28:166-185.

Raimundo RJS, Uribe CE, Brasil-Neto JP. 2012. Lack of clinically detectable acute changes on autonomic or thermoregulatory functions in healthy subjects after transcranial direct current stimulation (tDCS). *Brain stimulation* 5:196–200.

Riout-Pedotti MS, Friedman D, Hess G, Donoghue JP. 1998. Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci*.1:230–234.

Riout-Pedotti MS, Friedman D, Donoghue JP. 2000. Learning-induced LTP in neocortex. *Science*. 290:533–536.

Romanelli F, Smith KM. 2003. Dextromethorphan abuse: clinical effects and management. *J Am Pharm Assoc* 49:20–25.

Rothwell JC. 1993. Evoked potentials, magnetic stimulation studies, and event-related potentials. *Current opinion in neurology* 6:715-723.

Schadel M, Wu D, Otton SV, Kalow W, Sellers EM. 1995. The pharmacokinetics of dextromethorphan and metabolites in humans: influence of the CYP2D6 phenotype and quinidine inhibition. *J ClinPsychopharmacol.* 15(4):263-269.

Schilstrom B, Svensson HM, Svensson TH, Nomikos GG. 1998. Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience.* 85:1005-1009.

Silvasti M, Karttunen P, Tukiainen H. 1987. Pharmacokinetics of dextromethorphan and dextrorphan: a single dose comparison of three preparations in human volunteers. *Int J ClinPharmacolTherToxicol.* 9:493-497.

Sinner B, Graf BM. Ketamine. 2008. *Handb Exp Pharmacol* 313-333.

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

Stefan K, Kunesch E, Cohen LG, Benecke R, Classen J. 2000. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain.* 123(Pt 3):572-84.

Stefan K, Kunesch E, Benecke R, Cohen LG, Classen J. 2002. Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation. *J Physiol.* 543(Pt 2):699-708.

Summers KL, Kem WR, Giacobini E. 1997. Nicotinic agonist modulation of neurotransmitter levels in the rat fronto parietal cortex. *Jpn J Pharmacol.* 74:139-146.

Swan GE, Lessov-Schlaggar CN. 2007. The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. *Neuropsychol Rev.* 17:259-273.

Thickbroom GW. 2007. Transcranial magnetic stimulation and synaptic plasticity: experimental framework and human models. *Experimental Brain Research.* 180:583-93.

Thirugnanasambandam N, Grundey J, Adam K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W, Nitsche MA. 2011. Nicotinic impact on focal and non-focal neuroplasticity induced by non-invasive brain stimulation in non-smoking humans. *Neuropsychopharmacology.* 36:879-886.

Tortella FC, Pellicano M, Bowery NG. 1989. Dextromethorphan and neuro modulation: old drug coughs up new activities. *Trends PharmacolSci.* 10:501-7.

Vines BW, Schnider NM, Schlaug G. 2006. Testing for causality with transcranial direct current stimulation: pitch memory and the left supramarginal gyrus. *Neuroreport* 17(10):1047-1050.

Wagner T, Valero-Cabre A, Pascual-Leone A. 2007. Noninvasive human brain stimulation. *Annual review of biomedical engineering* 9:527-65.

Walsh V, Pascual-Leone A. 2003. *Transcranial magnetic stimulation : a neurochronometrics of mind.* Cambridge, Mass.: MIT Press.

Wassermann EM, Epstein CM, Ziemann U. 2008. *Oxford handbook of transcranial stimulation.* Oxford University Press.

White HK, Levin ED. 1999. Four-week nicotine skin patch treatment effects on cognitive performance in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)*. 143:158–165.

Wilson AL, Langley LK, Monley J, Bauer T, Rottunda S, McFalls E, Kovera C, McCarten JR. 1995. Nicotine patches in Alzheimer's disease: pilot study on learning, memory, and safety. *Pharmacol Biochem Behav*. 51:509–514.

Wilson MD, Ferguson RW, Mazer ME, Litovitz TL. 2011. Monitoring trends in dextromethorphan abuse using the National Poison Data System: 2000–2010. *Clin Toxicol (Phila)* 49:409–415.

Winters BD, Bussey TJ. 2005. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur J Neurosci* 21:2263-2270.

Wolters A, Sandbrink F, Schlottmann A, Kunesch E, Stefan K, Cohen LG, Benecke R, Classen J. 2003. A temporally asymmetric Hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex. *J Neurophysiol*. 89(5):2339-45.

Wong BY, Coulter DA, Choi DW, Prince DA. 1988. Dextropropranolol and dextromethorphan, common antitussives, are antiepileptic and antagonize N-methyl-D-aspartate in brain slices. *Neurosci Lett*. 85:261-6.

Wonnacott S. 1990. The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol Sci*. 11:216–219.

Ziaee V, Akbari HE, Hoshmand A, Amini H, Kebriaeizadeh A, Saman K. 2005. Side effects of dextromethorphan abuse, a case series. *Addict Behav* 30:1607–1613.

Ziemann U, Chen R, Cohen LG, Hallett M. 1998a. Dextromethorphan decreases the excitability of the human motor cortex. *Neurology*. 51:1320-4.

Ziemann U. 2004. TMS and drugs. *Clinical Neurophysiology* 115:1717-1729.

Ziemann U, Siebner HR. 2008. Modifying motor learning through gating and homeostatic metaplasticity. *Brain Stimul*. 1:60–66.

8. ANEXO

8.1 Manuscrito

Title: Mechanisms of nicotinic modulation of glutamatergic neuroplasticity in humans

Short Title: nAChR impact on neuroplasticity

Authors: Marcelo Di Marcello Valladão Lugon^{a,b}, MSc; Giorgi Batsikadze^b, PhD; Shane Fresnoza^b, PhD; Jessica Grundey^b, MD; Min-Fang Kuo^b MD, PhD; Walter Paulus^b, MD; Ester Miyuki Nakamura-Palacios^{*a}, MD, PhD; Michael A. Nitsche^{*b,c,d}, MD

^aLaboratory of Cognitive Sciences and Neuropsychopharmacology, Program of Post-Graduation in Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória-ES, Brazil

^bDepartment of Clinical Neurophysiology, University Medical Center, Georg-August-University, Göttingen 37075, Germany

^cLeibniz Research Centre for Working Environment and Human Resources, Dortmund, Germany

^dDepartment of Neurology, University Medical Hospital Bergmannsheil, Bochum, Germany

Corresponding Author: Dr Michael A. Nitsche, Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Resources, Ardeystr. 67, 44139 Dortmund, Germany. Email: mnitsch1@gwdg.de

*Ester Miyuki Nakamura-Palacios and Michael A. Nitsche contributed equally to this study.

Abstract

The impact of nicotine (NIC) on plasticity is thought to be primarily determined via calcium channel properties of nicotinic receptor subtypes, and glutamatergic plasticity is likewise calcium-dependent. Therefore glutamatergic plasticity is likely modulated by the impact of nicotinic receptor-dependent neuronal calcium influx. We tested this hypothesis for transcranial direct current stimulation (tDCS) -induced long-term potentiation-like plasticity, which is abolished by nicotine in non-smokers. To reduce calcium influx under NIC, we blocked NMDA receptors. We applied

anodal tDCS combined with 15 mg nicotine patches and the NMDA receptor antagonist dextromethorphan (DMO) in three different doses (50, 100 and 150 mg) or placebo medication. Corticospinal excitability was monitored by single-pulse transcranial magnetic stimulation (TMS)-induced motor evoked potential (MEP) amplitudes after plasticity induction. NIC abolished anodal tDCS-induced motor cortex excitability enhancement, which was restituted under medium dosage of DMO. Low-dosage DMO did not affect the impact of nicotine on tDCS-induced plasticity and its high-dosage abolished plasticity. For DMO alone, the low dosage had no effect, but medium and high dosages abolished tDCS-induced plasticity. These results enhance our knowledge about the proposed calcium-dependent impact of nicotine on plasticity and might be relevant for the development of novel nicotinic treatments for cognitive dysfunction.

Keywords: dextromethorphan, neuroplasticity, nicotine, nicotinic receptors, transcranial direct current stimulation

Introduction

Nicotine (NIC), a tertiary amine compound, is the primary psychoactive agent of tobacco smoke and is responsible for its addictive properties (Heishman *et al.* 1994; Levin *et al.* 2006). Beyond its addictive component, nicotine has prominent effects on cognition (Grundey *et al.* 2012a, 2012b). Studies in animals and humans have shown that nicotine enhances acquisition, consolidation, and restitution of learned material (Arendash *et al.* 1995a; Puma *et al.* 1999; Levin *et al.* 2006), as well as improves attention, motor functions, working, and episodic memory (Min *et al.* 2001; Hahn and Stolerman 2002; Kumari *et al.* 2003; Jubelt *et al.* 2008; Froeliger *et al.* 2009; Heishman *et al.* 2010). Nicotine also improves learning and attention in patients suffering from Alzheimer's disease (Wilson *et al.* 1995; White and Levin 1999).

Nicotinic receptors (nAChR) form a heterogeneous family of ligand-gated ion channels that are differently expressed in many regions of the Central Nervous System (CNS) and, furthermore, modulate the effects of a wide diversity of transmitter pathways, including the cholinergic system itself, by both post- and presynaptic mechanisms, and dopamine, serotonin, norepinephrine, glutamate/N-methyl-D-aspartate (NMDA), GABA, opioid, and histaminergic systems (Levin and Simon 1998; Gotti and Clementi 2004), which are implicated in the generation and modulation of plasticity, which is thought to be the main physiological foundation for learning and memory formation (Riout-Pedotti *et al.* 1998, 2000). The molecular basis for the functional heterogeneity of nAChRs is the existence of a gene family

encoding at least nine α " $\alpha_2 - \alpha_{10}$ " and three β " $\beta_2 - \beta_4$ " subunits (Gotti and Clementi 2004).

Both, $\alpha_4\beta_2$ and α_7 nicotinic receptors, which are ligand-gated cation channels, appear to be critical for functional effects of nicotine and its impact on cortical excitability and neuroplasticity (Burnashev 1998; Dajas-Bailador and Wonnacott 2004). These receptors, which are widely expressed throughout the CNS, influence synaptic plasticity and cognitive function by regulating calcium permeability as well as neurotransmitter release (Lisman 2001; Gotti and Clementi 2004; Browne *et al.* 2010; Huang *et al.* 2010).

In recent years, non-invasive brain stimulation protocols have been developed which enable the generation of long-term potentiation (LTP)- and long-term depression (LTD)-like plasticity in humans (Ziemann *et al.* 2008). Transcranial direct current stimulation (tDCS) induces cortical excitability modifications by long-lasting tonic subthreshold stimulation via electrodes positioned over cortical areas and thus produces a relatively non-focal kind of plasticity, whose direction depends on the direction of current flow (Nitsche and Paulus 2000, 2001; Nitsche *et al.* 2003a). This protocol induces NMDA- and calcium channel-dependent plasticity (Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b, 2004). Anodal tDCS over the motor cortex has a subthreshold depolarizing effect on neuronal membranes, thus resulting in enhanced excitability, while cathodal tDCS has antagonistic effects (Nitsche and Paulus 2000). Stimulation for some minutes results in respective neuroplastic excitability alterations, which outlast the stimulation for more than one hour (Nitsche and Paulus 2001; Nitsche *et al.* 2003b). Paired associative Stimulation (PAS) is another non-invasive brain stimulation technique, which induces more focal plasticity with combined activation of the primary motor cortex and somatosensory afferents. Dependent on synchronous or a-synchronous stimulation, LTP- or LTD-like plasticity of somatosensory-motor cortex connections is induced, which, similar to the kind of plasticity induced by tDCS, is glutamatergic and calcium-dependent (Stefan *et al.* 2000; Wolters *et al.* 2003).

The impact of the cholinergic system on both kinds of plasticity was explored in recent years in the human motor cortex as a model system. In accordance with the focusing hypothesis of acetylcholine, focal facilitatory PAS-induced plasticity was strengthened and prolonged, while non-focal tDCS-generated facilitatory plasticity was abolished under the cholinesterase-inhibitor rivastigmine (Kuo *et al.* 2007). These effects seem to be primarily controlled by nicotinic receptors, since in non-smokers nicotine likewise converted the non-focal effects of anodal tDCS to inhibition, and prolonged the effects of focal plasticity induction (Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2012b). Moreover, these effects depend on nicotinic receptors with calcium channel properties, since varenicline, a high-affinity partial agonist to $\alpha_4\beta_2$ and full agonist to α_7 , had comparable effects on tDCS- and PAS-induced plasticity (Batsikadze *et al.* 2014).

These effects of nicotine and nicotinic agents on facilitatory plasticity are compatible with a calcium-dependent mechanism. However, at present it is unclear why nicotine in non-smokers abolished tDCS-induced facilitatory plasticity. Given the calcium hypothesis of plasticity, dependent on the amount of neuronal calcium concentration, long term potentiation (LTP) or depression (LTD) is induced. For LTP induction, higher calcium concentration as for LTD induction is required. Moreover, transition zones between LTP and LTD induction do exist, and too high calcium concentration might prevent LTP by potassium channel activation (Lisman 2001; Misonou *et al.* 2004). Possibly anodal tDCS results in larger calcium influx than facilitatory PAS due to tonic stimulation via relatively large electrodes, and thus addition of nicotine results in a respective calcium overflow in case of tDCS, which then converts plasticity. Indeed such calcium-dependent non-linear plasticity alterations have been demonstrated for tDCS (Monte-Silva *et al.* 2013; Batsikadze *et al.* 2014).

In the present study, we aimed to further elucidate the mechanism by which the activation of nicotinic receptors alters neuroplasticity in humans, especially with regard to calcium-dependent mechanisms, and interaction with the glutamatergic system. We therefore combined anodal non-focal LTP-like plasticity-inducing tDCS under nicotine with NMDA receptor block by dextrometorphan (DMO). If nicotine abolishes or converts tDCS-induced plasticity via enhanced calcium influx, then reduction of calcium influx via NMDA receptor block should help to recover plasticity under specific dosages. Specifically we hypothesized that blocking NMDA receptors to different degrees should have non-linear effects on anodal tDCS-induced plasticity: small and medium dosages of NMDA receptor block should re-establish facilitatory plasticity under nicotine due to a gradual diminution of calcium influx, whereas high-dosage NMDA receptor block should abolish plasticity.

Materials and Methods

Subjects

Thirteen healthy human volunteers (5 males/ 8 females) aged 26.4 ± 4.0 years were recruited. All of them were non-smokers, none of them had smoked tobacco for at least 3 years before the study. All subjects were right-handed according to the Edinburgh handedness inventory (Oldfield 1971). None of them took any medication, had a history of a neuropsychiatric or medical disease, present pregnancy, or metallic head implants. All volunteers gave written informed consent and were compensated for participation. The experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Göttingen and conformed to the Declaration of Helsinki.

Transcranial Direct Current Stimulation

tDCS was administered by a battery-driven constant current stimulator (neuroConn GmbH, Ilmenau, Germany) through a pair of rubber electrodes covered with saline soaked sponges (5×7 cm). The motor cortex electrode was fixed over the area

representing the right abductor digiti minimi muscle (ADM) and the return electrode contralaterally above the right supraorbital ridge. The connecting cables were positioned at the electrodes in posterior direction. Subjects received 1 mA of excitability-enhancing anodal tDCS for 13 min, which induces motor cortex excitability alterations lasting for approximately 60 min after stimulation (Nitsche and Paulus 2001; Nitsche *et al.* 2003a), combined with all drug conditions or placebo (PLC) medication in different experimental sessions.

Monitoring of motor cortex excitability

Transcranial magnetic stimulation (TMS)-elicited motor evoked potentials (MEP) were recorded to measure excitability changes of the representational motor cortical area of the right ADM. Single pulse TMS was conducted by a Magstim 200 magnetic stimulator (Magstim Company, Whitland, Dyfed, UK) at a frequency of 0.25 Hz with a figure of eight-shaped coil (diameter of one winding 70mm, peak magnetic field, 2.2 T). The coil was held tangentially to the scalp at an angle of 45° to the sagittal plane with the coil handle pointing laterally and posterior. The optimal position was defined as the site where stimulation resulted consistently in the largest MEPs. Surface EMG was recorded from the right ADM with Ag–AgCl electrodes in a belly-tendon montage. The signals were amplified and filtered with a time constant of 10 ms and a low-pass filter of 2.5 kHz, then digitized at an analog-to-digital rate of 5 kHz and further relayed into a laboratory computer using the Signal software and CED 1401 hardware (Cambridge Electronic Design). TMS intensity was adjusted to elicit, on average, baseline MEPs of 1 mV peak-to-peak amplitude and kept constant for the post-tDCS measures. MEPs were stored for offline analysis.

Pharmacological intervention

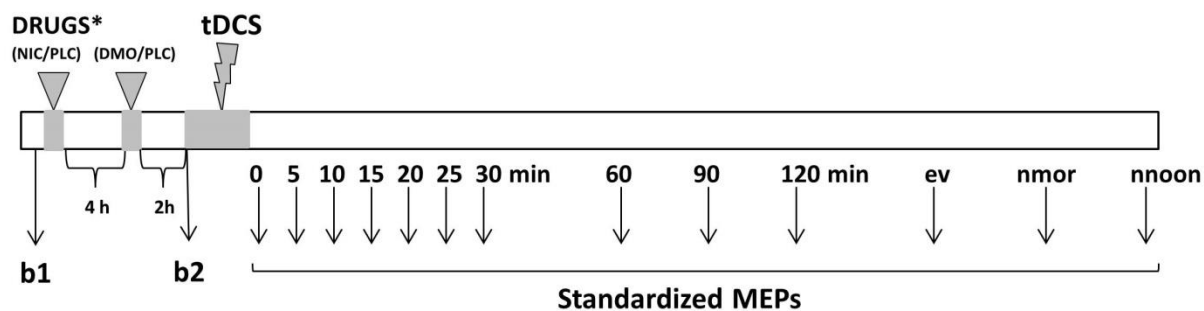
Nicotine transdermal patches (Nicorette Depotpflaster, Pfizer, releasing 15 mg nicotine over 16 h) or placebo patches were applied to all subjects in combination with DMO or placebo capsules under anodal tDCS. Related dosages of nicotine have been shown to affect cognition (Min *et al.* 2001; Myers *et al.* 2004; Poltavski and Petros 2005) and are sufficient to influence central nervous system physiology (Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2012a, 2013, 2015). The patch was applied 6 h before the start of the stimulation. This is the approximate time for the plasma level to reach its maximum following application of the patch (Nørregaard *et al.* 1992). The patch was retained until the end of the last measurements of the experiment on the afternoon of the second day. To counteract possible systemic side effects of nicotine, participants were instructed to take 20 mg domperidone, a peripheral-acting dopamine D2-receptor antagonist (Barone 1999) with antiemetic effects, in case of need. Domperidone at 20 mg alone exerts no effects on motor cortical excitability (Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2013).

Dextromethorphan was administered in dosages of 50, 100, or 150 mg in different sessions of the experiments. DMO blocks NMDA receptors (Tortella *et al.* 1989;

Franklin and Murray 1992; Netzer *et al.* 1993; Wong *et al.* 1988), which have calcium channel properties and are relevant for glutamatergic plasticity induction (Artola and Singer 1987; Iriki *et al.* 1989; Kirkwood *et al.* 1993; Hess *et al.* 1994, 1996). For this drug, the maximal plasma level is achieved two hours after oral intake (Silvasti *et al.* 1987; Schadel *et al.* 1995), and the respective dosages suffice to elicit prominent effects in the central nervous system (Ziemann *et al.* 1998; Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b; Monte-Silva *et al.* 2013).

Experimental procedures

First, subjects were seated comfortably in a chair with head- and armrest and asked to relax completely. EMG electrodes were placed over the right ADM as described above. The exact position of these electrodes was marked with a pen. Then TMS was applied over the left representational area of the right ADM to determine the spot with the consistently highest MEPs in the resting ADM (optimal site), which was then marked with a waterproof pen. TMS-intensity was adjusted to elicit MEP with peak-to-peak amplitudes of an average of 1 mV (S1mV). Then, 25 MEPs were recorded for the determination of the first baseline (baseline 1 = b1). After baseline recording, Nicotine patch or placebo patch was adhered to the left upper arm and remained there until the end of the last after-measurement at the following afternoon. 4 h after patch application, dextromethorphan, at one of the above-mentioned dosages, or placebo medication was administered. 6 hours after patch application, again 25 MEPs were recorded and, if needed, TMS intensity was adjusted to 1 mV (baseline 2 = b2). After that procedure, the anodal tDCS protocol was administered, followed by immediate recording of at least 25 MEPs at time points of 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 and 120 minutes. Further after-measurements were conducted in the evening (ev) of the stimulation day, next morning (nmor) and afternoon (nnoon). Sessions were conducted in randomized order, and an inter-session interval of at least one week was obligatory to avoid interferences. All participants received anodal tDCS under nicotine only, dextromethorphan only, sham medication conditions only, and combinations of dextromethorphan and nicotine. This resulted in 8 sessions per subject (Fig. 1).



***DRUGS:** (1) PLC + PLC, (2) PLC + DMO 50, (3) PLC + DMO 100, (4) PLC + DMO 150
 (5) NIC + PLC, (6) NIC + DMO 50, (7) NIC + DMO 100, (8) NIC + DMO 150

Figure 1. Course of the study: after adjusting the TMS-intensity to elicit MEP amplitudes of 1mV (S1mV), 25 MEPs were recorded at this stimulus intensity and the mean MEP amplitude was calculated (b1). Then a NIC or PLC patch was adhered to the left upper arm. 4 h after patch application, DMO at one of the dosages 0 (PLC medication), 50, 100, 150 mg was administered. Then, 6 hours after patch application, again 25 MEPs were recorded at the adjusted baseline stimulus intensity and the mean MEP amplitude was calculated (b2). Then anodal tDCS was administered, followed by immediate recording of 25 MEPs at the time points 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120 minutes, in the evening (ev) of the stimulation day and in the morning (nmor) and afternoon of the day following the plasticity induction procedure (nnoon).

Analysis and Statistics

The individual means of the 25 MEP amplitudes recorded at baselines 1, 2 and all time points after plasticity induction were calculated. The post-intervention mean MEP amplitudes from each subject were then normalized to the respective individual mean baseline (baseline 2) MEP-amplitude (quotient of post- versus pre-intervention MEP amplitudes). Then, these normalized MEP amplitudes were pooled together sessionwise by calculating the grand average across subjects for each condition and time point. A repeated measures ANOVA was performed on the above-mentioned data. MEP amplitude was the dependent variable including all time-points up to next afternoon after tDCS. Nicotine (NIC/PLC), dextromethorphan (50, 100, 150 mg DMO/PLC) and time points were included as within-subjects factors. Mauchly's sphericity test was performed and Greenhouse–Geisser correction applied when necessary.

Conditional on significant results of the ANOVA, exploratory Student's t-tests (paired samples, two-tailed, $p < 0.05$, not corrected for multiple comparisons) were performed to compare the MEP amplitudes before and after the interventional brain stimulations within each condition for each time point, as well as for TMS-intensities between different medication conditions within a given time bin. A p -value of < 0.05 was considered significant for all statistical analyses. All results are given as mean and standard error of mean (SEM).

To compare effects of nicotine and different dosages of DMO on plasticity, additionally averaged MEPs for the first 30 min after stimulation were calculated for each subject per experimental session and normalized to baseline 2. Then, these averaged MEP values for each dosage condition were compared with the respective placebo condition by a repeated measures ANOVA including the within subject factors NIC and DMO.

To check for drug-induced alterations of MEP amplitude and the percentage of maximum TMS stimulator output (%MSO) to acquire the baseline MEP amplitude of 1 mV, as well as for identity of MEP amplitudes and %MSO between medication conditions, these values were compared before (b1) and after drug administration (b2), and within b1 and b2 between medication groups. An ANOVA was performed for MEP amplitude values and %MSO for b1 and 2, and medication condition as within subject factors.

Results

Four hours after nicotine patch application three subjects experienced mild nausea and two subjects vomited. Six hours after nicotine patch application with oral intake of 150 mg of Dextromethorphan five subjects experienced mild nausea. All subjects were instructed to take 20 mg domperidone in case of need. No side effects were reported under 50 or 100 mg of DMO. The remaining subjects tolerated the drugs well.

Comparison of baselines values resulted in a significant effect for the factor time in the ANOVA for TMS-intensity [$F_{(1,12)} = 2.28$, $p = 0.04$]. This was caused by a significant difference between baseline 1 and 2 for the NIC/DMO150 condition (Table 1). No other difference between baseline values was identified.

Table 1

MEP amplitudes and stimulation intensity before and after drugs administration (b1 and b2)

TMS Parameter	Medication condition	Baseline 1	Baseline 2
MEP	PLC/PLC	0.91 ± 0.04	0.92 ± 0.04
%MSO		59.69 ± 2.13	61.00 ± 2.29
MEP	PLC/DMO50	0.94 ± 0.05	0.97 ± 0.03
%MSO		63.38 ± 3.17	62.77 ± 3.26
MEP	PLC/DMO100	0.93 ± 0.05	1.04 ± 0.06
%MSO		62.23 ± 2.74	60.46 ± 3.34
MEP	PLC/DMO150	0.96 ± 0.03	1.04 ± 0.03
%MSO		64.15 ± 3.40	63.08 ± 3.29
MEP	NIC/PLC	0.96 ± 0.03	0.96 ± 0.03
%MSO		63.00 ± 3.55	62.92 ± 3.76
MEP	NIC/DMO50	0.88 ± 0.04	0.99 ± 0.03
%MSO		63.15 ± 3.81	61.92 ± 3.28
MEP	NIC/DMO100	0.99 ± 0.03	0.98 ± 0.03
%MSO		63.54 ± 3.41	63.31 ± 3.39
MEP	NIC/DMO150	0.95 ± 0.03	0.95 ± 0.04
%MSO		64.77 ± 2.94	60.69 ± 3.01**

Note. Shown are the mean MEP amplitudes ± SEM and stimulation intensity (percentage of maximum stimulator output, %MSO) mean ± SEM of baselines 1 and 2. The intensity of TMS was adjusted to elicit MEPs with a peak-to-peak amplitude of approximately 1 mV (baseline 1). A second baseline (baseline 2) was recorded 6 h after patch application to determine the impact of the drugs on cortical excitability. ** $p < 0.01$ when compared to Baseline 1 (Repeated measures ANOVA).

The principal ANOVA conducted for the main experiment revealed a significant main effect for the factor Time [$F_{(13,143)} = 4.511$; $p < 0.0001$] and a significant 3-way interaction across Nicotine, DMO doses and Time [$F_{(39,429)} = 1.716$; $p < 0.01$].

Effect of NMDA receptor block on tDCS-induced plasticity

As revealed by post hoc Student's t-tests, in the placebo medication condition MEPs were significantly ($p < 0.05$) enhanced for up to 30 min after anodal tDCS when compared with respective baseline values. Under doses of 50 mg DMO, the obtained MEPs did not differ from those obtained under placebo medication up to 90 min after tDCS. Under 100 mg DMO, the *post-hoc* analysis shows that MEP amplitudes did not differ from baseline values for any time point, but differed significantly from the placebo medication condition immediately after tDCS ($p < 0.01$), 10 min ($p < 0.05$), 20 min ($p < 0.05$) and 30 min after tDCS ($p < 0.05$). The MEP amplitudes obtained for the highest dose of DMO also did not differ from baseline values for up to the last measure at the day of stimulation, and were significantly altered as compared with the respective placebo medication condition at the 25 min interval ($p < 0.05$) (Fig. 2).

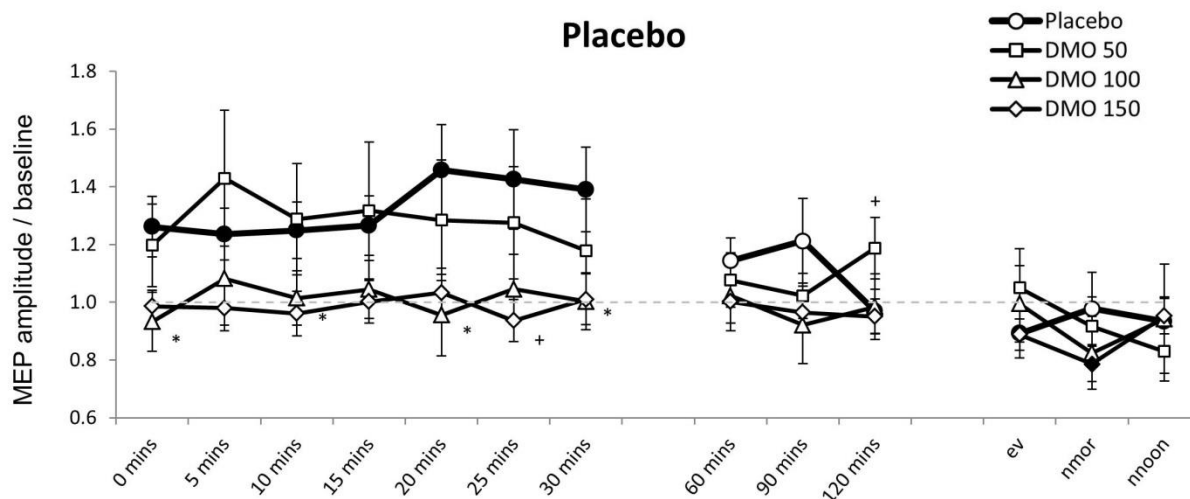


Figure 2. NMDA receptor antagonist DMO effects on tDCS-induced facilitatory plasticity. The graph shows baseline-standardized motor-evoked potential (MEP) amplitudes on the Y axis plotted at different time points following anodal tDCS under PLC medication or doses of 50, 100 and 150 mg DMO up to the afternoon of the post-stimulation day. In the PLC medication conditions, anodal tDCS induced a significant excitability elevation for up to 30 min after stimulation, which was abolished by 100 and 150 mg DMO. 50 mg DMO intake did not affect tDCS-induced plasticity. Filled symbols indicate statistically significant deviations of post-stimulation MEP amplitudes from respective baseline values as well as * indicate significant differences between the placebo and DMO100 condition and + indicate significant differences between the placebo and DMO150 condition for the same time points (Student's *t*-test, two tailed, paired samples, $p < 0.05$). Error bars indicate standard error of mean.

The impact of nicotine under NMDA receptor block on tDCS-induced plasticity

Under application of nicotine patch without DMO, Student's *t*-tests analysis showed that the tDCS-induced excitability enhancement was abolished. However, when combined with 100 mg DMO, facilitatory plasticity was reestablished. MEPs were significantly enhanced for 25 min after anodal tDCS when compared with the respective baseline values. MEPs under this drug combination differed also significantly from the nicotine without DMO condition 10 ($p < 0.01$), 15 ($p < 0.01$) and 20 min after tDCS ($p < 0.05$). MEPs under nicotine patch with low dose DMO did not differ from baseline or nicotine patch without DMO at any time point. For high dose DMO combined with nicotine, MEPs differed from baseline values and the nicotine without DMO condition only at a single time point (Fig. 3).

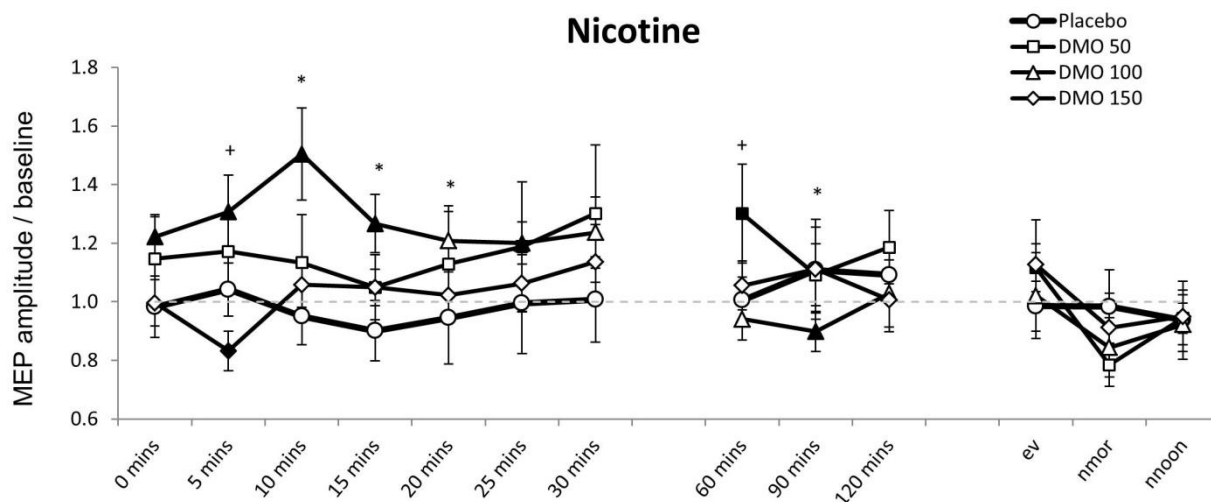


Figure 3. Nicotinic impact and its interaction with different doses of DMO on tDCS-induced neuroplasticity. The graph shows baseline-standardized motor-evoked potential (MEP) amplitudes on the Y axis plotted at different time points following anodal tDCS under NIC patch and DMO-doses of 50, 100 and 150 mg or PLC medication up to the afternoon of the post-stimulation day. Under administration of NIC/PLC the tDCS-induced excitability enhancement was abolished. Under NIC/DMO 100 mg, facilitatory plasticity was reestablished and MEPs were significantly enhanced for 25 min after anodal tDCS, when compared with the respective baseline values. The MEPs of NIC/DMO under 50 and 150 mg DMO were not relevantly different from baseline and the NIC/PLC condition at any time point. Filled symbols indicate statistically significant deviations of post-stimulation MEP amplitudes from respective baselines, as well as * indicate significant differences between the NIC/PLC and NIC/DMO100 condition and + indicate significant differences between NIC/PLC and NIC/DMO150 condition for the same time points (Student's *t*-test, two tailed, paired samples, $p < 0.05$). Error bars indicate standard error of mean.

Comparison of nicotine and different dosages of DMO up to 30 min after anodal tDCS

For the grand average calculated for the first 30 min, the ANOVA revealed significant effects for the 2-way interaction between NIC and DMO doses [$F_{(3,36)} = 4.222$; $p < 0.05$].

Student's *t*-tests showed that a medium dose of DMO had a significant re-establishing effect on anodal tDCS-induced excitability plasticity, which was abolished by NIC alone ($p < 0.01$). Low and high dosages of DMO did not show this effect. In the placebo patch condition, medium and high doses of DMO had significant abolishing effects on the tDCS-induced excitability enhancement ($p < 0.05$) (Fig. 4).

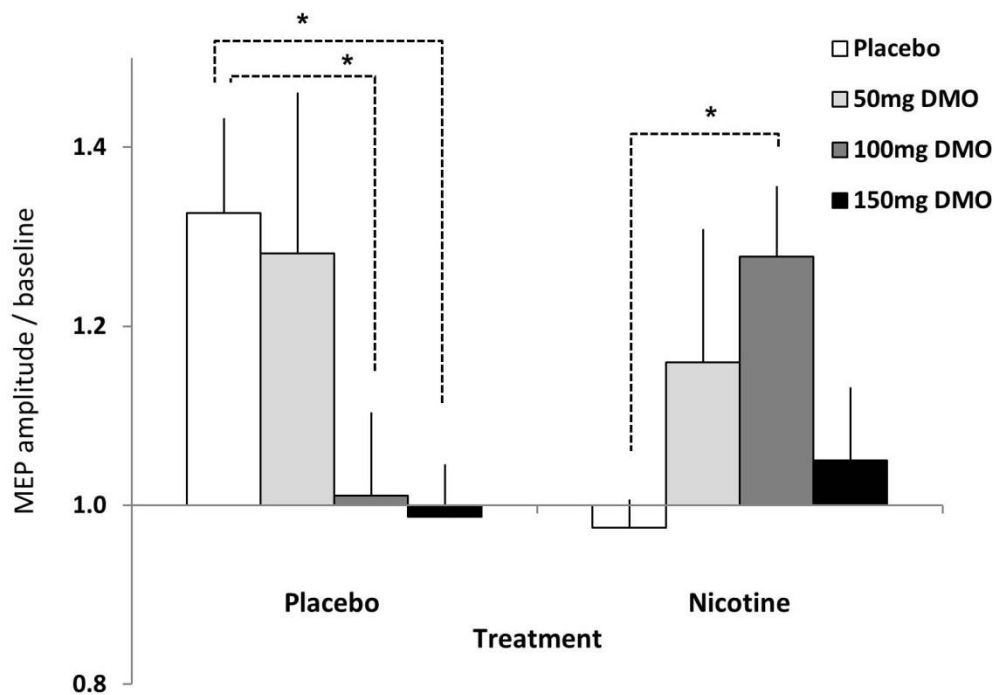


Figure 4. Impact of NIC and different dosages of DMO on tDCS-induced facilitatory plasticity for MEP pooled for 30 min after tDCS. Facilitatory plasticity is selectively reestablished by 100 mg DMO under nicotine administration. NIC alone abolishes anodal tDCS-induced plasticity. Medium and High doses of DMO abolished tDCS-induced facilitatory plasticity in the placebo patch condition. Each column represents the mean of baseline-normalized MEP \pm SEM amplitudes until 30 min after stimulation. * indicate significant differences between PLC/DMO and PLC/PLC or NIC/DMO and NIC/PLC (Student's *t*-test, two tailed, paired samples, $p < 0.05$).

Discussion

The results of this study show a relevant interaction between nicotinic receptor activation and glutamatergic plasticity controlled by alterations of calcium influx. Nicotine alone abolished LTP-like plasticity induced by anodal tDCS likely via calcium overflow. Reduction of calcium influx via NMDA receptor block re-established plasticity dosage-dependently. These results stress the neuromodulatory effect of nicotine on glutamatergic plasticity. Taking into account that LTP is a relevant physiological foundation of learning and memory formation, this might also explain partially heterogeneous effects of nicotine on cognitive processes.

For the separate NIC and DMO conditions, the results are fairly identical with those of previous studies, which explored the impact of these drugs on tDCS-induced plasticity (Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b; Kuo *et al.* 2007; Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2012b).

For MEP comparisons between drug administrations before tDCS, the only significant effect shown for TMS-intensity after NIC/DMO150 application can be speculated to be due to arousal caused by side effects, however, it should not relevantly affect the results, since MEPs were identical to the other medication conditions after adjustment.

Proposed Mechanisms of Action

Nicotinic acetylcholine receptors are widely expressed throughout the central nervous system and are known to be involved in various complex cognitive functions such as attention, learning, memory consolidation, arousal and sensory perception (Levin *et al.* 1992; Albuquerque *et al.* 2009).

In the brain, the predominant subtypes of functional nAChR are the homomeric α_7 and the heteromeric $\alpha_4\beta_2$ receptor (Alkondon and Albuquerque 2004; Machaalani *et al.* 2010). Both receptors increase intracellular calcium levels by serving as pre- and post-synaptic ligand-gated calcium channels (Burnashev 1998; Dajas-Bailador and Wonnacott 2004). Several studies have shown that α_7 nAChRs can modulate the release of various neurotransmitters including glutamate, GABA, dopamine and noradrenaline and thus have the potential to participate in a range of neurological functions (Summers *et al.* 1997; Alkondon *et al.* 1997, 1999; Li *et al.* 1998; Schilstrom *et al.* 1998; Maggi *et al.* 2001; Huang *et al.* 2010).

The plasticity-abolishing effects of nicotine with regard to tDCS-induced facilitatory plasticity in the present study is in line with the results of previous ones (Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2012a, 2012b, 2013), in which global nicotinic receptor activation resulted in abolishment of these kinds of plasticity. The results of a recently conducted study, in which the $\alpha_4\beta_2$ and α_7 receptor agonist varenicline had comparable effects, suggest a relevant role of calcium in these effects (Batsikadze *et al.* 2014).

We hypothesized that addition of nicotine to anodal tDCS will increase calcium concentration to a level that overshoots the concentration window for LTP induction (Thirugnanasambandam *et al.* 2011; Grundey *et al.* 2012a, 2012b). To test this, we blocked calcium influx by an NMDA receptor blocker. In accordance with our hypothesis, under administration of nicotine and 100 mg DMO a re-establishment of facilitatory plasticity was observed, suggesting that the calcium-decreasing effects of DMO under this dose were sufficient to reduce calcium concentration to a level which induces LTP.

The DMO 50 mg intake under nicotine application however did not re-establish tDCS-generated facilitatory plasticity significantly, probably caused by an insufficient reduction of calcium influx by this low dosage, which is in line with its missing effect on tDCS-induced plasticity when given alone. The high dosage DMO condition (150

mg) was already known to block tDCS-generated plasticity independent from nicotinic receptor activation in a couple of studies, including the present one (Liebetanz *et al.* 2002; Nitsche *et al.* 2003b; Monte-Silva *et al.* 2013), and it is likely that this dosage blocks NMDA receptors and prevents calcium influx to a degree which cannot be compensated by nicotine-driven calcium influx.

Taken together, these results are highly suggestive for an impact of nicotine on plasticity via modulation of intracellular calcium concentration. Due to the calcium-dependency of LTP and LTD (Lisman 2001; Misonou *et al.* 2004), this can explain not only plasticity-enhancing, but also –reducing effects of the substance, depending on brain states, including other sources of calcium influx, as introduced here by stimulation-induced plasticity. The relevance of these mechanisms for plasticity-related cognitive and behavioural processes awaits yet to be explored systematically.

General Remarks

This study demonstrates that the modulatory effect of nicotine on tDCS-induced LTP-like plasticity depends on calcium influx, and NMDA receptors activation. The results are suggestive for a critical amount of calcium influx necessary for LTP induction by tDCS. Further enhancement of calcium influx by nicotine results in calcium overflow, which reduces or abolishes respective effects in healthy non-smokers as shown by the re-introduction of LTP-like plasticity by reduction of calcium influx via NMDA receptor block. Consequently, this effect depends on the amount of NMDA receptor block, since too low inhibition will not result in sufficient calcium influx reduction, and too large inhibition will reduce calcium influx to an amount that will not induce LTP anymore.

These suggested mechanistic effects might explain also the signal-to-noise enhancing effects of nicotine with regard to LTP-like plasticity. Noisy activation of cortical networks, as accomplished by tDCS, which results in a long-lasting activity enhancement of cortical networks, will likely result in larger calcium influx as compared to relatively non-noisy conditions, where a more limited number of neurons is activated for shorter duration, as it is the case in PAS. Therefore, noisy cortical activity patterns might be more prone to calcium overflow and thus conversion of LTP-like plasticity. This hypothetical explanation should be explored more directly in future studies.

These physiological mechanisms might also at least partially explain the effects of nicotine on cognition. Beyond positive effects on various cognitive processes, also none or negative effects were described (Levin 2002; Kumari *et al.* 2003; Jacobsen *et al.* 2005; Swan *et al.* 2007; Grundey *et al.* 2015). This at least partially heterogeneous effect of nicotine might be explained by its non-linear physiological effects.

Moreover, the impact of nicotine on physiology and cognitive processes is state-dependent. In smokers under nicotine withdrawal, LTP-like plasticity could not be induced by tDCS and PAS alone, but was restituted in case of nicotine administration (Grundey *et al.* 2012a). Likewise smokers showed reduced performance in a working memory task under nicotine withdrawal as compared to non-smokers, which was however improved selectively in smokers by nicotine administration (Grundey *et al.* 2015). Since nicotinic receptors with calcium channel properties are de-sensitized in smokers, these results could be explained by reduced calcium influx in smokers under nicotine withdrawal, which is re-established by nicotine consumption, and therefore improves calcium-dependent processes. Conversely, in non-smokers the more “optimal” calcium concentration without nicotine will prevent further improvement by this substance. This state-dependent mechanism might also be relevant for the impact of nicotine in neuropsychiatric diseases, in which the cholinergic system is hypo-active, as it is in Alzheimer’s disease. Here activation of nicotinic receptors might be able to reconstitute respective processes (Wilson *et al.* 1995; White and Levin, 1999). The results of the present study suggest moreover that substance administration might have to be fine-tuned to result in optimal effects, since both, too high and too low calcium concentration will likely compromise functions.

Some limitations of the present study should be taken into account. Nicotine was administered in a single dosage in this experiment, therefore it was not possible to determine a dose-dependent effect of nicotine on plasticity, which was shown for other neuromodulators, like dopamine (Monte-Silva *et al.* 2010; Fresnoza *et al.* 2014). Another limitation is that we did not investigate cognitive functions in our participants in order to compare these directly with the neurophysiological results, which would have enabled us to explore functional consequences of respective effects (Gotti and Clementi 2004). However, this would have resulted in an excessive number of sessions for each participant. Further studies should be designed to cover these aspects in larger detail.

Funding

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant NI 683/4-2 ‘Impact of the nicotinic $\alpha 7$ receptor in smokers and nonsmokers’) within the DFG priority program ‘Nicotine: Molecular and Physiological Effects in Central Nervous System’.

Acknowledgments

Marcelo Di Marcello Valladão Lugon was supported by CAPES, Brazil.

References

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol.* 89:73–120.

Alkondon M, Pereira EFR, Barbosa CT, Albuquerque EX. 1997. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates γ -amino butyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 283:1396–1411.

Alkondon M, Pereira EFR, Eisenberg HM, Albuquerque EX. 1999. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 19:2693–2705.

Alkondon M, Albuquerque EX. 2004. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog Brain Res.* 145:109–120.

Arendash GW, Sanberg PR, Sengstock GJ. 1995a. Nicotine enhances the learning and memory of aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52:517–523.

Artola A, Singer W. 1987. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature.* 330:649-52.

Barone JA. 1999. Domperidone: a peripherally acting dopamine D2-receptor antagonist. *Ann Pharmacother.* 33(4):429-40.

Batsikadze G, Paulus W, Grundey J, Kuo MF, Nitsche MA. 2014. Effect of the Nicotinic $\alpha 4\beta 2$ -receptor Partial Agonist Varenicline on Non-invasive Brain Stimulation-Induced Neuroplasticity in the Human Motor Cortex. *Cereb Cortex.* 1:11.

Browne CJ, Sharma N, Waters KA, Machaalani R. 2010. The effects of nicotine on the alpha-7 and beta-2 nicotinic acetylcholine receptor subunits in the developing piglet brainstem. *Int J Dev Neurosci.* 28(1):1-7.

Buisson B, Bertrand D. 2001. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4(beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci.* 21:1819–1829.

Burnashev N. 1998. Calcium permeability of ligand-gated channels *Cell Calcium.* 24:325–332.

Cole DM, Beckmann CF, Long CJ, Matthews PM, Durcan MJ, Beaver JD. 2010. Nicotine replacement in abstinent smokers improves cognitive withdrawal symptoms with modulation of resting brain network dynamics. *Neuroimage.* 52:590–599.

Dajas-Bailador F, Wonnacott S. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 25:317–324.

Franklin PH, Murray TF. 1992. High affinity [3H]dextrorphan binding in rat brain is localized to a noncompetitive antagonist site of the activated N-methyl-D-aspartate receptor-cation channel. *Mol Pharmacol.* 41:134-46.

Fresnoza S, Paulus W, Nitsche MA, Kuo MF. 2014. Nonlinear dose dependent impact of D1 receptor activation on motor cortex plasticity in humans. *J Neurosci.* 34(7):2744–2753.

Froeliger B, Gilbert DG, McClernon FJ. 2009. Effects of nicotine on novelty detection and memory recognition performance: double blind, placebo-controlled studies of smokers and non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*. 205:625–633.

Gotti C, Clementi F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog.Neurobiol*. 74(6):363–396.

Grundey J, Thirugnanasambandam N, Kaminsky K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W, Nitsche MA. 2012a. Neuroplasticity in cigarette smokers is altered under withdrawal and partially restituted by nicotine exposition. *J Neurosci*. 32:4156–4162.

Grundey J, Thirugnanasambandam N, Kaminsky K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W, Nitsche MA. 2012b. Rapid effect of nicotine intake on neuroplasticity in non-smoking humans. *Front Pharmacol*. 3:186.

Grundey J, Freznosa S, Klinker F, Lang N, Paulus W, Nitsche MA. 2013. Cortical excitability in smoking and not smoking individuals with and without nicotine. *Psychopharmacology*. 229:653–664.

Grundey J, Amu R, Ambrus GG, Batsikadze G, Paulus W, Nitsche MA .2015. Double dissociation of working memory and attentional processes in smokers and non-smokers with and without nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*.

Hahn B, Stolerman IP. 2002. Nicotine-induced attentional enhancement in rats: effects of chronic exposure to nicotine. *Neuropsychopharmacology*. 27:712–722.

Heishman SJ, Taylor RC, Henningfield JE 1994. Nicotine and smoking: a review of effects on human performance. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2:1–51.

Heishman SJ, Kleykamp BA, Singleton EG. 2010. Meta-analysis of the acute effects of nicotine and smoking on human performance. *Psychopharmacology (Berl)*. 210:453–469.

Hess G, Jacobs KM, Donoghue JP. 1994. N-methyl-D-aspartate receptor mediated component of field potentials evoked in horizontal pathways of rat motor cortex. *Neuroscience*. 61:225-35.

Hess G, Aizenman CD, Donoghue JP. 1996. Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex. *J Neurophysiol*. 75:1765-78.

Huang LT, Sherwood JL, Sun YJ, Lodge D, Wang Y. 2010. Activation of presynaptic alpha7 nicotinic receptors evokes an excitatory response in hippocampal CA3 neurons in anaesthetized rats: an in vivo iontophoretic study. *Br J Pharmacol*. 159(3):554-65.

Iriki A, Pavlides C, Keller A, Asanuma H. 1989. Long-term potentiation in the motor cortex. *Science*. 245:1385-7.

Jacobsen LK, Krystal JH, Menci WE, Westerveld M, Frost SJ, Pugh KR. 2005. Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers. *Biological Psychiatry*. 57:56-66.

- Jubelt LE, Barr RS, Goff DC, Logvinenko T, Weiss AP, Evins AE. 2008. Effects of transdermal nicotine on episodic memory in nonsmokers with and without schizophrenia. *Psychopharmacology*. (Berl). 199:89–98.
- Kirkwood A, Dudek SM, Gold JT, Aizenman CD, Bear MF. 1993. Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science*. 260:1518-21.
- Kumari V, Gray JA, ffytche DH, Mitterschiffthaler MT, Das M, Zachariah E, Vythelingum GN, Williams SC, Simmons A, Sharma T. 2003. Cognitive effects of nicotine in humans: an fMRI study *Neuroimage*. 19:1002–1013.
- Kuo MF, Grosch J, Fregni F, Paulus W, Nitsche MA. 2007. Focusing effect of acetylcholine on neuroplasticity in the human motor cortex. *JNeurosci*. 27(52):14442.
- Lang N, Hasan A, Sueske E, Paulus W, Nitsche MA. 2008. Cortical hypo excitability in chronic smokers? A transcranial magnetic stimulation study. *Neuropsychopharmacology*. 33:2517–2523.
- Levin ED, Briggs SJ, Christopher NC, Rose JE. 1992. Persistence of chronic nicotine-induced cognitive facilitation. *Behav Neural Biol*. 58:152–158.
- Levin ED, Simon BB. 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*. 138:217–230.
- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH. 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioural characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*. 184(3-4):523-39.
- Li X, Rainnie DG, McCarley RW, Greene RW. 1998. Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci*. 18:1904–1912.
- Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W. 2002. Pharmacological approach to synaptic and membrane mechanisms of DC-induced neuroplasticity in man. *Brain*. 125:2238–2247.
- Lisman JE. 2001. Three Ca^{2+} levels affect plasticity differently: the LTP zone, the LTD zone and no man's land. *J Physiol*. 532:285.
- Machaalani, R, PK Kashi, and KA Waters. 2010. Distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and beta2 in the human brainstem and hippocampal formation. *Journal of chemical neuroanatomy*. 40(3):223-31.
- Maggi L, Sher E, Cherubini E. 2001. Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol*. 536:89–100.
- Min SK, Moon IW, Ko RW, Shin HS. 2001. Effects of transdermal nicotine on attention and memory in healthy elderly non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*. 159(1):83-8.
- Misonou H, Mohapatra DP, Park EW, Leung V, Zhen D, Misonou K, Anderson AE, Trimmer JS. 2004. Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci*. 7:711–718.
- Monte-Silva K, Liebetanz D, Grundey J, Paulus W, Nitsche MA. 2010. Dosage-dependent non-linear effect of L-DOPA on human motor cortex plasticity. *J Physiol*. 588:3415–3424.

Monte-Silva K, Kuo MF, Hessenthaler S, Fresnoza S, Liebetanz D, Paulus W, Nitsche MA. 2013. Induction of late LTP-like plasticity in the human motor cortex by repeated non-invasive brain stimulation. *Brain Stimul.* 6:424–432.

Myers CS, Robles O, Kakoyannis AN, Sherr JD, Avila MT, Blaxton TA, Thaker GK. 2004. Nicotine improves delayed recognition in schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl).* 174(3):334-40.

Netzer R, Pimlin P, Trube G. 1993. Dextromethorphan blocks N-methyl-D-aspartate-induced currents and voltage-operated inward currents in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 238:209-16.

Nitsche MA, Paulus W. 2000. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol.* 527:633-639.

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

Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. 2003a. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol.* 114:600-604.

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

Nitsche MA, Liebetanz D, Schlitterlau A, Henschke U, Fricke K, Frommann K, Lang N, Henning S, Paulus W, Tergau F. 2004. GABAergic modulation of DC stimulation-induced motor cortex excitability shifts in humans. *Eur J Neurosci.* 19:2720–2726.

Nørregaard J, Tønnesen P, Simonsen K, Sawe U. 1992. Long-term nicotine substitution after application of a 16-h nicotine patch in smoking cessation. *Eur J Clin Pharmacol.* 43:57– 60.

Poltavski DV, Petros T. 2005. Effects of transdermal nicotine on prose memory and attention in smokers and non-smokers. *Physiology and Behavior.* 83:833–843.

Puma C, Deschaux O, Molimard R, Bizot JC. 1999. Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 9:323–327.

Riout-Pedotti MS, Friedman D, Hess G, Donoghue JP. 1998. Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci.* 1:230–234.

Riout-Pedotti M-S, Friedman D, Donoghue JP. 2000. Learning-induced LTP in neocortex. *Science.* 290:533–536.

Schadel M, Wu D, Otton SV, Kalow W, Sellers EM. 1995. The pharmacokinetics of dextromethorphan and metabolites in humans: influence of the CYP2D6 phenotype and quinidine inhibition. *J Clin Psychopharmacol.* 15(4):263-269.

Schilstrom B, Svensson HM, Svensson TH, Nomikos GG. 1998. Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of

alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience*. 85:1005–1009.

Silvasti M, Karttunen P, Tukiainen H. 1987. Pharmacokinetics of dextromethorphan and dextrorphan: a single dose comparison of three preparations in human volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 9:493-497.

Stefan K, Kunesch E, Cohen LG, Benecke R, Classen J. 2000. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain*. 123(Pt 3):572-84.

Stefan K, Kunesch E, Benecke R, Cohen LG, Classen J. 2002. Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation. *J Physiol*. 543(Pt 2):699-708.

Summers KL, Kem WR, Giacobini E. 1997. Nicotinic agonist modulation of neurotransmitter levels in the rat fronto parietal cortex. *Jpn J Pharmacol*. 74:139–146.

Swan GE, Lessov-Schlaggar CN. 2007. The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. *Neuropsychol Rev*. 17:259-273.

Thirugnanasambandam N, Grundey J, Adam K, Drees A, Skwirba AC, Lang N, Paulus W, Nitsche MA. 2011. Nicotinic impact on focal and non-focal neuroplasticity induced by non-invasive brain stimulation in non-smoking humans. *Neuropsychopharmacology*. 36:879-886.

Tortella FC, Pellicano M, Bowery NG. 1989. Dextromethorphan and neuro modulation: old drug coughs up new activities. *Trends Pharmacol Sci*. 10:501-7.

White HK, Levin ED. 1999. Four-week nicotine skin patch treatment effects on cognitive performance in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)*. 143:158–165.

Wilson AL, Langley LK, Monley J, Bauer T, Rottunda S, McFalls E, Kovera C, McCarten JR. 1995. Nicotine patches in Alzheimer's disease: pilot study on learning, memory, and safety. *Pharmacol Biochem Behav*. 51:509–514.

Wolters A, Sandbrink F, Schlottmann A, Kunesch E, Stefan K, Cohen LG, Benecke R, Classen J. 2003. A temporally asymmetric Hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex. *J Neurophysiol*. 89(5):2339-45.

Wonnacott S. 1990. The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol Sci*. 11:216–219.

Wong BY, Coulter DA, Choi DW, Prince DA. 1988. Dextrorphan and dextromethorphan, common antitussives, are antiepileptic and antagonize N-methyl-D-aspartate in brain slices. *Neurosci Lett*. 85:261-6.

Ziemann U, Chen R, Cohen LG, Hallett M. 1998a. Dextromethorphan decreases the excitability of the human motor cortex. *Neurology*. 51:1320-4.

Ziemann U, Siebner HR. 2008. Modifying motor learning through gating and homeostatic metaplasticity. *Brain Stimul*. 1:60–66.