

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

**Níveis de BDNF no Córtex Pré-Frontal de
ratos submetidos à Estimulação Epidural
por Corrente Contínua (EECC) de Baixa
Intensidade.**

JULIANA CARDOSO DE SOUZA CUSTÓDIO

Vitória, 2017

Níveis de BDNF no Córtex Pré-Frontal de ratos submetidos à Estimulação Epidural por Corrente Contínua (EECC) de Baixa Intensidade.

JULIANA CARDOSO DE SOUZA CUSTODIO

Orientadora: Profa Dra Ester Miyuki Nakamura-Palacios

Co-Orientadora: Profa Dra Suely Gomes de Figueiredo

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 título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Neurociências e Bioquímica

VITÓRIA

2017

Níveis de BDNF no Córtex Pré-Frontal de ratos submetidos à Estimulação Epidural por Corrente Contínua (EECC) de Baixa Intensidade.

JULIANA CARDOSO DE SOUZA CUSTODIO

Orientadora: Profa Dra Ester Miyuki Nakamura-Palacios

Co-Orientadora: Profa Dra Suely Gomes de Figueiredo

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 título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 20/02/2017 por:

Profª Drª Ester Miyuki Nakamura-Palacios - Orientadora – UFES

Prof Drª Suely Gomes de Figueiredo – Co-Orientadora - UFES

Profª Drª Ângela Cristina do Valle – USP

Prof Dr Henrique Azevedo Futuro Neto – EMESCAM – UFES

Profª Drª Sônia Alves Gouvea - PPGCF – UFES

Profª Drª Alessandra Padilha - 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 a minha avó, Silvia,
que nos deixou ao longo dessa caminhada.
E ao meu filho, Henrique, que nasceu ao longo da mesma caminhada.
Ambos me mostrando de forma muito intensa,
que o que temos de mais precioso nesse mundo é o tempo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até aqui.

A Prof^a Ester, pela orientação não apenas profissional, mas também pessoal. Minha gratidão, admiração e respeito enorme pela pesquisadora incrível que você é, e ainda mais, por conseguir somar essa enorme responsabilidade ao seu papel tão bem desempenhado de mãe e esposa. Obrigada por tudo que aprendi ao longo desses anos.

A Prof^a Suely, pela orientação, pela paciência, e por ter aberto as portas do seu laboratório e me apresentado um pouquinho do fascinante mundo da Bioquímica. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Henrique Azevedo Futuro Neto, a Prof^a. Dr^a Ângela Cristina do Valle, a Prof^a Dr^a Sonia Alves Gouvea, por aceitarem participar da Banca de Defesa deste doutorado.

A Prof^a Dr^a Livia, pelo apoio, pela amizade, e por disponibilizar seu laboratório sempre que necessário.

Aos meus pais, por todo suporte, apoio e cuidado. Por me ensinarem a importância da persistência, do pensamento a longo prazo, da disposição para o trabalho. Por sempre me mostrarem que educação é algo essencial na nossa vida e que poderiam oferecer-me de forma que ninguém teria o poder de retirar-me.

Ao meu avô Aroldo, pessoa mais íntegra, humilde, bondosa e honesta que eu conheço. Amo-te infinitamente.

A minha avó Silvia, que nos deixou ao longo dessa jornada, e que embora nunca tenha pisado em uma Universidade, se enchia de orgulho das minhas conquistas.

Ao meu esposo, Ricardo, por ser um grande companheiro de caminhada, e muitas vezes ter aberto mão dos próprios planos para me dar suporte na realização dos meus. Por entender as minhas ausências, por ser presente na vida do nosso filho nos momentos em que eu não podia.

Ao meu filho, Henrique, prometo compensar cada hora, minuto e segundo de ausência. Amo-te de uma forma inexplicável. Você me fez mais forte e deu outro sentido a minha vida.

A minha amiga de laboratório e de vida, Cleciane Martins, que foi essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Helena, Pedro, Gustavo, Thiago e Fabiana, do Laboratório de Química de Proteínas, pelo auxílio e orientação no desenvolvimento das análises bioquímicas.

Aos colegas do Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia Marcelo, Elisa, Ingrid, Matheus e ao Técnico Jozué, por sempre estarem dispostos a ajudar na realização das estimulações, eutanásias e outros procedimentos.

Aos demais colegas de laboratório e de pós-graduação pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivência.

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

Ao CNPQ agradeço o auxílio financeiro.

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

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 O ressurgimento do uso de correntes elétricas na medicina..... | 20 |
| 1.2 O equipamento..... | 23 |
| 1.3 A tDCS e os mecanismos de aprendizagem e memória..... | 27 |
| 1.4 Os mecanismos celulares da estimulação cerebral..... | 31 |
| 1.5 O envolvimento dos canais iônicos..... | 33 |
| 1.6 A Estimulação Epidural por Corrente Contínua..... | 36 |
| 1.7 Os fatores neurotróficos..... | 40 |
| 1.8 O Córtex Pré-Frontal..... | 44 |
| 2. OBJETIVOS | 52 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 53 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 53 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 55 |
| 3.1. Animais..... | 56 |
| 3.2. Adaptação Manuseio e contenção..... | 57 |
| 3.3. Procedimento cirúrgico para fixação do eletrodo de estimulação..... | 58 |
| 3.4. Delineamento experimental dos protocolos..... | 61 |
| 3.5. Estimulação Epidural Aguda..... | 62 |
| 3.5.1. Estimulação anódica aguda..... | 62 |
| 3.5.2. Estimulação catódica aguda..... | 64 |
| 3.6. Estimulação Epidural Repetitiva anódica e catódica..... | 65 |
| 3.7. Obtenção do extratoproteico do Córtex pré-frontal..... | 67 |
| 3.8. Dosagem de proteínas..... | 68 |
| 3.9. Dosagem dos níveis de BDNF..... | 69 |
| 3.10. Eletroforese em gel de Poliacrilamida..... | 69 |
| 3.11. Análise dos resultados..... | 70 |

| | |
|---|-----|
| 4. RESULTADOS | 71 |
| 4.1. Efeitos da eDCS anódica aguda sobre a intensidade do BDNF total no CPF de ratos..... | 72 |
| 4.1.1. Efeitos da eDCS anódica aguda sobre a intensidade do pró-BDNF e BDNF maduro no CPF de ratos..... | 74 |
| 4.2. Efeitos da eDCS catódica aguda sobre a intensidade do BDNF maduro no CPF de ratos..... | 76 |
| 4.3. Efeitos da eDCS anódica e catódica repetitiva (5 sessões) sobre a expressão total de BDNF no CPF de ratos | 78 |
| 4.3.1. Efeitos da eDCS anódica e catódica repetitiva (5 sessões) sobre a intensidade do pró-BDNF e BDNF maduro no CPF de ratos..... | 80 |
| 5. DISCUSSÃO | 82 |
| 5.1. Sinalização mediada pelo BDNF..... | 92 |
| 5.2. A sinalização BDNFmaduro /TrkB e os processos de aprendizagem e memória..... | 101 |
| 5.3. A estimulação cerebral e o BDNF..... | 105 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES | 111 |
| 6.1. Condições patológicas relacionadas a níveis disfuncionais de BDNF no SNC..... | 112 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 116 |

Lista de Figuras e Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Reportagens sobre o uso da estimulação transcraniana por corrente contínua exibidos na TV aberta nacional..... | 17 |
| Figura 1: Linha do tempo sobre o desenvolvimento das técnicas de estimulação cerebral | 19 |
| Figura 2: Circuito elétrico básico do equipamento de <i>tDCS</i> | 24 |
| Figura 3: Montagem do equipamento de <i>tDCS</i> | 25 |
| Figura 4: Efeitos da <i>eDCS</i> sobre a memória operacional de animais antes (pré-retardo) e após o retardo de 1, 4 e 10 horas no labirinto radial de 8-braços..... | 39 |
| Figura 5: Divisões do CPF segundo o mapa arquitetônico de Brodmann..... | 47 |
| Figura 6: Mapa arquitetônico dos lobos frontais em humanos, primatas, e roedores. | 48 |
| Figura 7: Esquema representando a homologia entre a região medial do CPF e o CPFDL de seres humanos..... | 50 |
| Figura 8: Biotério do laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia /CCS – UFES..... | 56 |
| Figura 9: Sessões de manipulação e contenção dos com o objetivo de habituar os mesmos aos procedimentos realizados nos protocolos experimentais..... | 58 |
| Figura 10: Procedimento cirúrgico para implantação do eletrodo de estimulação acima do CPFm esquerdo..... | 60 |
| Figura 11: Presilha plástica para fixação do eletrodo de estimulação..... | 61 |
| Figura 12: Desenho experimental dos protocolos realizados no estudo..... | 62 |
| Figura 13: Procedimento de estimulação epidural por corrente contínua de baixa intensidade..... | 66 |
| Figura 14: Níveis de BDNF total no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos submetidos a uma única aplicação da <i>eDCS</i> anódica de 400 μ A..... | 73 |

| | |
|---|-----|
| Figura 15: Níveis de pró-BDNF e BDNF maduro no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos submetidos a <i>eDCS</i> anódica aguda..... | 75 |
| Figura 16: Níveis de pró-BDNF e BDNF maduro pós- <i>eDCS</i> catódica aguda no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos..... | 76 |
| Figura 17: Análise dos níveis de BDNF total após <i>eDCS</i> (400 μ A) repetitiva catódica ou anódica, no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos..... | 79 |
| Figura 18: Análise dos níveis de Pró-BDNF e BDNF maduro após <i>eDCS</i> (400 μ A) repetitiva catódica ou anódica, no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos..... | 81 |
| Figura 19: Ativação da transcrição do BDNF a partir da ativação do receptor NMDA.. | 85 |
| Figura 20: Síntese e processamento do pró-BDNF e do BDNF maduro no neurônio..... | 87 |
| . | |
| Figura 21: Efeitos do perampanel (PRP) após <i>eDCS</i> (400 μ A por 13 minutos) repetitiva (uma vez ao dia por cinco dias consecutivos) sobre o CPFm nos animais desempenhando testes de memória operacional espacial..... | 91 |
| Figura 22: Vias de sinalização do pró-BDNF e BDNF maduro..... | 94 |
| Figura 23: Vias de sinalização do pro BDNF e mBDNF no neurônio pré ou pós sináptico..... | 97 |
| Figura 24: Envolvimento das diferentes vias de sinalização mBDNF/TrkB nos efeitos de plasticidade, manutenção e sobrevivência neuronal..... | 100 |

Lista de Abreviaturas

AMP-c Adenosina monofosfato cíclico
AMPA - ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANOVA - análise de variância
BDNF - do inglês, *Brain derived neurotrophic fator* (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
BDNF -/- - Supressão gênica completa do BDNF
BDNF +/- - Supressão gênica parcial do BDNF
CREB – do inglês, *cAMP response element binding* (elemento de resposta ao AMP cíclico)
CPF – Córtex Pré-frontal
CPFm – Córtex Pré-frontal medial
ECT- Eletroconvulsoterapia
eDCS – do inglês, *Epidural Direct Current Stimulation*
EECC – Estimulação Epidural por Corrente Contínua
ETCC - Estimulação transcraniana por corrente contínua
LTD – do inglês, *Long-Term Depression* (Depressão de longa duração)
LTP –do inglês, *Long-Term Potentiation* (Potenciação de longa duração)
MAPK – do inglês, “mitogen-activated protein kinase”
MEP – do inglês, *Motor Evoked Potential* (potencial evocado motor)
NMDAR - receptor N-metil-D-aspartato
NGF, do inglês, *nerve growth fator* (Fator de crescimento do nervo)
PKA - Proteína cinase A
PLC γ - Proteína cinase gama
P75NTR – Receptor pan-neurotrófico p75
pró-BDNF- precursor BDNF
mBDNF – BDNF maduro
SNC - sistema nervoso central
tDCS – do inglês, *transcranial direct current stimulation*
TMS - do inglês, *transcranial magnetic stimulation*
tPA – do inglês, *tissue-Plasminogen Activator* (Ativador do plasminogênio tissular)
Trk- Receptor tirosina-cinase

RESUMO

Níveis de BDNF no Córtex Pré-Frontal de ratos submetidos a Estimulação Epidural por Corrente Contínua (EECC) de Baixa Intensidade.

O sistema nervoso (SN) possui habilidade para modificar sua organização morfofuncional em resposta a mudanças internas ou demandas externas. Essa capacidade adaptativa constitui o que chamamos de plasticidade cerebral. O fator neurotrófico derivado do cérebro, conhecido como BDNF tem atraído considerável atenção na literatura científica, pelo seu envolvimento em processos cruciais de desenvolvimento e regulação do sistema nervoso, entretanto, muitos aspectos desta molécula são ainda desconhecidos. Sabe-se que diferentes protocolos utilizando estimulação cerebral já mostraram efeitos positivos sobre a cognição e melhora da função cortical, e o BDNF pode estar potencialmente envolvido nesse processo. **Objetivo:** Investigar as modificações nos níveis de BDNF no Córtex pré-frontal medial (CPFm) de ratos adultos submetidos a modulação cortical aguda e crônica com diferentes polaridades, através da estimulação epidural por corrente contínua de baixa intensidade. **Método:** Neste estudo randomizado, os animais receberam eDCS (400 μ A) anódica ou catódica, durante uma única sessão, ou ao longo de 5 dias consecutivos. Os níveis de BDNF e suas isoformas foram avaliados no CPF através da técnica de western blot. **Resultados:** Nossos resultados demonstraram que a eDCS anódica - aplicada de forma aguda na intensidade de 400 μ A levou a uma redução imediata na expressão de BDNF, e interferiu na formação do BDNF maduro, porém houve recuperação rápida (aos 30 minutos) deste último, aparentemente às custas de uma maior conversão a partir do pró-BDNF, já que houve uma redução persistente desta isoforma. A eDCS catódica aguda na mesma intensidade também levou a uma redução, nos níveis de BDNF, porém diferente do grupo anódico, esta redução foi mantida por pelo menos 30 minutos pós-eDCS. A eDCS anódica aplicada ao longo de 5 dias, promoveu um aumento nos níveis de ambas as formas de BDNF no CPF dos animais em relação aos grupos sham e eDCS catódico. Esse aumento foi significativo em relação aos níveis de pró-BDNF, tendo essa tendência se mantido em relação ao BDNF maduro. **Conclusão:** Nosso estudo demonstrou que a eDCS na intensidade de 400 μ A é capaz de modular os níveis de BDNF, e seus efeitos são específicos para cada polaridade e número de sessões aplicadas.

Palavras-chaves: eDCS, BDNF, CPFm, EECC, Pró-BDNF, BDNF maduro

ABSTRACT

Prefrontal BDNF levels under single and repetitive cortical anodal or cathodal epidural direct current stimulation in rats

The nervous system (NS) has the ability to modify its morphofunctional organization in response to internal changes or external demands, This adaptive capacity constitutes brain plasticity. Brain-derived neurotrophic factor known as BDNF has attracted considerable attention in the scientific literature for its involvement in crucial processes of nervous system development and regulation, however, many aspects of this molecule are still unknown. It is known that different protocols using brain stimulation have already shown positive effects on cognition and cortical function improvement, and BDNF may be potentially involved in this process. **Objective:** To investigate the changes in BDNF levels in the medial prefrontal cortex (CPFm) of adult rats undergoing acute and chronic cortical modulation with different polarities, through low-intensity DC epidural stimulation. **Methods:** In this randomized study, animals received eDCS (400 μ A) anodic or cathodic, during a single session, or over 5 consecutive days. The levels of BDNF and its isoforms were evaluated in the CPF by western blot. **Results:** Our study demonstrated that anodic eDCS - acutely applied at 400 μ A intensity led to an immediate reduction in BDNF expression, and interfered in the formation of mature BDNF, but there was a rapid recovery (at 30 minutes) of the latter At the expense of a greater conversion from the pro-BDNF, since there was a persistent reduction of this isoform. The acute cathodic eDCS at the same intensity also led to a reduction in BDNF levels, but different from the anodic group, this reduction was maintained for at least 30 minutes post-eDCS. The anodic eDCS applied over 5 days promoted an increase in the levels of both forms of BDNF in the CPF of the animals relative to the sham and cathodal eDCS groups. This increase was significant in relation to pro-BDNF levels, and this trend was maintained in relation to mature BDNF. **Conclusion:** Our study demonstrated that eDCS at 400 μ A intensity is able to modulate BDNF levels, and its effects are specific to each polarity and number of sessions applied.

Key-words: eDCS, BDNF, mCPF, Pró-BDNF, mature BDNF

1. INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Um grande número de publicações científicas vêm dando destaque para a utilização de uma ferramenta terapêutica que já era utilizada há milhares de anos na medicina: a corrente elétrica.

Nos últimos 5 anos, 2.053 artigos relacionados a utilização de correntes elétricas foram publicados, apenas considerando-se as publicações disponíveis na base de dados PubMed. Os termos usados para busca foram “*direct current stimulation*”

Devido a sua crescente utilização na prática médica, vários telejornais de abrangência nacional têm abordado o uso da estimulação por correntes elétricas para o tratamento de doenças neurológicas ou psiquiátricas ou na neuromodulação (Tabela 1).

Tabela 1: Reportagens sobre o uso da estimulação transcraniana por corrente contínua exibidos na TV aberta nacional.

| DATA E MEIO DE EXIBIÇÃO | TIPO DE PROGRAMAÇÃO/TEMA | TÉCNICA DE ESTIMULAÇÃO UTILIZADA | PROTOCOLO UTILIZADO | RESULTADOS |
|---|--|--|---|---|
| Maio/2014 TV Globo Jornal Nacional | Documentário sobre o uso de correntes elétricas para tratamento de depressão e dependência química | ETCC | Sessões de ETCC por 30 min/10 dias, e posteriormente quinzenais por 10 meses | Melhora clínica nos casos de depressão, e redução do <i>craving</i> em usuários de crack submetidos a tratamento para dependência química . |
| Disponível em http://globotv.globo.com/rede-globo/jornal-nacional/v/medicos-testam-tratamento-contradepressao-em-viciados-em-crack/3085819/ | | | | |
| Outubro/2014 TV Globo Fantástico | Reportagem sobre o uso de eletricidade para obter melhora cognitiva | ETCC | Diversos | Melhora de voluntários em testes que avaliam habilidades como matemática, linguagem, atenção e coordenação motora. |
| Disponível em http://g1.globo.com/fantastico/noticia/2014/10/cientistas-estudam-estimular-o-cerebro-com-choques-eletricos.html | | | | |
| Março/2015 TV Globo Programa Bem Estar | Reportagem sobre o uso de implante de eletrodos no hipotálamo para tratamento de obesidade mórbida | Estimulação cerebral profunda (corrente elétrica gerada por uma espécie de “marcapasso”) | Estimulação profunda sobre o hipotálamo utilizando eletrodos cirurgicamente implantados | Aumento na taxa metabólica basal e redução da compulsão alimentar |
| Disponível em https://globoplay.globo.com/v/4075481/ | | | | |
| Agosto/2016 TV Globo Programa Bem Estar | Reportagem sobre o uso de implante de eletrodos no cérebro para tratamento de Distonias Musculares | Estimulação cerebral profunda (corrente elétrica gerada por uma espécie de “marcapasso”) | Estimulação cerebral profunda utilizando eletrodos cirurgicamente implantados | Redução da distonia muscular e melhora na coordenação dos movimentos |
| Disponível em https://globoplay.globo.com/v/5272913/ | | | | |

Embora exista um grande interesse da comunidade científica na utilização da técnica, se refinarmos a pesquisa de publicações acrescentando o termo “*cellular mechanisms*”, sobram apenas 28 publicações, e se acrescentarmos “*cortex*”, restam 4, mostrando que embora a estimulação cerebral por correntes elétricas seja utilizada de forma bem sucedida e com resultados promissores na pesquisa clínica, há ainda uma grande lacuna no que diz respeito aos mecanismos celulares subjacentes aos efeitos obtidos.

O uso da eletricidade no tratamento de doenças é antigo, havendo registros do século I descrevendo a aplicação de descargas elétricas oriundas de peixes elétricos para amenizar dores de cabeça. Posteriormente, a descrição da aplicação de correntes elétricas para o tratamento de desordens mentais (especialmente melancolia) pode ser encontrada em diversos relatos do século XVIII, seguindo-se a descoberta da pilha elétrica por Alessandro Volta, até a introdução da eletroconvulsoterapia (ECT) no século XX (Figura 1). Após o desenvolvimento da ECT, houve uma disseminação da mesma na Europa e EUA ao fim da 2ª guerra mundial (Fregni, Boggio, e Brunoni, 2012), ofuscando as investigações da aplicabilidade da estimulação elétrica em intensidades mais baixas.

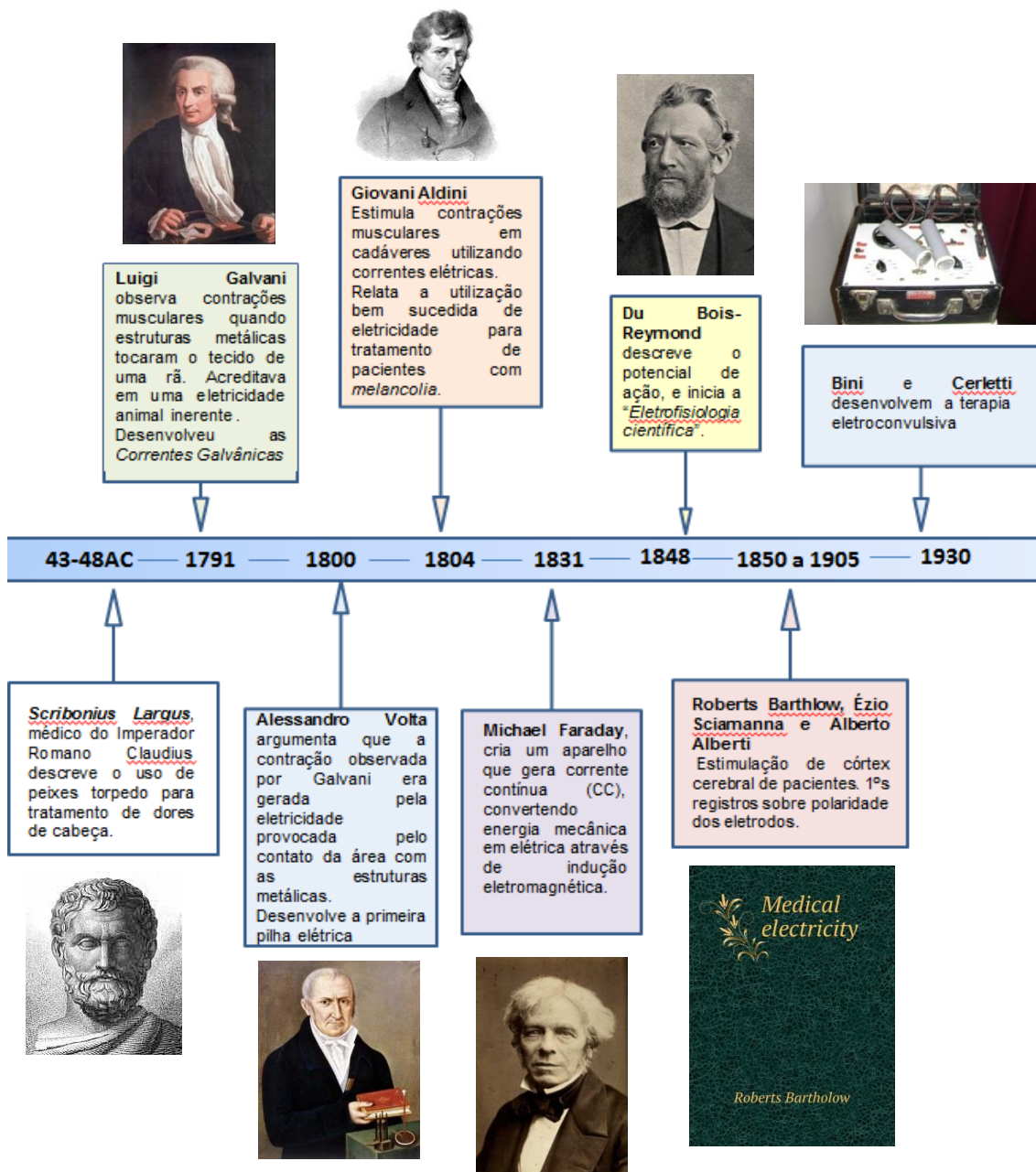


Figura 1: Linha do tempo sobre o uso das correntes elétricas na medicina. A utilização de correntes elétricas para o tratamento de patologias não é recente. Diversos cientistas contribuíram ao longo da História para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de diferentes técnicas de estimulação cerebral.

A ETC utiliza uma corrente elétrica muito elevada, forte o suficiente para gerar uma convulsão. A energia dispensada pela ECT é da ordem de 100 J, com um pico de pulso da ordem de 8 A e que dura de 0,5 a 2 milissegundos, descarregando, assim, uma carga de 20 a 576 mC. Apesar de ser uma técnica que utiliza correntes elétricas, entende-se que é a crise convulsiva controlada, e não a carga elétrica, que tem efeitos terapêuticos, sendo a eletricidade apenas uma forma de desencadear esta crise (Mankad, Beyer, e Krystal, 2010).

Com o avanço da psicofarmacologia e os resultados pouco expressivos nos estudos clínicos até então realizados em humanos, o uso da estimulação elétrica ficou praticamente esquecido entre 1970 e 2000. Foi apenas no final do século XX, que ocorreu um “ressurgimento” da técnica (Brunoni 2012).

1.1. Século XXI: O ressurgimento do uso de correntes elétricas na medicina – *Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua de baixa intensidade (ETCC)*

Esse recente ressurgimento do interesse nos efeitos da estimulação por correntes elétricas, se deve em grande parte pelo desenvolvimento da técnica de ***Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua de baixa intensidade (ETCC)***, ou no idioma inglês, ***tDCS (Transcranial Direct Current Stimulaton)***, que utiliza correntes elétricas, porém de baixa intensidade, sendo esta a principal característica que difere esta nova modalidade de estimulação elétrica cerebral da eletroconvulsoterapia.

A ETCC, que doravante será referido por *tDCS*, recentemente tem ganhado espaço por ser uma ferramenta de modulação cortical não-invasiva, indolor e de fácil aplicação. Estudos clássicos indicaram que esse tipo de estimulação produz uma variação no potencial de repouso da membrana, que é dependente da polaridade da corrente aplicada, onde a estimulação anódica geralmente aumenta a excitabilidade cortical, facilitando o disparo neuronal, e a catódica resulta em efeitos opostos. Com a observação de alguns parâmetros como intensidade de corrente, tamanho de eletrodo utilizado e tempo de aplicação, cálculos de densidade de corrente e carga total, a técnica é segura para ser aplicada em animais e seres humanos. Além disso, o custo do equipamento, facilidade na aplicação da técnica e o fato desta não induzir crises convulsivas são vantagens importantes da *tDCS* (Boggio, 2008)

O desenvolvimento tecnológico ofereceu a possibilidade de mensurar os efeitos dessas estimulações quando aplicadas em humanos por meio de exames de imagem como ressonância magnética funcional, tomografia computadorizada por emissão de pósitrons, eletroencefalograma e estimulação magnética transcraniana (EMT) (Nitsche *et al*, 2008; Paulus, 2011) .

Assim, na última década, a aplicação da *tDCS* sobre o crânio passou a ter maior atenção como recurso terapêutico útil para muitas desordens psiquiátricas e neurológicas, incluindo o tratamento de sequelas em pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) (Fregni *et al.*, 2005^b), dor crônica (Fregni *et al.*, 2006^a), depressão (Fregni *et al.*, 2006^b; Fregni *et al.*, 2006^c), epilepsia

(Fregni *et al.*, 2006^d), doença de Parkinson (Fregni *et al.*, 2006^e), na reabilitação motora (Fregni *et al.*, 2005^b), e na redução da compulsão em usuários de drogas e alcoolistas (Boggio *et al.*, 2008; 2010; Nakamura Palacios, 2011).

Em relação aos efeitos da *tDCS* no alcoolismo, em um estudo realizado em nosso laboratório, foram avaliados os efeitos clínicos e eletrofisiológicos (indicado pelo componente P3) de uma única aplicação da *tDCS* sobre o córtex pré-frontal dorsolateral (CPF DL) esquerdo em diferentes tipos de alcoolistas de acordo com a Tipologia de *Lesch*.

Foi observada uma melhora significativa da atividade frontal induzida pela *tDCS* específica para os alcoolistas do tipo IV (Nakamura Palacios, 2011).

Em um estudo seguinte, objetivando verificar os benefícios terapêuticos da aplicação repetitiva da *tDCS* em alcoolistas graves atendidos em ambulatórios da zona rural do estado, observamos que a aplicação da *tDCS* bilateral (catódica à esquerda e anódica à direita) repetitiva (5 sessões) produziu uma redução significativa das recaídas ao uso do álcool e uma melhora da percepção de melhor qualidade de vida em alcoolistas observados por um período de 6 meses após o tratamento (Klauss *et al.* 2014).

Nosso grupo também avaliou os efeitos eletrofisiológicos da *tDCS* aplicada sobre o CPF DL de usuários de crack, durante a visualização de imagens neutras e relacionadas ao uso do crack (Conti *et al.* 2014). O estudo mostrou que uma única aplicação da *tDCS* bilateral (catódica à esquerda e anódica à

direita) foi capaz de modular a atividade cortical pré-frontal dos pacientes, reduzindo a atividade cerebral no intervalo de tempo relacionado ao processamento cognitivo (P3), principalmente no CPFDL esquerdo, durante a visualização de imagens relacionadas ao uso da droga, porém aumentando-a após cinco aplicações, sugerindo que as aplicações única e repetitivas da *tDCS* podem ter um impacto no processamento cognitivo pré-frontal de pistas relacionadas às drogas que podem estar relacionados aos efeitos clínicos favoráveis, como foi demonstrado posteriormente por Batista *et al.* (2015), comprovando a redução da compulsão (*craving*) ao uso da droga e da melhora da qualidade de vida após 5 sessões de *tDCS*.

Em publicação recente demonstrou-se que a *tDCS* bilateral repetitiva sobre o CPFDL promove uma mudança da ativação e das projeções do córtex pré-frontal ventromedial tanto em alcoolistas como em usuários de crack (Nakamura-Palacios *et al* 2016).

1.2. O equipamento

O equipamento geralmente utilizado para gerar corrente contínua é constituído basicamente por quatro componentes principais: eletrodos (ânodo e cátodo), amperímetro (medidor de intensidade de corrente elétrica), potenciômetro (componente que permite a manipulação da intensidade da corrente) e um jogo de baterias para gerar a corrente aplicada. A Figura 2 mostra o circuito básico do equipamento (Boggio, 2006).

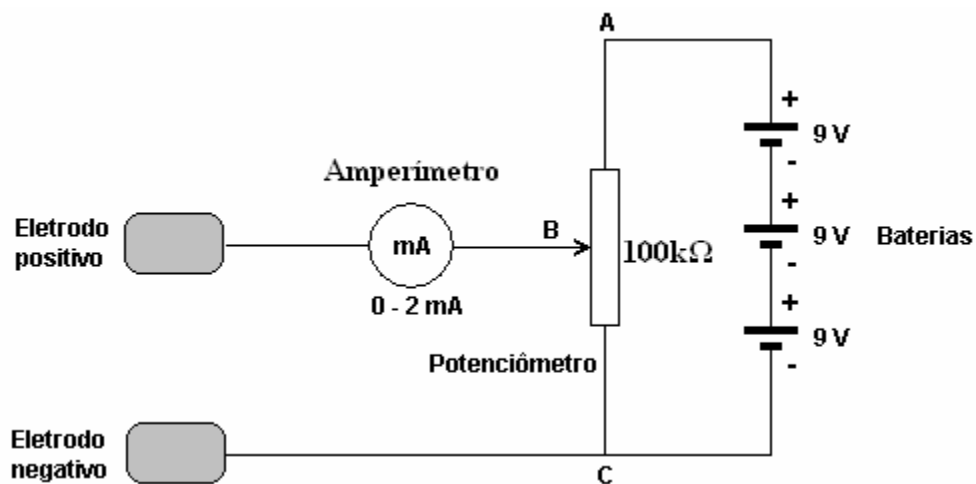


Figura 2: Circuito elétrico básico do equipamento de *tDCS* (Extraído de: Boggio, 2006).

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

Uma fraca corrente direta é induzida no córtex cerebral através desses dois eletrodos colocados geralmente sobre o couro cabeludo (Figura 3) (Nitsche *et al.*, 2008)

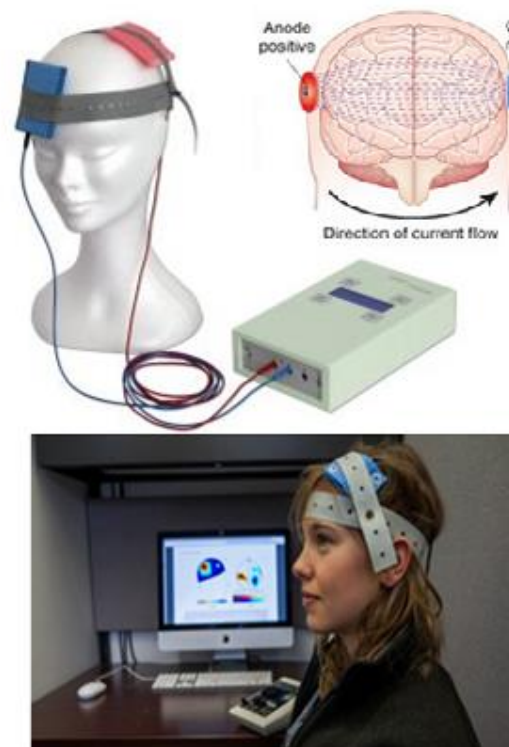


Figura 3: Montagem do equipamento de *tDCS*. Os eletrodos são posicionados na região acima do couro cabeludo, em diferentes regiões da cabeça, dependendo do objetivo do estudo ou tratamento, e estão conectados ao aparelho de estimulação. (Retirada do site: <http://www.sciencemag.org/news/2016/02/brain-zapping-therapies-might-be-hitting-lefties-wrong-side-head>)

Como citado anteriormente, esta corrente fraca pode induzir mudanças focais da excitabilidade cortical - aumentando-a ou diminuindo-a, dependendo da polaridade do eletrodo, podendo levar a modificações na excitabilidade e atividade neuronal espontânea por uma despolarização ou hiperpolarização tônica do potencial de repouso da membrana (Nitsche *et al.*, 2008).

De forma geral, o eletrodo anódico ou ânodo, é definido como o eletrodo positivamente carregado e o eletrodo catódico ou cátodo é o eletrodo carregado negativamente (Nitsche *et al.*, 2008).

O posicionamento destes eletrodos é de importância crucial para a distribuição espacial e direção do fluxo de corrente, que juntos determinam a efetividade da estimulação. Na maior parte dos estudos um ânodo e um cátodo são posicionados em diferentes regiões do escalpo, dependendo da função cerebral que está sendo estudada (Utz *et al.*, 2010). Utiliza-se com maior frequência uma montagem bipolar, sendo que um dos eletrodos é designado por eletrodo de estimulação, sendo colocado sobre a área do escalpe que se quer estimular e que interfere com o Sistema Nervoso Central (SNC), e o outro é designado por eletrodo de retorno.

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

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

A *tDCS* difere de outros métodos de estimulação cerebral como a estimulação magnética transcraniana, por não induzir potenciais de ação nos neurônios, sendo portanto considerada uma intervenção neuromodulatória.

1.3. A *tDCS* e os mecanismos de aprendizagem e memória

A capacidade de modificação da excitabilidade neuronal do córtex cerebral constitui matéria de interesse para os neurologistas uma vez que contribui para a eficácia da plasticidade sináptica.

Diversos estudos mostraram que a estimulação anódica transcraniana melhora a função cognitiva no homem, e embora as modificações celulares decorrentes da *tDCS* ainda não estejam elucidadas, este efeito parece ser devido a um reforço das sinapses glutamatérgicas (Fregni *et al.*, 2005^a; Iyer *et al.*, 2005; Nitsche *et al.*, 2003), uma vez que o bloqueio desses receptores por antagonistas como o dextrometorfano bloqueia os efeitos da *tDCS* (Liebetanz *et al.*, 2002).

Em um artigo publicado por Zaehle e colaboradores em 2011, os pesquisadores avaliaram os efeitos da *tDCS* em voluntários desempenhando testes de memória operacional, particularmente avaliando os efeitos da *tDCS* sobre o CPFDL esquerdo durante o teste “2-back”, e a atividade neural durante a realização do mesmo.

Os resultados mostraram que a *tDCS* alterou a atividade cortical associada a memória operacional em sincronia com as alterações sistemáticas no

desempenho dos indivíduos nos testes, demonstrando os efeitos neuromodulatórios da *tDCS* sobre a atividade cortical e sua significância funcional (Zaehle *et al.* 2011).

A memória operacional, memória de trabalho, ou do inglês, *Working Memory*, é um mecanismo que está relacionado a capacidade de retenção temporária de informações, como por exemplo, durante a realização de uma tarefa cognitiva, e tem sido descrita como um sistema multi-componente ou uma coleção de diferentes processos cognitivos, que fornecem uma manutenção ativa e seletiva de informações de diferentes modalidades sensoriais, em um armazenamento temporário. Isso permite a manipulação, processamento e recuperação de informações até a finalização de uma ação efetiva, podendo isso ocorrer após intervalos curtos (segundos), ou longos (minutos a horas). Até sutis deficiências nessa maquinaria podem significar déficits substanciais em raciocínio e planejamento (Nakamura Palacios, 2011).

Além dos resultados mostrando melhora na memória operacional, a estimulação cerebral também mostrou ser capaz de afetar os potenciais motores evocados (MEPs - do inglês - *motor evoked potentials*), que refletem a modulação da excitabilidade motora, levando a uma facilitação dos MEPs após a estimulação anódica e supressão após a estimulação catódica em seres humanos (Nitsche e Paulus, 2000).

Em 2010, Cambiaghi *et al.*, demonstraram o mesmo efeito em camundongos saudáveis, nos quais a estimulação anódica aumentou os MEPs, enquanto a estimulação catódica inibiu a atividade motora, validando assim esses ensaios

pré-clínicos aplicados em roedores para investigação dos efeitos induzidos pela estimulação cerebral na modulação e plasticidade cerebral, assim como no aprimoramento da técnica para aplicação terapêutica (Cambiaghi *et al.* 2010).

Segundo Andrews *et al.* (2011), uma hipótese para a melhora no desempenho em testes de memória operacional de indivíduos submetidos a estimulação anódica pode ser relacionada ao mecanismo de Potenciação de Longo Prazo, do inglês, *Long Term Potentiation* (LTP).

A LTP é definida como um aumento prolongado da magnitude da resposta sináptica de um neurônio pós-sináptico após uma estimulação curta e de alta frequência de um neurônio pré-sináptico (Lent, 2008).

Em uma revisão da literatura, Floel e Cohen (2007), sugeriram que a estimulação cortical em combinação com o treinamento da memória, pode otimizar o desempenho via LTP. De fato, sabe-se que a *tDCS* fortalece as conexões sinápticas induzindo LTP, e os efeitos a longo prazo da técnica dependem de modificações na eficácia dos receptores NMDA (Liebetanz *et al.*, 2002), bem como da síntese de proteínas, acompanhada por modificações nos níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPc) e Ca^{2+} (Nitsche *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o pensamento dos pesquisadores tem se voltado para esses mecanismos de plasticidade sináptica, tais como a LTP e a LTD (*Long Term Depression*, ou seja, depressão de longo prazo), como possivelmente envolvidos nos efeitos duradouros das diferentes polaridades da *tDCS*.

Embora os mecanismos de LTP sejam mais bem conhecidos no hipocampo, plasticidades sinápticas com propriedades muito similares são encontradas no

neocórtex e são comumente referidas como plasticidade tipo-LTP (Stagg e Nitsche, 2011).

Estudos já demonstraram a capacidade da *tDCS* em induzir neuroplasticidade. Monte-Silva, em um trabalho de 2013, demonstrou que sessões sucessivas de *tDCS* são capazes de induzir plasticidade similar à LTP com duração maior do que 1 hora no córtex motor de humanos (Monte-Silva et al., 2013).

Ainda em relação ao curso temporal dos efeitos da estimulação cerebral por corrente contínua, podemos dividi-los, em um primeiro momento, em função do tempo decorrido da aplicação da técnica. Durante o período de aplicação da corrente elétrica se observam efeitos essencialmente neuromodulatórios. Após cessada a aplicação, seus efeitos são essencialmente neuroplásticos (Brunoni, Pinheiro e Boggio, 2012).

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

Por outro lado, no período pós-estimulatório, as sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas, dependendo da polaridade da estimulação, são fundamentais na indução da neuroplasticidade associada a estimulação cerebral (Islam 1995).

Sobre este ponto, é importante salientar, que além da relação entre a ativação glutamatérgica e os efeitos da *tDCS* (Fregni *et al.*, 2005^a; Iyer *et al.*, 2005; Nitsche *et al.*, 2003), a atividade modulada pelo ácido γ aminobutírico (GABA),

também parece estar relacionada aos efeitos da estimulação neuronal. Foi verificada correlação positiva entre os efeitos da *tDCS*, aplicada no córtex motor primário (M1), com a redução da atividade dos receptores GABA e uma consequente alteração no grau de aprendizagem motora. Dessa forma, os indivíduos que demonstraram uma maior inibição dos receptores GABAérgicos, após estimulação anódica em M1, também apresentaram aprendizagem de curto prazo mais rápida. Estes resultados estão em consonância com a hipótese de que a plasticidade induzida via LTP dentro do neocórtex é criticamente dependente da modulação GABA.

Embora esteja se delineando algum conhecimento sobre a capacidade de modulação de certos neurotransmissores pela *tDCS*, ainda pouco se conhece sobre as modificações celulares de curto e longo prazo ocasionadas pela técnica ou outros protocolos de neuromodulação, havendo uma grande lacuna na literatura no que diz respeito a quais moléculas em potencial podem estar sendo produzidas ou que alterações estruturais ou metabólicas podem estar relacionadas aos efeitos neuroplásticos observados.

1.4. Os mecanismos celulares da estimulação cerebral

O periódico *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, em 2003, declarou que é essencial para melhorar a saúde humana a tradução de novos conhecimentos, mecanismos e técnicas geradas pelo avanço nas pesquisas básicas para oferecer novas possibilidades de prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças.

Com este pensamento, os estudos sobre os efeitos da estimulação por corrente elétrica nos animais possibilitaram a incorporação de conceitos importantes, como a compreensão de que os efeitos da *tDCS* estão associados a mudanças no limiar da membrana neuronal em repouso, produzindo mudanças no funcionamento da membrana neuronal na direção de uma despolarização (aplicação do ânodo) ou de hiperpolarização (aplicação do cátodo) (Bindman *et al.*, 1964; Púrpura e McMurtry 1965), e a partir desses estudos também devem surgir a maior parte dos conhecimentos bioquímicos e celulares relacionados a técnica.

Em 1972 Rosem e Stamm mostraram que a *tDCS* aplicada no córtex pré-frontal dorsolateral facilitou a aprendizagem em macacos, e diversos outros estudos apresentaram resultados favoráveis em modelos animais de diferentes patologias, como depressão (Fregni *et al.*, 2007, Liebetanz *et al.* 2006^a), isquemia cerebral (Kim *et al.*, 2010) e epilepsia (Liebetanz *et al.*, 2006^b).

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

Leffa *et al.*, 2016 avaliaram os potenciais efeitos terapêuticos da *tDCS* anódica em modelos animais de TDAH (Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade), e mostraram que a *tDCS* anódica na intensidade de 0,5 mA aplicada sobre o córtex frontal por 20 min durante 8 dias foi capaz de reduzir os déficits da memória de curto-prazo (do inglês STM *Short-term memory*) dos

animais avaliada através de um teste de reconhecimento de objetos conduzido em campo aberto.

1.5. O envolvimento dos canais iônicos

Uma vez que as alterações provocadas pela *tDCS* no potencial de repouso da membrana são dependentes de alterações iônicas, para se compreender melhor o envolvimento desses íons nos efeitos observados pela estimulação, Liebetanz *et al.* (2002) estudaram os efeitos da *tDCS* anódica e catódica aplicadas sobre o córtex motor, e de que maneira a administração de um bloqueador de canais de sódio dependentes de voltagem (carbamazepina), ou de um antagonista de receptor NMDA (dextrometorfano) interfeririam nos efeitos observados. Inicialmente os autores observaram o que já vinha sendo descrito: que a *tDCS* anódica resultou em aumento na excitabilidade cortical e *tDCS* catódica em diminuição.

A administração do antagonista NMDA, entretanto, suprimiu os efeitos pós-estimulação usualmente observados; os autores discutem tal achado como uma corroboração do envolvimento dos receptores NMDA em mecanismos de plasticidade neuronal induzidos pelos dois tipos de estimulação. Já a carbamazepina suprimiu os efeitos apenas da *tDCS* anódica, sugerindo a participação dos canais de sódio dependentes de voltagem nos efeitos da *tDCS* anódica, mas não da catódica (Liebetanz *et al.*, 2002).

Posteriormente, os efeitos da *tDCS* anódica ou catódica foram comparados quando aplicadas em conjunto com a administração de D-Cycloserine, um

agonista parcial de receptores NMDA. Os autores observaram um aumento na duração dos efeitos de elevação da excitabilidade cortical induzida pela *tDCS* anódica (Nitsche *et al.*, 2004), mostrando mais uma vez o envolvimento do receptor NMDA nos efeitos prolongados da estimulação.

A relação entre os canais de cálcio e os efeitos da *tDCS* anódica e catódica também foram estudados por Nitsche *et al.*, (2003).

Os pesquisadores investigaram as ações de bloqueadores de canais de cálcio (flunarizina) sobre os efeitos após estimulação de curta duração (com aplicação de *tDCS* de 4 segundos), e de longa duração (após *tDCS* entre 9 e 13 minutos).

Para a condição de curta duração, os autores observaram que o bloqueio de canais de cálcio não previne, mas diminui o aumento na excitabilidade observada durante a estimulação anódica. Por outro lado, o bloqueio desses canais iônicos não produziu interferência nos efeitos de diminuição da excitabilidade pós-cátodo.

Os autores consideraram que, em função dos efeitos do cátodo serem atribuídos a uma hiperpolarização da membrana neuronal e, assim, a uma inativação dos canais de sódio e cálcio, a administração de bloqueadores desses canais não resultaria de fato em nenhum efeito. Além disso, o antagonista de receptor NMDA não resultou em nenhuma alteração dos efeitos na estimulação de curta duração (onde também não ocorreu efeito pós-estimulação), mostrando que nesta aplicação de curta duração os efeitos não se encontram relacionados à eficácia desses receptores.

Já no caso de efeitos após a estimulação de longa duração, o bloqueio desses receptores interferiu nos efeitos pós-estimulação tanto no aumento da excitabilidade cortical pela *tDCS* anódica quanto na redução promovida pela *tDCS* catódica. Essas observações corroboram os achados anteriores de que os efeitos pós-estimulação de longa duração são dependentes do receptor NMDA.

Uma vez que estes receptores estão envolvidos em tais mudanças neuroplásticas, os autores consideram a possibilidade de aplicação da *tDCS* na modulação ou indução destes processos na prática clínica (Nitsche *et al.*, 2003).

Considerando-se que diferentemente de outras técnicas de estimulação, a estimulação por corrente contínua não deflagra diretamente potenciais de ação, mas altera o ambiente da rede neuronal, os mecanismos de ação desta técnica devem se basear não apenas em fatores neuronais sinápticos e não-sinápticos, mas também em outros componentes do sistema nervoso central (Brunoni, Pinheiro e Boggio, 2012), tornando importante a investigação não apenas das modificações eletrofisiológicas, mas também por alterações da produção de proteínas, no nível intracelular de cálcio, e expressão gênica durante, e após a estimulação.

Para aumentar sua eficácia e aplicabilidade clínica, as pesquisas envolvendo *tDCS* precisam se destinar a testar extensivamente todos parâmetros técnicos de estimulação (ex. duração, intensidade, número de sessões, intervalo entre as estimulações, etc), para que as correntes sejam cada vez mais bem direcionadas, visto que os mecanismos pelos quais a *tDCS* é capaz de interferir

em diversas funções do SNC - e assim repercutir na recuperação de pacientes - continuam não elucidados, tornando necessário que se estude de forma muito criteriosa a possibilidade de se aumentar cada vez mais a focalidade da corrente elétrica, para que os efeitos não se distribuam para áreas distantes do foco da estimulação, gerando alterações secundárias indesejáveis ou não esperadas, uma vez que a cada dia, vemos que são complexas as interações entre as estruturas do SNC, e tais interações podem afetar os resultados esperados.

Os estudos em animais continuam constituindo para esse fim, uma ferramenta importante na tentativa de preencher algumas dessas lacunas no nosso conhecimento, principalmente no que diz respeito à produção de proteínas e/ou outras moléculas cujo à síntese possa estar sendo afetada pelos efeitos da corrente elétrica, e quem sabe, estarem por trás de parte dos efeitos da estimulação. Para isso, mais estudos pré-clínicos são necessários, com uma aplicação cada vez mais precisa e sistematizada, aliada a análises bioquímicas e moleculares dos tecidos estimulados.

1.6. A Estimulação Epidural por Corrente Contínua (EECC)

Com esse objetivo, nos últimos anos, nosso laboratório desenvolveu um método alternativo de estimulação por corrente contínua de baixa intensidade para estudos em animais: a *eDCS*, do inglês: *Epidural Direct Current Stimulation*, ou no idioma português, EECC: Estimulação Epidural por Corrente Contínua.

O método desenvolvido no Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia (LCCNPF), da Universidade Federal do Espírito Santo, consistiu-se no modelo utilizado para o desenvolvimento de dissertação de mestrado, intitulada: **“Efeitos da estimulação repetitiva epidural de corrente contínua de baixa intensidade sobre o Córtex Pré-Frontal Medial esquerdo sobre a aprendizagem espacial em ratos”**, cujos resultados foram publicados na Revista Científica *Brain Stimulation*, (Custodio *et. al.*, 2013). Este modelo surgiu a partir da idéia de minimizar uma importante limitação da técnica de *tDCS*: sua baixa focalidade espacial. Isso é causado pelo tamanho relativamente largo dos eletrodos utilizados. Além disso, em protocolos padrão de *tDCS*, tanto o eletrodo de estímulo quanto o eletrodo de referência estão localizados sobre o couro cabeludo, acima do cérebro (Nitsche *et al.*,2007).

Considerando o grande número de possibilidades que se apresentam com as técnicas de neuromodulação, o desenvolvimento de uma alternativa que apresentasse uma maior focalidade da estimulação aliada a uma menor perda da corrente elétrica, nos pareceu de grande relevância para avançarmos no aperfeiçoamento da aplicação da corrente contínua de baixa intensidade de forma terapêutica, bem como para direcionarmos melhor nossas investigações celulares relacionadas aos efeitos da estimulação em regiões específicas do cérebro.

A *eDCS*, utiliza portanto, eletrodos posicionados diretamente acima da duramáter, diminuindo a perda da corrente aplicada e aumentando a focalidade da estimulação, possibilitando uma aplicação mais precisa da corrente elétrica.

Em nosso estudo anterior, aplicamos a *eDCS* na intensidade de corrente de 400 μA sobre o Córtex Pré-Frontal medial (CPFm) de ratos, e observamos seus efeitos sobre a memória operacional espacial de animais desempenhando uma tarefa complexa, com retardos prolongados, no labirinto radial de 8 braços.

Observamos, que os animais submetidos á *eDCS* anódica, na intensidade de 400 μA aplicada sobre o CPFm esquerdo por 11 minutos antes das sessões de testes, apresentaram significativamente um menor número de erros quando comparados aos animais *sham* após os retardos de 1, 4 e 10 horas, sugerindo que a *eDCS* anódica facilitou a memória operacional espacial de longa duração avaliada no labirinto radial de 8 braços nos três intervalos de retenção, promovendo uma facilitação da memória operacional espacial dos animais submetidos a técnica (Figura 4).

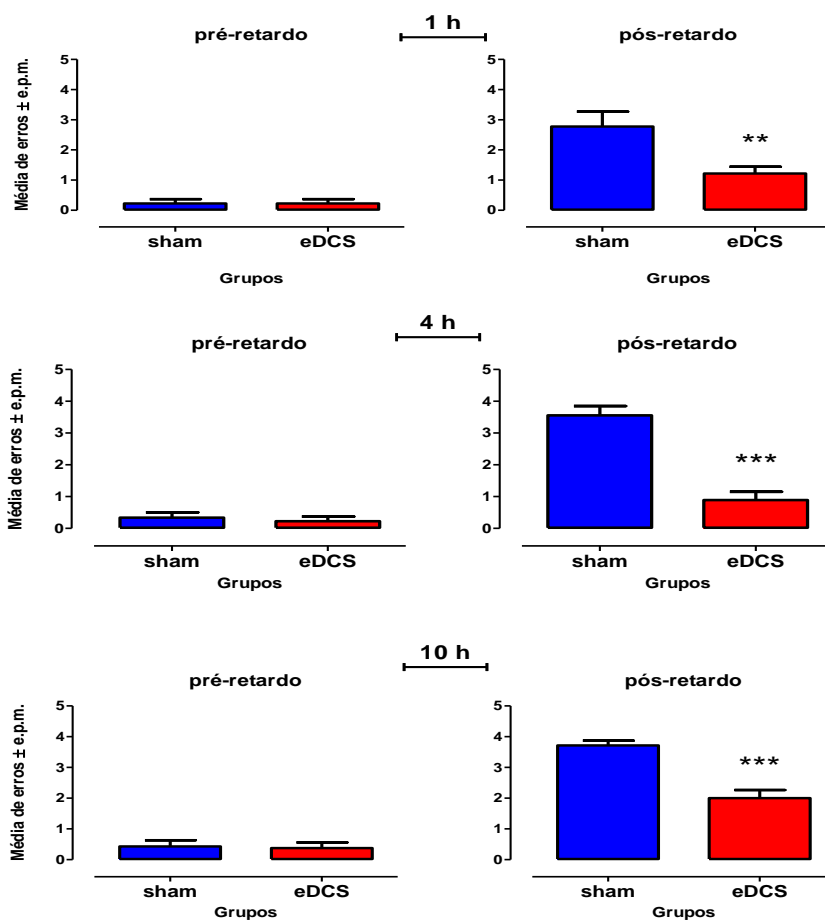


Figura 4: Efeitos da eDCS sobre a memória operacional de animais (média de erros \pm e.p.m.) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1, 4 e 10 horas no labirinto radial de 8-braços. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo *sham*. (Teste t de *Student* para medidas independentes $t=6,788$).

Em estudos realizados com seres humanos, foi demonstrado que os efeitos mais prolongados são dependentes da duração da estimulação: utilizando-se a mesma intensidade de corrente de 1mA aplicada por intervalos de tempos diferentes (5, 7, 9, 11 e 13 minutos), a *tDCS* produziu efeitos nos potenciais de membrana que se prolongaram por apenas 5 minutos após o fim das sessões mais curtas de estimulação (5 e 7 minutos); por 30 minutos após 9 minutos de

estimulação; e efeitos detectados 90 minutos após o fim da estimulação com duração de 13 minutos (Nitsche e Paulus, 2001).

Não podemos esquecer, porém, que efeitos mais duradouros podem estar ocorrendo devido a modificações neuroplásticas.

Os resultados observados mostrando uma facilitação da memória operacional dos animais após a *eDCS* anódica em nosso estudo anterior, particularmente após intervalos longos de retardo, foram os motivadores para o desenvolvimento do presente estudo, que se constitui mais um passo na busca de uma maior compreensão em relação aos efeitos fisiológicos das correntes elétricas de baixa intensidade sobre o SNC. Tais resultados conduziram nossos estudos em direção a um possível envolvimento de proteínas ou outras substâncias que estejam sendo moduladas pelo uso da estimulação, sendo muito importante entendermos que outras modificações, além das modificações nos potenciais elétricos podem estar sendo provocadas utilizando-se os diferentes protocolos.

Um importante alvo na busca por potenciais substâncias capazes de estar subjacentes aos efeitos prolongados da estimulação cerebral é o BDNF (*Brain Derived Neurotrophic factor*), ou em português, Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro.

O BDNF é uma proteína cuja expressão é ativada em decorrência de atividade neuronal no contexto de um evento de aprendizagem e memória (Bekinschtein *et al.*, 2007; Nagappan *et al.*, 2009; Ou *et al.*, 2010; Martinez-Moreno *et al.*, 2011; Mizuno *et al.*, 2012). Sabe-se que o fortalecimento da transmissão sináptica é frequentemente acompanhado por modificações estruturais na

sinapse, e o BDNF pode ser um dos fatores responsáveis por mediar essas alterações duradouras induzidas pela estimulação cerebral.

1.7. Os Fatores Neurotróficos

Historicamente, as proteínas que se ligam a receptores transmembranas foram divididas em categorias, tais como os fatores neurotróficos, citocinas e fatores de crescimento. Dependendo do tipo de célula ou do local em que atuam, muitas destas proteínas podem exercer uma variedade de efeitos, incluindo proliferação, maturação e suporte trófico (Choi *et al.*, 2009; Hagg, 2009).

O BDNF classifica-se como um fator neurotrófico, e é estruturalmente relacionado ao fator de crescimento do nervo (NGF) (Alonso, Vianna, Depino, *et al.*, 2002), sendo importante para o desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados.

Foi o segundo componente descoberto das famílias das neurotrofinas, tendo sido isolado inicialmente em neurônios de porcos, onde mostrou-se capaz de promover a sobrevivência de subpopulações de gânglios dorsais, sendo então purificado (Barde, 1994).

A ação celular das neurotrofinas é mediada por dois tipos de receptores, o receptor pan-neurotrófico de baixa afinidade (p75^{NTR}) e os receptores da família Trk (tirosina cinase).

O BDNF é liberado inicialmente em uma pró-isoforma conhecida como pró-BDNF (~37 (kDa), que possui afinidade pelo p75NTR, e está relacionado a eventos pró-apoptóticos. O pró-BDNF pode ser clivado por proteases para formar o BDNF maduro (mBDNF ~ 14kDa), sendo que este último liga-se ao receptor TrkB promovendo sobrevivência e crescimento neuronal (Barker, 2009). *Ver figura 22.*

A partir de sua descoberta, a ação do BDNF no SNC do adulto vem sendo estudada, e parece incluir efeitos neurotróficos e neuroprotetores de longo prazo (Murer *et al.*, 2001), além de incluir um papel na plasticidade sináptica e na liberação de neurotransmissores, facilitando a liberação de glutamato (Glu), GABA, dopamina e serotonina (Tyler *et al.*, 2002; Yoshii e Constantine-Paton, 2010).

O BDNF é existente em quantidades abundantes nos circuitos neurais hipocampais e no córtex cerebral, que são áreas envolvidas na regulação da memória e atenção, e é uma proteína fundamental na formação das estruturas do lobo temporal e na neurotransmissão, e crucial para a formação dos dendritos dos neurônios, das sinapses e de outros processos plásticos que ocorrem nessas estruturas.

Em relação ao envolvimento do BDNF nos efeitos provocados pela estimulação cerebral, foi observado que em camundongos *Knockout* para o receptor do BDNF (TrkB), os aumentos nas amplitudes dos picos dos potenciais pós

sinápticos excitatórios observados pela estimulação anódica foram completamente abolidos (Fritsch *et al.*, 2010).

Fazendo um paralelo com os estudos realizados na pesquisa clínica, podemos citar uma pesquisa realizada com indivíduos que expressam o polimorfismo BDNF *Val66Met*, que afeta a liberação de BDNF, resultando em uma redução média de 18 a 30% nos níveis dessa neurotrofina. Nesses voluntários, a aquisição de habilidades motoras após um tratamento de 5 dias com *tDCS* foi significativamente menor quando comparados a voluntários que não expressam este polimorfismo (Fritsch *et al.*, 2010). Este polimorfismo suprime ainda as alterações da excitabilidade da medula espinhal normalmente observadas durante a estimulação (Lamy e Boakye, 2013), indicando mais uma vez, o envolvimento do BDNF nos efeitos obtidos pela *tDCS*.

O BDNF se configurou, portanto, como um importante alvo para nossos estudos em busca de uma maior compreensão sobre os mecanismos relacionados à melhora cognitiva através da estimulação cerebral por correntes elétricas, e consideramos de extrema importância um melhor entendimento sobre a sua produção e liberação em resposta aos diferentes protocolos de estimulação, e sobre seu papel nos processos cognitivos.

1.8. O Córtex Pré-Frontal (CPF)

Uma das questões fundamentais da neurociência é como comportamentos e respostas complexas e coordenadas, surgem a partir da integração da atividade de bilhões de neurônios distribuídos no cérebro.

Mesmo respostas cognitivas simples podem contar com numerosas interações entre os sistemas de entrada (*Bottom up*) e saída (*Top Down*) do SNC. Animais com menos de cem mil neurônios (no cérebro humano existem 100 bilhões ou mais de neurônios) podem organizar e coordenar ações para buscar alimentos ou evitar predadores. Para animais com cérebros maiores, o comportamento é ainda mais flexível. Mas a flexibilidade traz um custo: embora nossos elaborados sistemas sensorial e motor tenham a capacidade de fornecer informações detalhadas sobre o mundo externo e disponibilizar um grande repertório de ações respectivamente, isso introduz um maior potencial de interferência e confusão. Quanto mais complexas as informações que temos sobre o mundo, e quanto maior o número de opções de respostas comportamentais, maior a necessidade de integrar e coordenar essas ações, o que requer atenção, flexibilidade na tomada de decisão, e controle inibitório (Miller e Cohen, 2001).

Para isso, possuímos mecanismos que integram as informações sensoriais e direcionam respostas apropriadas. A região cortical que sem dúvidas é essencial para o funcionamento adequado dessa maquinaria é o córtex Pré-frontal (CPF).

O CPF é a última região do hemisfério cerebral a amadurecer, sendo pouco desenvolvida em animais menos complexos cognitivamente, e consideravelmente grande em primatas (Luria, 1981; Kolb, 1984; Adams *et al.*, 1997). Essa correlação provavelmente se deve ao fato de que o papel do CPF não está voltado para realização de comportamentos mais simples ou respostas automáticas ou estereotipadas, mas sim para situações que requerem respostas mais complexas, em que seja necessária uma organização temporal das ações, o processamento de novas informações, o controle inibitório, e uma resposta adequada em direção a um determinado objetivo (Fuster 2002).

A capacidade para processar as informações recebidas e planejar ações apropriadas num tempo futuro, em detrimento de responder ao estímulo sensorial de uma maneira reflexiva, é altamente desenvolvida em primatas e depende, similarmente, de um CPF altamente desenvolvido (Constantinidis *et al.*, 2002).

Para a execução de uma ação, mediante uma percepção, o CPF utiliza-se de pelo menos três funções cognitivas importantes nessa organização temporal do comportamento: uma função retrospectiva para manutenção da informação sensorial recente (memória operacional), uma função prospectiva de preparação para a resposta motora (planejamento) (Olton, 1979; Baddeley, 1997) e uma função responsável pelo controle inibitório de interferência (Fuster, 2000).

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

Para desempenhar esse seu papel integrativo, o CPF precisa estar associado aos sistemas sensoriais, motores e mnemônicos, e de fato, em relação às outras áreas do lobo frontal, indiscutivelmente, o CPF é a estrutura cortical que recebe mais conexões.

Histologicamente, é caracterizado por apresentar uma proeminente camada celular IV, ou camada granular, e recebe projeções de todas as outras regiões dos lobos frontais, além de maciças projeções provindas do núcleo médiodorsal do tálamo. Sendo que em primatas humanos e não-humanos, está localizado rostralmente às áreas motoras do córtex cerebral, sendo dividido em três regiões anatomicamente definidas (lateral, medial e ventral ou orbital), as quais foram subdivididas por Brodmann em áreas que variam de acordo com sua citoarquitetura (Figura 5) (Fuster, 2002).

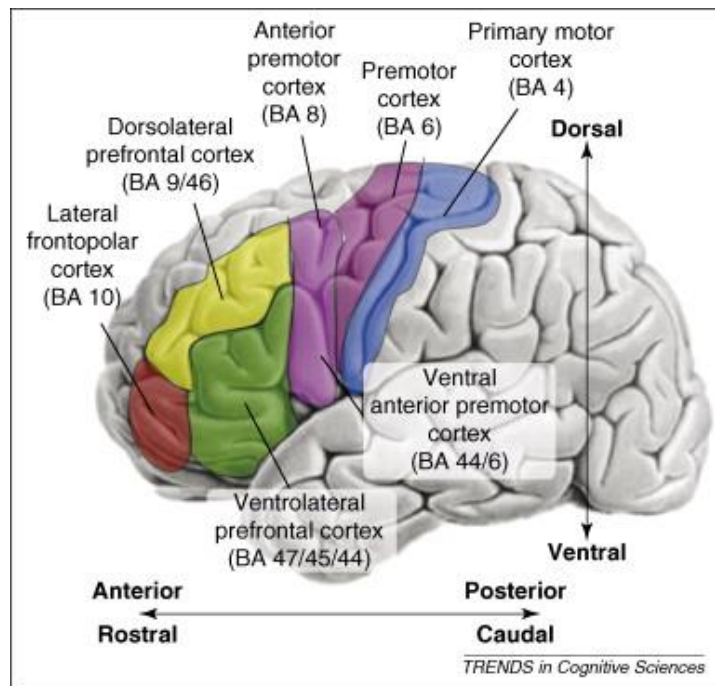


Figura 5: Divisões do CPF segundo o mapa arquitetônico de Brodmann (1909).

O CPF por muito tempo foi considerado exclusivo das espécies de primatas, devido à ausência do córtex granular em espécies não primatas (Uylings, Groenewegen e Kolb 2003), até que em 1948, Rose e Woolsey propuseram que o CPF em roedores corresponderia à área que recebe maciça projeção do núcleo médiodorsal do tálamo (NMDT), e este campo de projeção seria equivalente em diversas espécies de mamíferos (Rose e Woolsey, 1948; *apud* Uylings, Groenewegen e Kolb 2003).

Adicionalmente, a definição de Rose e Woolsey's do CPF baseada apenas em critérios anatômicos, um estudo realizado em 2003 levantou dados relacionados a diferentes critérios estruturais e funcionais para traçar uma homologia entre as áreas corticais de roedores e primatas, e os autores concluíram que os ratos possuem um córtex pré-frontal funcionalmente dividido

que possui características semelhantes não apenas ao córtex orbital e medial dos primatas como também ao córtex pré-frontal dorsolateral.

O CPF em roedores pode ser subdividido, portanto, em áreas infralímbica (IL), pré-límbica (PL), cíngulo anterior, ventral e dorsal (AC1 e AC2); área pré-central (Fr2 ou PrC), área orbital (medial- MO, ventral- VO, ventro-lateral- VLO e lateral- LO); e em área agranular insular ventral e dorsal que compõe o córtex gustatório (Dalley, 2004; Uylings, Groenewegen e Kolb 2003; Vertes 2002) (Figura 6).

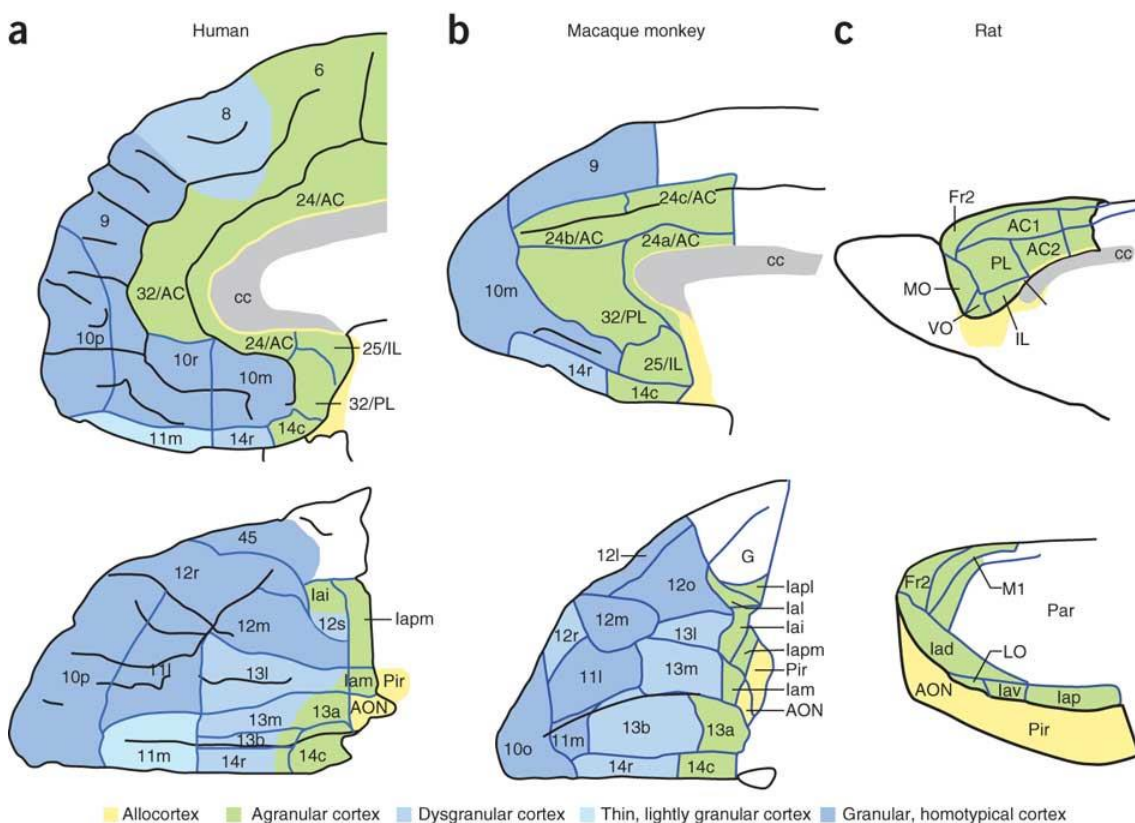


Figura 6: (a,b) Mapa arquitetônico dos lobos frontais em humanos (a), primatas (b), e roedores (c). (AC: cíngulo anterior; Fr2 ou PrC: área pré-central; I: insula; IL: córtex infralímbico; M1: área motora primária; MO: área medial orbital; o: orbital; p: posterior; Par: córtex parietal; Pir: córtex piriforme; PL: córtex pré-límbico; r, rostral; s, sulcal; v, ventral; VO, área ventral orbital. (*Nature Neuroscience*, 2012).

O papel funcional preciso dessas inúmeras conexões do CPF ainda não é inteiramente conhecido, mas podemos inferir com base no papel funcional das estruturas com as quais está conectado, que as conexões pré-frontais-límbicas estão envolvidas no controle do comportamento emocional, enquanto as conexões estriatais estão envolvidas na coordenação do comportamento motor (Fuster 2002).

Nossos estudos se relacionam a região medial do CPF (CPFm), uma vez que esta região em ratos é equivalente, em relação às funções, à região dorsolateral em humanos e, possivelmente, cíngulo anterior em primatas (Figura 7), sendo também uma região envolvida no circuito de gratificação cerebral, portanto, uma estrutura mediadora dos efeitos reforçadores de algumas drogas de abuso, além de ser o sítio neuroanatômico de várias funções cognitivas complexas, incluindo a memória operacional (Goldman-Rakic, 1995; Tzschentke, 2000; Dalley *et al.*, 2004).

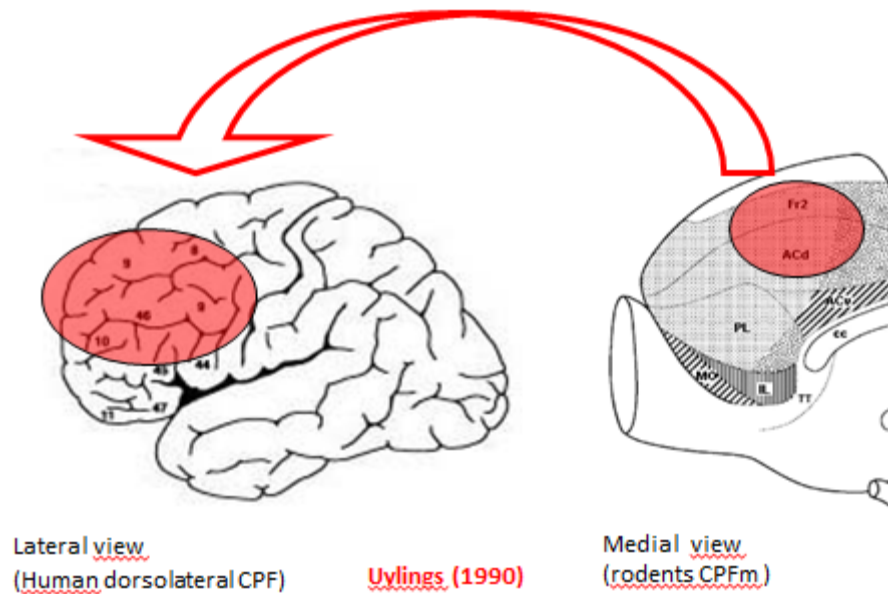


Figura 7: Esquema representando a homologia entre a região medial do CPF e o CPFDL de seres humanos. O CPFm é equivalente, em relação as funções, às regiões dorsolateral e, possivelmente, cíngulo anterior de primatas estando envolvida no circuito de gratificação cerebral, e uma estrutura mediadora dos efeitos reforçadores de algumas drogas de abuso (Uylings, 1990).

O papel do CPFm em relação as funções de memória e aprendizado foi demonstrado através de experimentos com animais utilizando-se tarefas de resposta com retardo (*delayed-response*). Disfunções cognitivas e de memória associadas à lesões no CPFm, são particularmente aquelas que envolvem a interposição de um intervalo de tempo (segundos, minutos ou horas) geralmente no meio da realização de uma tarefa cognitiva (DelaTour e Gisquet-Verrier, 1999), ou seja, relacionadas a memória operacional.

Uma vez que nossos estudos anteriores mostraram uma melhora da memória operacional dos animais submetidos a eDCS anódica sobre o CPFm na realização de tarefas cognitivas, e principalmente, devido ao fato de esses

efeitos de facilitação estarem presentes mesmo após longos intervalos de tempo, é provável que tais efeitos estejam sendo dependentes de síntese proteica e outros mecanismos celulares.

Analisando as ações fisiológicas do BDNF como neuromodulador, e seu envolvimento nos processos neuroplásticos, uma vez que a proteína possui a capacidade de ativar múltiplas vias de sinalização que podem agir de forma a regular os efeitos necessários para a plasticidade axonal e sináptica e formação da memória, e estar relacionado, por exemplo, à promoção ou desenvolvimento de espículas dendríticas (Ploughman, 2005, Vaynman, 2003, 2006; Wu, 2004), o atual estudo objetiva investigar seu possível envolvimento na neuromodulação promovida pela *eDCS*.

Ou seja, uma vez que o BDNF é um neuromodulador envolvido nos mecanismos de memória e aprendizagem, e a *eDCS* parece alterar de forma significativa e persistente o padrão de aprendizagem de animais desempenhando tarefas cognitivas complexas, a *eDCS* por si só, seria capaz de modular os níveis de BDNF no CPF dos animais?

Com este objetivo, e tentando traçar um paralelo com nossos estudos anteriores e outros trabalhos disponíveis na literatura, o presente estudo busca responder, se a estimulação epidural por corrente contínua na intensidade de 400 μ A induz alterações nos níveis de BDNF no CPF de ratos, e quais são os efeitos da polaridade nos parâmetros observados.

2 .OBJETIVOS

2- OBJETIVOS GERAIS

Investigar as modificações agudas e crônicas nos níveis de BDNF no CPFm de ratos adultos submetidos a modulação cortical com diferentes polaridades, através da estimulação epidural por corrente contínua de baixa intensidade.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar as alterações de curto prazo induzidas pela estimulação epidural anódica e catódica por corrente contínua de baixa intensidade sobre os níveis de BDNF no CPF de ratos.
- Investigar as alterações de curto prazo induzidas pela estimulação epidural anódica e catódica por corrente contínua de baixa intensidade sobre os níveis de Pró-BDNF e BDNF maduro no CPF de ratos.
- Examinar o curso temporal das modificações agudas observadas nas diferentes polaridades de estimulação.
- Avaliar as alterações de longo prazo induzidas pela estimulação epidural anódica e catódica por corrente contínua de baixa intensidade sobre a os níveis de BDNF no CPF de ratos.
- Investigar as alterações de longo prazo induzidas pela estimulação epidural anódica e catódica por corrente contínua de baixa intensidade sobre a os níveis de Pró-BDNF e BDNF maduro no CPF de ratos.

- Estudar a correlação entre as modificações celulares observadas e os parâmetros fisiológicos investigados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, pesando entre 250 e 300 g, provenientes da colônia do biotério do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno medindo 30 cm de comprimento, 19 cm de largura, e 13 cm de altura, em ambiente climatizado ($22^{\circ} \text{C} \pm 2$), e ciclo claro-escuro artificial de 12 h, com alimento e água *ad libitum* (Figura 8).



Figura 8: Biotério do laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia /CCS - UFES

O manuseio, cuidado e experimentos feitos nesses animais experimentais seguiram de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais estabelecidos pelo *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National

Research Council, 2011) and the “EC Directive 86/609/EEC”. Além dos princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais, além da Resolução N°714/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária no que diz respeito aos procedimentos anestésicos e eutanásia. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES-CEUA 09/2011).

3.2. Adaptação, Manuseio e Contenção

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

No presente estudo os animais foram acondicionados no biotério para adaptação ao local de realização do estudo aos 30 dias de vida e submetidos ao manuseio a partir de 40 dias (três vezes/semana), e a adaptação a contenção foi realizada a partir de 1 semana antes do início dos procedimentos experimentais (Figura 9), ambos os procedimentos foram realizados até o dia anterior à cirurgia para implante do eletrodo.



Figura 9: Sessões de manipulação (acima) e contenção (abaixo) dos animais foram realizadas previamente, com o objetivo de habitua-los aos procedimentos realizados nos protocolos experimentais.

3.3. Procedimento cirúrgico para fixação do eletrodo de estimulação

Para a realização da estimulação epidural anódica ou catódica por corrente contínua, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para colocação de um eletrodo, na região epidural acima do córtex pré-frontal medial esquerdo (Figura 10).

Inicialmente, os animais foram anestesiados com Cetamina (75 mg/kg) + Xilazina (10 mg/kg) em um volume de 0,1 mL/100g de peso corpóreo.

Os animais foram fixados no estereotáxico (modelo 51600, Stoeling, IL, EUA), onde os seguintes procedimentos foram realizados:

1. Assepsia com álcool iodado na área cirúrgica;
2. Injeção no tecido subcutâneo de um botão anestésico com 0,2 mL de solução de 1 % lidocaína;
3. Corte da região do botão anestésico, com remoção da pele e tecido subcutâneo para exposição da calota craniana na região do bregma;
4. Realização das primeiras medidas estereotáxicas, para definição e marcação do local de fixação do eletrodo;
5. O posicionamento do eletrodo foi: + 2,5 mm AP, + 1 mm L em relação ao Bregma para o alcance do córtex pré-frontal;
6. Após a marcação do local foi realizada uma abrasão da superfície craniana com o auxílio de uma mini-furadeira (Dremel Multipro + Kit, Stoeling, IL, USA), até a exposição da duramater, sem que as meninges fossem perfuradas.
7. Preenchimento da abertura craniana (5 mm) sobre a duramater com gel condutor;
8. O eletrodo de 5 mm de diâmetro era posicionado acima da abertura do crânio sobre o CPFm e fixado com resina acrílica auto-polimerizável de secagem rápida (polímero de metacrilato, JET, São Paulo, SP, Brasil);
9. Após o procedimento cirúrgico e ainda sob o efeito da anestesia o animal recebeu aproximadamente 0,2 mL de Penicilina G Benzatina 24.000 UI por via intramuscular.

10. Foi realizada também uma tricotomia na região posterior direita do animal, próximo ao pescoço, onde o eletrodo de retorno era posicionado no momento da estimulação, para uma melhor fixação do mesmo.
11. Posteriormente ao procedimento cirúrgico, o animal foi mantido em local aquecido para recuperação pós-anestésica;
12. Após recuperação, o animal retornava para sua gaiola-casa;



Figura 10: Procedimento cirúrgico para implantação do eletrodo de estimulação acima do CPFm esquerdo (detalhes estão descritos no texto).

Obs.: Para os animais submetidos ao procedimento repetitivo, uma estrutura de ancoragem adicional foi utilizada, fixando-se uma presilha plástica, através de pequenos orifícios na lateral do crânio, conforme mostrado na figura 11.



Figura 11: Presilha plástica para fixação do eletrodo de estimulação utilizada nos animais que receberam tratamento repetitivo. O fixador era composto por material plástico para evitar interferência na corrente elétrica.

3.4. Delineamento Experimental dos protocolos de estimulação

Para realizarmos a análise dos efeitos da estimulação elétrica anódica e catódica sobre os níveis de BDNF no CPF, os animais foram distribuídos por randomização em grupos de 4 ou 5 animais, conforme descrito abaixo .

A figura 12, mostra um fluxograma do desenho experimental utilizado.

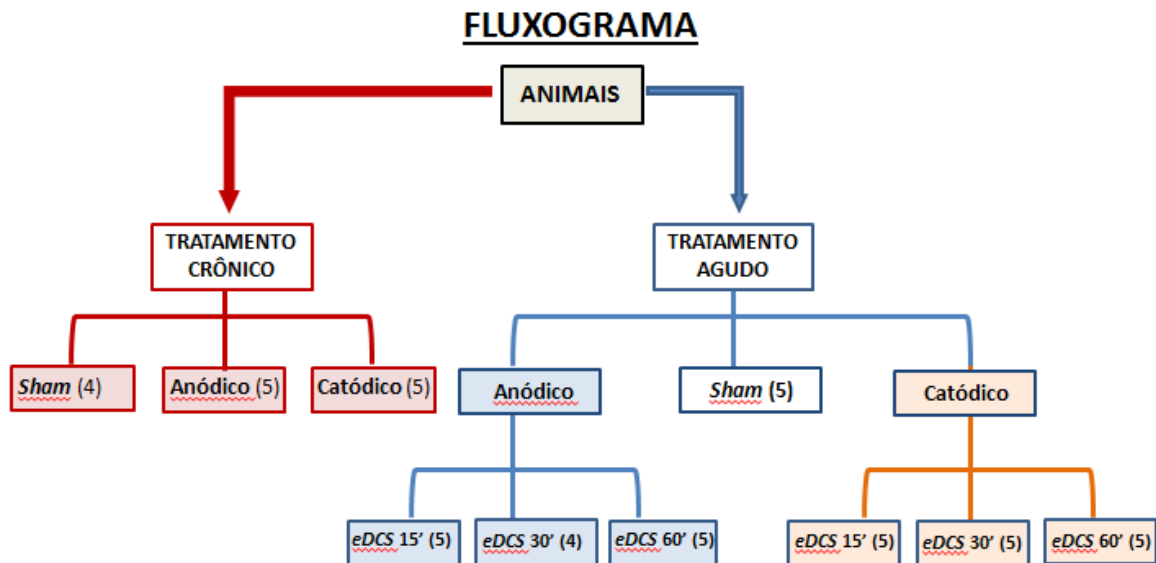


Figura 12: Desenho experimental dos protocolos realizados no estudo.

3.5. ESTIMULAÇÃO AGUDA

3.5.1. Estimulação Anódica Aguda (AA)

(1) Grupo eDCS anódico agudo 15' (n=4)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação anódica de 400 μ A por 11 minutos por um estimulador de corrente contínua (Modelo EFF-341, Insight Equipamentos Ltda., Brasil), e foram eutanasiados decorridos 15 minutos do final da sessão de estimulação.

(2) Grupo eDCS anódico agudo 30' (n =5)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação anódica de 400 μ A por 11 minutos, e foram eutanasiados decorridos 30 minutos do final da sessão de estimulação

(3) Grupo eDCS anódico agudo 60' (n =5)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação anódica de 400 μ A por 11 minutos, e foram eutanasiados decorridos 60 minutos do final da sessão de estimulação

(4) Grupo Sham (n = 5)

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

Os animais foram submetidos a simulação de estimulação por 11 minutos, e foram eutanasiados decorridos 30 minutos do final da sessão.

A figura 13 mostra o posicionamento dos eletrodos e o acondicionamento do animal durante o protocolo experimental.

3.5.2. ESTIMULAÇÃO CATÓDICA AGUDA (CA)

(1) Grupo eDCS catódico 15' (n =5)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação catódica de 400 μ A por 11 minutos, e foram eutanasiados decorridos 15 minutos do final da sessão de estimulação.

(2) Grupo eDCS catódico 30' (n =5)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação catódica de 400 μ A por 11 minutos, e foram eutanasiados decorridos 30 minutos do final da sessão de estimulação

(3) Grupo eDCS catódico 60' (n =5)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação catódica de 400 μ A por 11 minutos, e foram eutanasiados decorridos 60 minutos do final da sessão de estimulação

(4) Grupo Sham (n =5)

Neste grupo os animais foram submetidos a simulação de estimulação por 11 minutos, e foram eutanasiados decorridos 30 minutos do final da sessão.

3.6. ESTIMULAÇÃO EPIDURAL REPETITIVA ANÓDICA E CATÓDICA

Com o objetivo de avaliar os efeitos da estimulação elétrica repetitiva sobre os níveis de BDNF no CPF, os animais foram submetidos a 5 (cinco) dias de *eDCS* (catódica ou anódica), e o processo de eutanásia e retirada do material biológico para análise se deu 24 horas após o final da última sessão de estimulação.

(1) Grupo *eDCS* anódico ($n=4$)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação catódica de 400 μA por 11 minutos durante 5 dias e foram eutanasiados decorridos 24 horas do final da última sessão de estimulação.

(2) Grupo *eDCS* catódico ($n=5$)

Neste grupo os animais foram submetidos a estimulação catódica de 400 μA por 11 minutos durante 5 dias, e foram eutanasiados decorridos 24 horas do final da última sessão de estimulação.

(3) Grupo *Sham* ($n=5$)

Neste grupo os animais foram submetidos a simulação de estimulação por 11 minutos durante 5 dias, e foram eutanasiados decorridos 24 horas do final da última sessão de estimulação.

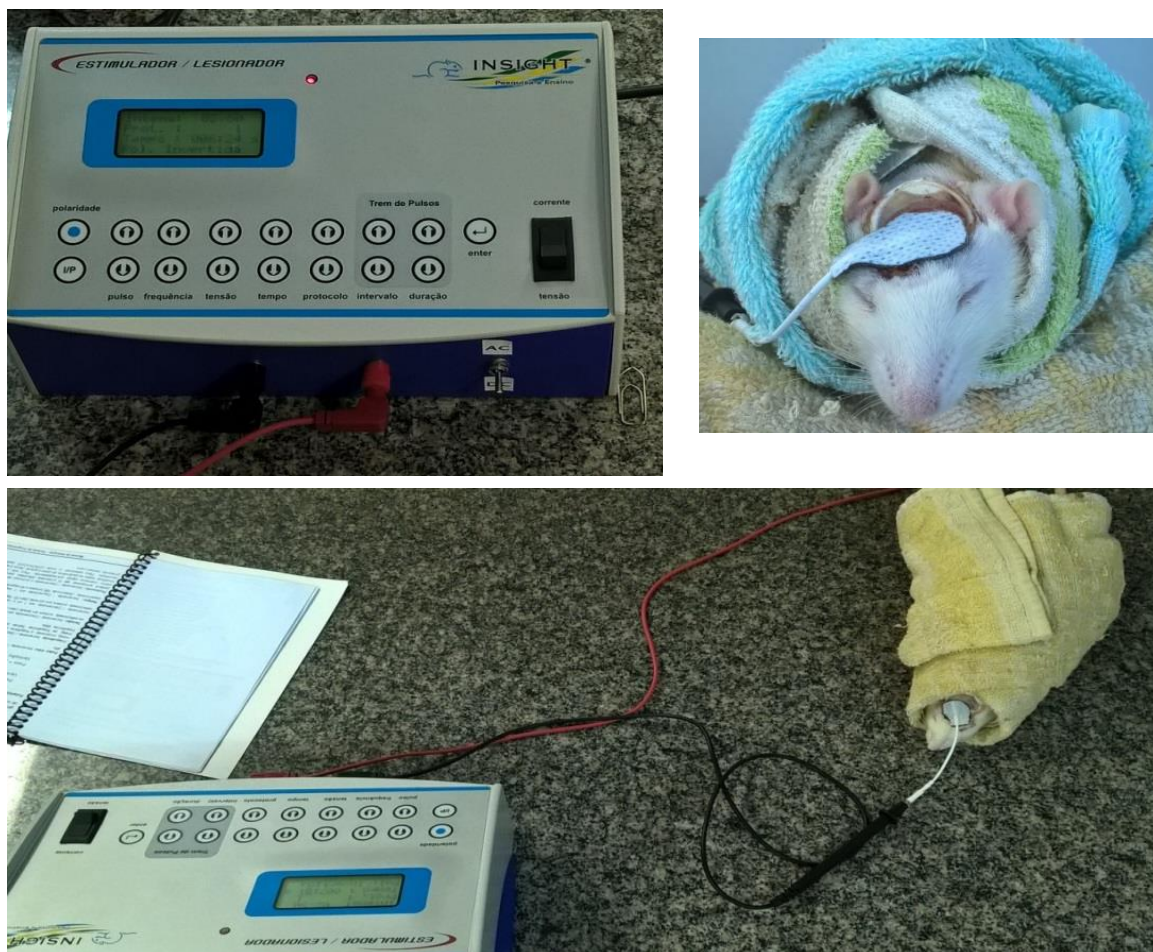


Figura 13: Procedimento de estimulação epidural por corrente contínua de baixa intensidade (Insight®). O eletrodo (ânodo ou cátodo) é posicionado sobre a prótese anteriormente implantada, e o eletrodo de retorno se localiza na região posterior do pescoço do animal.

Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com o auxílio de uma guilhotina (Insight®).

Após a eutanásia, e retirada do cérebro dos animais, os mesmos foram banhados com solução salina (0,9% NaCl) a 4°C, e dissecados o CPF e o hipocampo. Todo procedimento foi realizado sobre uma placa refrigerada, e no menor tempo possível.

Essas estruturas foram, então, devidamente acondicionadas em criotubos e estocadas a -80°C para posterior análise por *Western Blot*.

3.7. Obtenção do extrato proteico do Córtex Pré-frontal

Para extração das proteínas das amostras de CPF, utilizou-se a metodologia descrita por Rong e Baudry (1996), com modificações.

Amostras (50 - 100mg) do CPF foram homogeneizadas em banho de gelo, utilizando um sonicador, por 3 ciclos de 15 segundos a velocidade 5, com intervalos de 30 segundos entre os ciclos, em tampão de lise na proporção de 1:10 (p/v), o qual continha (NaCl 137 mM, Tris-HCl 20mM, 0,5 mM Vanadato de sódio, 10% glicerol, 1% NP40 e inibidores de proteases (Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO, USA). Para remoção do material insolúvel do lisado celular, o homogenato obtido foi centrifugado à 16.000 g por 30min à 4°C . O conteúdo proteico do sobrenadante (extrato solúvel) foi quantificado utilizando-se o kit de dosagem de proteína 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences[®]), conforme as indicações do fabricante e descrito abaixo. Os sobrenadantes foram aliquotados e armazenadas à -80°C .

3.8. Dosagem de proteínas

Este processo tem como primeira etapa a precipitação das proteínas do extrato, com o objetivo de eliminar substâncias que poderiam interferir na dosagem.

As proteínas precipitadas são solubilizadas em solução contendo cobre, e o cobre livre é então quantificado utilizando um agente colorimétrico. A absorvância do cromóforo gerado é lida em 480 nm. Neste processo a absorção é inversamente proporcional à concentração de proteínas na solução (linear na faixa de 0 a 50 µg).

A curva de calibração foi preparada com diluições sucessivas de uma solução de albumina bovina sérica (BSA - *Bovine Serum Albumin*, SigmaAldrich®), em uma faixa de 0 a 50 µg/mL. Foram adicionados as amostras e padrões 500 µL do “agente precipitante” e rapidamente agitados em vórtex. e mantidos em temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 500 µL do agente co-precipitante, e realizada nova agitação em vortex. A solução resultante foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 x g. Ao precipitado foi adicionado 100 µL da solução de cobre e 400 µL de água milli-Q, e novamente agitados em vortex. A esta solução foi adicionada 1 mL do reagente de cor. Após 15 a 20 minutos, a absorvância foi medida a 480 nm, em espectrofotômetro.

As amostras obtidas (extrato proteico) foram aliqüotadas e armazenadas para posterior avaliação dos níveis de BDNF no CPF.

3.9. Dosagem dos níveis de BDNF

Os níveis de BDNF nos vários grupos experimentais, foram avaliados por
pela técnica de *Western blot*.

3.10. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras de 60µg de proteínas solúveis (obtidas conforme o item 3.7) foram submetidas a Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) de acordo com Laemmli 1970.

As amostras foram solubilizadas no tampão da amostra contendo SDS e β-mercaptoetanol (Tris – HCl pH 6.8 com uma concentração de 0,5 M, glicerol, SDS (Dodecil sulfato sódio) 10% (peso/volume), e 0,4 ml de azul de Bromofenol., submetidas temperatura de 90°C, por 5 min.

A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 50-100V. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, com corrente de 100V por 1 hora. Após a transferência a membrana foi lavada em solução tampão fosfato-salina e *Tween* (TBS-T – TRIS 10mM, NaCl 100mM, *Tween 20*[®]) e posteriormente bloqueada por 2 horas em solução de 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anti-corpo primário anti-BDNF (Alomone[®]) (1:500) *overnight* a 4°C e então lavada 3 vezes (10 minutos cada) em TBS-T, e posteriormente incubada com anticorpo secundário anti-rabbit (Santa Cruz[®]) (1:2500) por 1 hora à temperatura ambiente. Após mais 3

lavagens de 10 minutos com TBS-T as membranas foram reveladas por quimioluminescência (Solução ECL plus) utilizando para esse fim o Quemidoc (Bio-Rad®). O controle de carregamento foi realizado com o GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).

3.11. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A comparação nos níveis de BDNF detectados entre os grupos (*sham* vs *eDCS*) em cada polaridade (anódica ou catódica) e após cada intervalo de tempo (15, 30 e 60 minutos) após estimulação aguda, bem como a comparação entre os grupos (*sham*, anódicos e catódicos) da estimulação repetitiva foram feitas empregando-se análises de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste *post hoc* de comparações múltiplas de Bonferroni por serem todos os grupos independentes.

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Em todas as análises foi considerado um nível de significância para $p < 0,05$. Para as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foi empregado o programa GraphPad Prisma® em sua versão 4.0.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da *eDCS* anódica aguda sobre a intensidade do BDNF total no CPF de ratos

A Figura 14 apresenta os resultados da análise da densitometria do somatório das bandas imunorreativas correspondentes as migrações do pró-BDNF (32 kDa) e do BDNF maduro (14 kDa), que corresponde ao BDNF total, normalizadas em relação ao GAPDH, no CPF de ratos 15, 30 ou 60' após estimulação epidural anódica aguda na intensidade de 400 μ A por 11 minutos. Observou-se que a ***eDCS* anódica** produziu uma mudança significativa [$F(3,15) = 8,83$; $p = 0,0023$] no perfil da intensidade do BDNF total. Verificou-se uma menor intensidade dos níveis de BDNF total 15 minutos após a *eDCS* anódica se comparado ao grupo *sham* ($p < 0,01$), o que não foi observado 30' e 60' após a estimulação, sendo que os grupos *eDCS* 30' e *eDCS* 60' apresentaram significativamente uma maior intensidade de BDNF total (Figura 14), quando comparados aos animais do grupo *eDCS* 15' ($p < 0,05$) e não se diferiram do grupo *sham*.

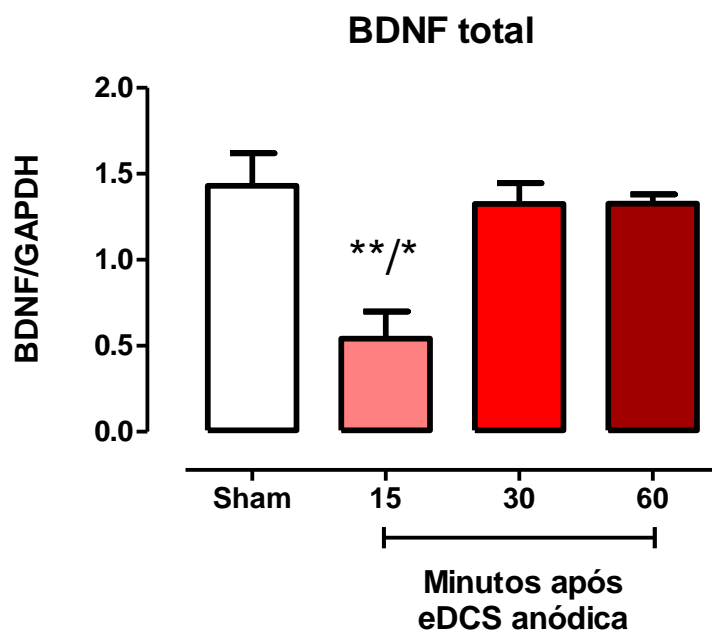


Figura 14 – Análise dos níveis de BDNF total no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos submetidos ao procedimento controle (*Sham*, $n = 4$) e nos tempos de 15 ($n = 4$), 30 ($n = 4$) e 60 ($n = 4$) minutos após uma única aplicação da Estimulação Epidural por Corrente Contínua **anódica** (*eDCS* de *epidural Direct Current Stimulation*, $400 \mu\text{A}$). Os resultados estão representados pela média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado aos tempos de 30 e 60 min; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo *Sham* (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni). (Valores retirados da figura 15 A).

4.1.1. Efeitos da eDCS anódica aguda sobre a intensidade de Pró-BDNF e BDNF maduro no CPF de ratos

A figura 15 mostra a análise das intensidades das duas isoformas do BDNF – **Pró-BDNF e BDNF maduro** - no CPF dos animais que receberam **eDCS anódica aguda**. Os resultados mostraram diferenças significantes entre os grupos, para as proporções de pró-BDNF [$F(3,15) = 6,675$; $p = 0.007$] e BDNF maduro [$F(3,15) = 37,92$; $p < 0,0001$] (Figura 15).

Foi observada uma **menor** intensidade do **pró-BDNF** nos animais após a aplicação da **eDCS anódica aguda** comparado ao *sham*, sendo significativa após 30 minutos decorridos do término da estimulação ($p < 0,05$), e essa redução permaneceu aos 60 minutos pós-eDCS ($p < 0,05$) (Figura 15 B).

Em relação aos níveis de **BDNF maduro**, observou-se uma **menor** intensidade das bandas correspondentes nos animais eutanasiados **15 minutos pós-eDCS anódica aguda** ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo *sham*, e aos grupos analisados 30 e 60 minutos após a estimulação. Sendo que a análise estatística mostrou que esses dois últimos grupos apresentam níveis similares ($p < 0,001$) aos encontrados no grupo *sham* (Figura 15 B).

Estes resultados sugerem que a estimulação anódica aguda, de alguma forma, interfere na transformação do pró-BDNF em BDNF maduro nos primeiros 15 minutos pós-eDCS.

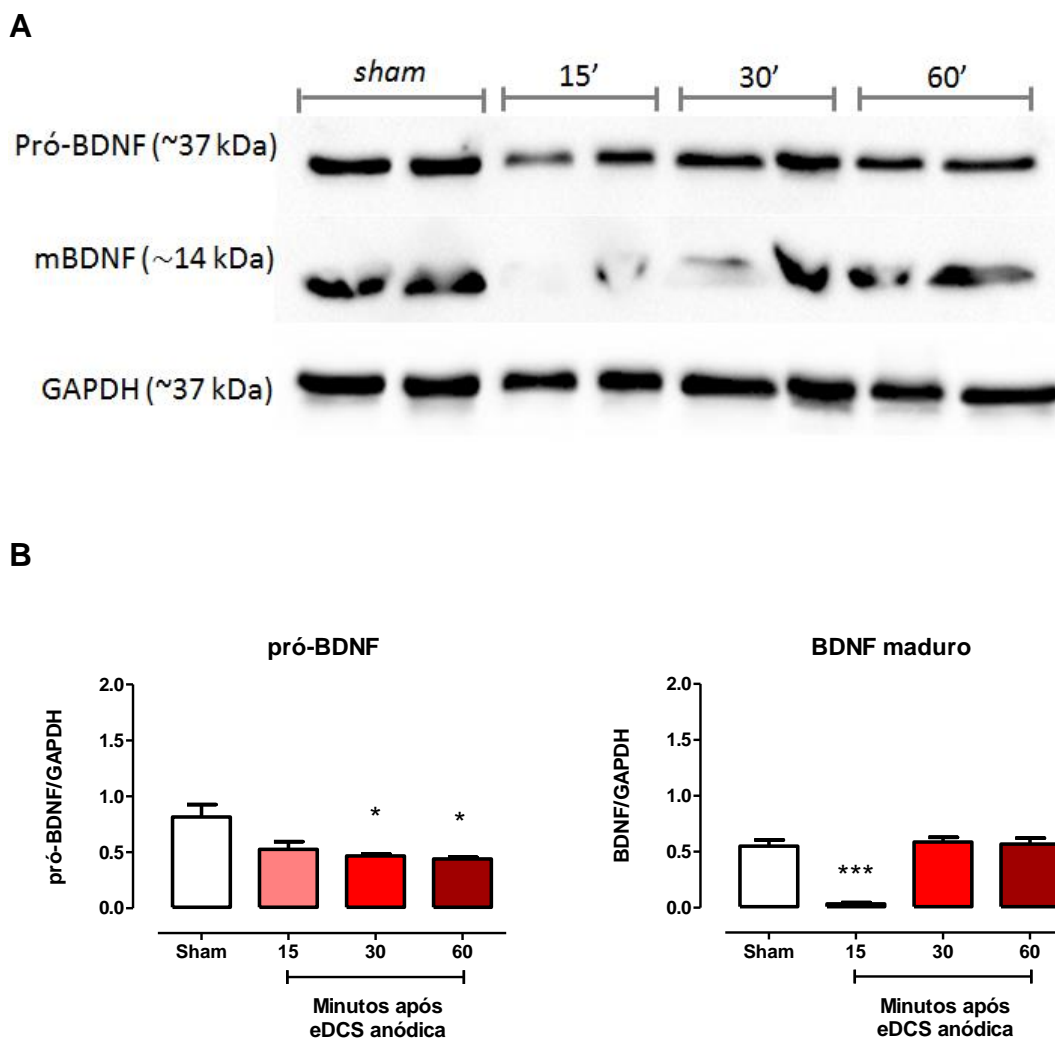
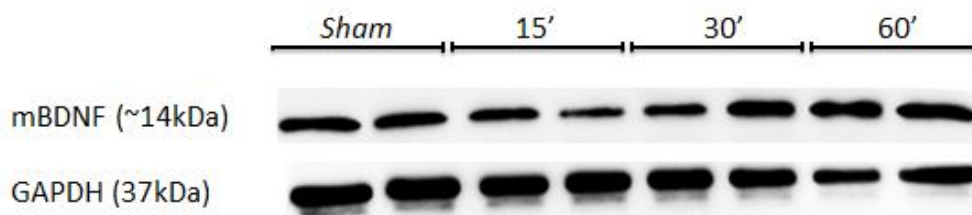


Figura 15 – Níveis de pró-BDNF e BDNF maduro no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos submetidos a eDCS anódica aguda. (A) *Western Blot* de ratos submetidos ao procedimento controle (*Sham*, $n = 4$) e nos tempos de 15 ($n = 4$), 30 ($n = 4$) e 60 ($n = 4$) minutos após uma única aplicação da Estimulação Epidural por Corrente Contínua anódica (eDCS de *epidural Direct Current Stimulation*, 400 μ A). (B) Análise densitométrica para ambas as bandas, mostrou uma mudança nos níveis das duas isoformas do BDNF (pró-BDNF e BDNF maduro) no CPF dos animais que receberam eDCS anódica representados por média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ comparado ao grupo *Sham*; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo *Sham* e aos tempos de 30 e 60 minutos (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

4.2. Efeitos da eDCS catódica aguda sobre a intensidade de BDNF no CPF de ratos

A



B

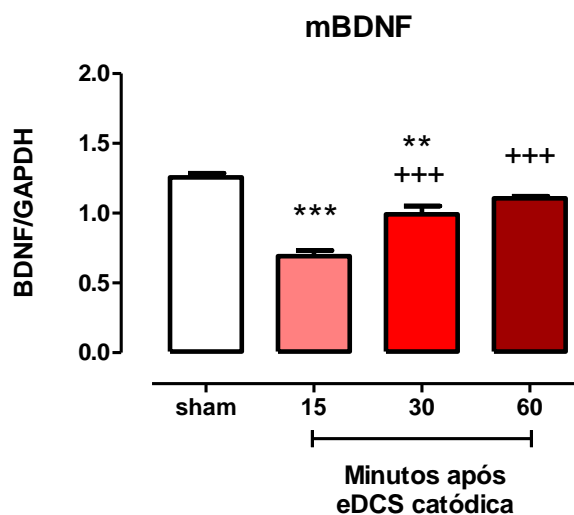


Figura 16 – Níveis de pró-BDNF e BDNF maduro pós-eDCS catódica aguda no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos. (A) *Western Blot* de ratos submetidos ao procedimento controle (*Sham*, $n = 4$) e nos tempos de 15 ($n = 4$), 30 ($n = 4$) e 60 ($n = 4$) minutos após uma **única aplicação** da **Estimulação Epidural por Corrente Contínua catódica** (eDCS de *epidural Direct Current Stimulation*, 400 μ A). (B) Análise densitométrica do BDNF (BDNF maduro) no CPF dos animais que receberam **eDCS catódica aguda** representados por média e erro padrão da média. *** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo *Sham*; +++ $p < 0,0001$ quando comparado ao tempo de 15 minutos (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

A figura 16 mostra os resultados da análise da intensidade do BDNF, nos animais submetidos a uma única sessão de **eDCS catódica**, a ANOVA de uma via mostra diferenças significantes entre os grupos para as proporções de **BDNF maduro** [$F(3,15) = 37,22$; $p < 0,0001$].

Foi observado uma **menor intensidade** dos níveis do **BDNF maduro** ($p < 0,0001$) nas amostras correspondentes aos animais eutanasiados **15 minutos pós-eDCS catódica** em relação ao grupo *sham*.

30 e 60 minutos após a **eDCS catódica**, os níveis dessa isoforma foram significativamente ($p < 0,0001$) maiores se comparado aos 15 minutos iniciais pós-estimulação, mas ainda significativamente menores ($p < 0,001$) aos 30 minutos quando comparado ao grupo *sham*.

Apesar de ambas as polaridades de estimulação (anódica e catódica) interferirem na transformação do pró-BDNF em BDNF maduro, os resultados sugerem que nos animais submetidos a *eDCS* catódica, este efeito é persistente de forma significativa por pelo menos 30 minutos, e esta redução permanece mesmo após 1 hora decorridos do término da estimulação.

4.3. Efeitos da *eDCS* anódica e catódica repetitiva (5 sessões) sobre a expressão de BDNF no CPF de ratos

O principal motivador da nossa busca por uma substância neuromoduladora, que pudesse estar envolvida nos efeitos da *eDCS*, foram nossos resultados anteriores (Custodio *et. al.* 2013), que mostraram uma facilitação da memória operacional dos animais submetidos a *eDCS* repetitiva, mesmo após longos intervalos de retardo (1, 4 e 10 horas), nos levando em direção a possíveis alterações mais duradouras ocasionadas pela *eDCS* sobre os neurônios, além dos efeitos eletrofisiológicos.

Para avaliarmos o possível envolvimento do BDNF neste processo, investigamos os efeitos da *eDCS* anódica ou catódica, aplicada de forma repetitiva, ao longo de 5 dias, acima do CPFm esquerdo, sobre os níveis de BDNF nos animais no CPFm (Figura17).

Em relação aos animais que receberam a *eDCS* anódica ou catódica na intensidade de 400 μ A sobre o CPFm durante 5 dias consecutivos, observamos uma tendência a um aumento nos níveis de BDNF total nos animais submetidos a *eDCS* anódica em relação ao grupo *sham* e ao grupo catódico.

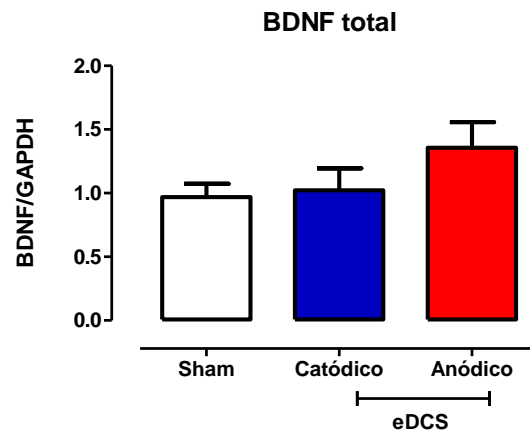


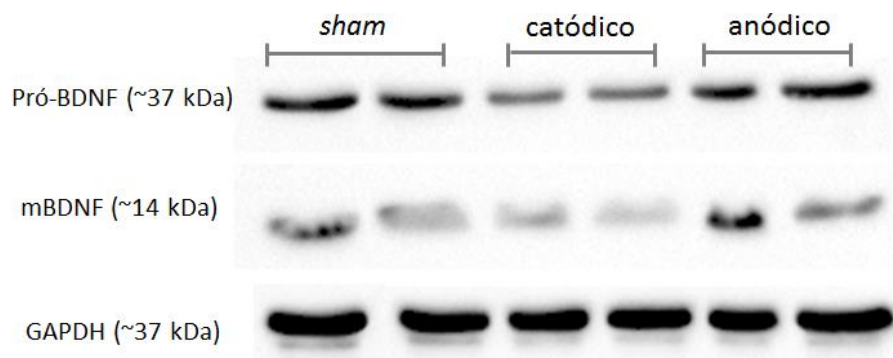
Figura 17 – Análise dos níveis de BDNF total após *eDCS* (*Epidural Direct Current Stimulation*, 400 μ A) repetitiva catódica ou anódica, no Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos. Os animais foram submetidos ao procedimento controle (*Sham*, $n = 4$), catódico ($n = 4$) ou anódico ($n = 4$) durante 5 dias consecutivos. Os resultados representados pela média e erro padrão da média foram retirados da figura 18 B.

4.3.1. Efeitos da **eDCS** anódica e catódica repetitiva (5 sessões) sobre a expressão de pró-BDNF e BDNF maduro no CPF de ratos

Em relação as análises específicas dos níveis de **pró-BDNF e BDNF maduro** nos grupos *Sham*, *eDCS* anódico, e *eDCS* catódico, também foi observado um **aumento** dos níveis destas neurotrofinas no grupo recebendo a **eDCS anódica repetitiva** (Figura 18), havendo uma diferença estatisticamente significativa para o pró-BDNF [$F(2,11) = 17.77$, $p = 0.0007$], estando aumentado no grupo anódico quando comparado a ambos os grupos *Sham* ($p < 0,01$) e catódico ($p < 0,001$) pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Esta tendência de aumento se manteve em relação aos níveis de BDNF maduro nos animais que receberam a *eDCS* anódica quando comparados aos demais grupos, embora de forma não estatisticamente significativa.

Em relação aos efeitos da **eDCS catódica repetitiva** sobre os níveis de Pró-BDNF e BDNF maduro, nossos resultados mostraram que houve uma tendência a uma **redução** quando comparado ao grupo *sham* e **uma redução significativa quando comparado ao grupo anódico**, especialmente para o pró-BDNF, mas também para o BDNF maduro.

A



B

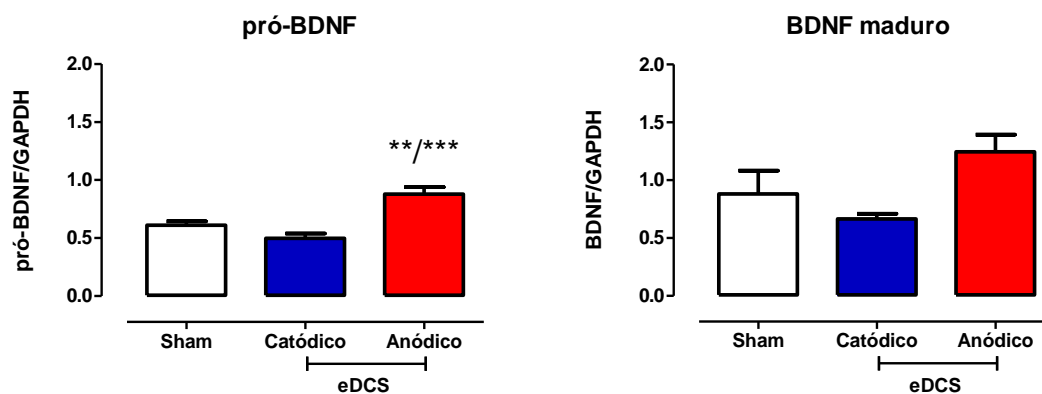


Figura18 – (A) *Western Blot* de ratos submetidos ao procedimento controle (*Sham*, $n = 4$, catódico ($n=4$), ou anódico ($n=4$) após 5 sessões de Estimulação Epidural por Corrente (*eDCS* de *epidural Direct Current Stimulation*, $400 \mu\text{A}$). (B) Análise densitométrica do Pró-BDNF e do BDNF maduro no CPF dos animais que receberam *eDCS* repetitiva representados por média e erro padrão da média. ** $p < 0,01$ se comparado ao grupo sham e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo catódico (Teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

5.DISSCUSSÃO

O estudo da expressão das neurotrofinas em neurônios tem dado importância especial ao BDNF devido à sua capacidade de modulação da plasticidade sináptica (Bekinschtein *et al.* 2008; Bramham e Messaoudi, 2005; Cunha, 2010; Kandel, 2001; Lu *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2012).

Assim, considerando-se que mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica – como, por exemplo, a LTP - podem levar a alterações estruturais na sinapse em uma via específica através de uma série de eventos bioquímicos que podem resultar em síntese proteica e alteração na morfologia dos neurônios, e uma vez que o BDNF está diretamente envolvido em alterações das estruturas sinápticas e na densidade das espículas dendríticas (Lu *et al.*, 2005), e é considerado molécula essencial no mecanismo de formação da LTP (Yoon *et al.*, 2012), este estudo teve como objetivo buscar novas informações sobre os efeitos da estimulação por corrente contínua sobre o níveis de BDNF no CPF de ratos.

Desta forma, buscando compreender os mecanismos pelos quais esta neurotrofina poderia estar envolvida nos efeitos observados em resposta a estimulação cerebral, ratos foram submetidos à estimulação epidural por corrente contínua (*eDCS*) catódica ou anódica, de forma aguda ou repetitiva, de acordo com metodologia previamente descrita (Custodio *et al.*, 2013).

Assim, demonstramos que a aplicação da *eDCS*, sobre o CPFm alterou a intensidade do BDNF na região estudada.

Mais especificamente, em relação a *eDCS* anódica, observamos que uma única sessão - aplicação aguda - de *eDCS*, ocasionou uma redução do BDNF, a qual foi observada nos primeiros 15 minutos após a estimulação. Este dado

pode sugerir que o efeito da corrente anódica sobre a expressão desta neurotrofina ocorre imediatamente após a aplicação da mesma, pois os níveis totais de BDNF (que corresponde ao pró-BDNF mais a sua forma madura), retornam ao nível do controle após este tempo, e mantem-se similar ao grupo controle até pelo menos 60 minutos após cessada a sessão.

Quando a intensidade das formas pró e madura do BDNF foram avaliadas separadamente, e os resultados mostraram que o nível do pró-BDNF, foi menor em relação aos animais *sham*, em todos os períodos de tempo avaliados, este efeito persistiu após 30 e 60 minutos do término da estimulação anódica, o que demonstra que a corrente anódica aguda pode afetar as vias envolvidas na transformação do pró-BDNF em sua forma madura. Esta premissa foi confirmada quando observamos a intensidade das bandas correspondentes ao BDNF maduro, onde detectamos uma menor intensidade 15 minutos pós-*eDCS* anódica ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo *sham*, e aos grupos analisados 30 e 60 minutos pós-estimulação. Sendo que a análise estatística mostrou que esses dois últimos grupos (30 e 60 minutos) apresentam níveis similares ($p < 0,001$) aos encontradas no grupo *sham* e significativamente maiores quando comparados ao grupo analisado 15 minutos pós-*eDCS* anódica (Figura 15 B).

Estes resultados sugerem que a estimulação anódica aguda, de alguma forma, interfere na transformação do pró-BDNF em BDNF maduro.

Em relação a *eDCS* catódica, de forma semelhante a anódica, também observou-se uma redução do BDNF maduro no CPF dos animais nos primeiros 15 minutos - fase inicial - porém diferente do grupo anódico, índices menores

foram detectados até pelo menos 60 minutos pós-*eDCS*. Ainda, este padrão de redução foi mantido em relação aos níveis de BDNF maduro nos animais submetidos ao protocolo repetitivo, mostrando que a *eDCS* catódica reduz os níveis de BDNF maduro nos animais, e que esta redução permanece presente nos ratos submetidos a 5 sessões de estimulação.

Os processos moleculares envolvidos na síntese do BDNF se iniciam a partir da liberação do Glutamato pelo neurônio pré-sináptico, e sua ligação no receptor pós-sináptico NMDA, promovendo o influxo intracelular de cálcio (Ca^{2+}), que por sua vez, ativa proteínas cinases que participam de uma complexa via de sinalização intracelular (Lochner *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2010). (Figura 19).

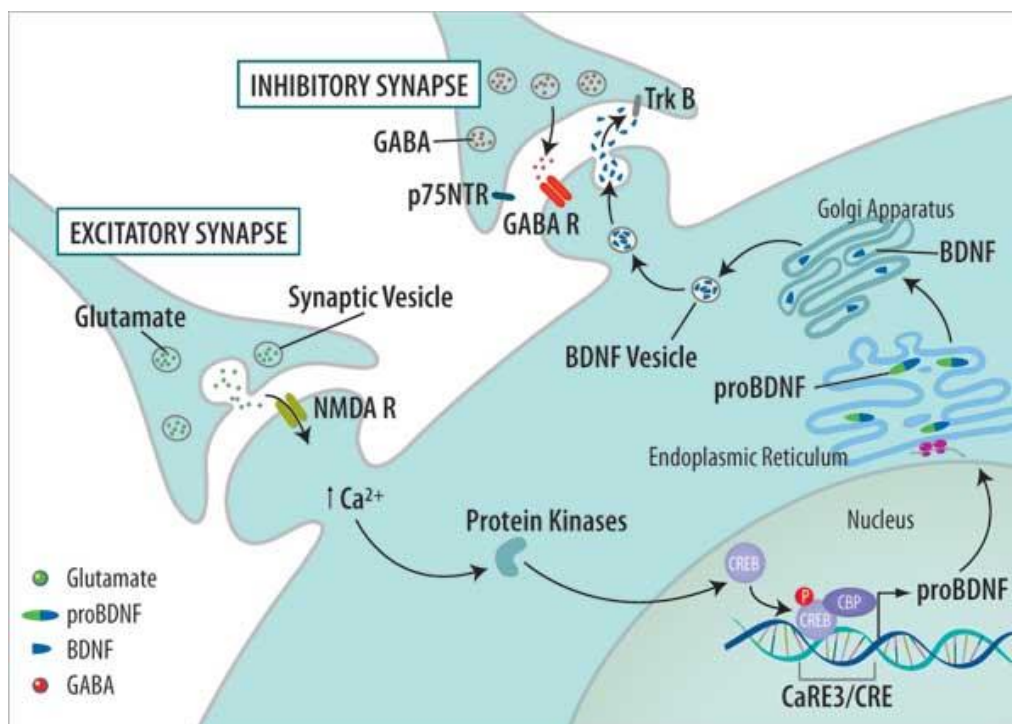


Figura 19: **Ativação da transcrição de BDNF a partir da ativação do receptor NMDA.** A ativação do receptor NMDA leva a um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, e ativação de proteínas cinases que levam a fosforilação do CREB, e consequentemente, a ativação da transcrição do BDNF RNAm no núcleo.

A transcrição do gene BDNF é regulada principalmente pela proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) (Chalovich *et.al.*, 2006). Este fator de transcrição precisa ser fosforilado a pCREB para ser translocado ao núcleo para ativar a transcrição dos genes regulados por ele, dentre os quais os do BDNF (Finkbeiner, 2000), e os da tradução da molécula protéica precursora denominada pré-pró-BDNF, que é clivada gerando o pró-BDNF 32 kDa (Cunha *et al.*,2010). O pró-BDNF, por sua vez, é empacotado em vesículas secretórias no complexo de Golgi. As vesículas podem ser agrupadas para liberação espontânea ou, mais frequentemente, liberadas frente a um estímulo (Chen *et al*, 2006).

O pró-BDNF pode ser clivado no meio intracelular pelas proteases pSubtilizin/Kexin-isozyme 1 (SKI-1), furina ou proconvertases (Noble *et al.*, 2011), sendo então secretado como BDNF maduro, como também ser secretado como pró-BDNF. O pró-BDNF pode também ser clivado por proteases extracelulares (Lessmann *et.al.*2003) Ver Figura 20.

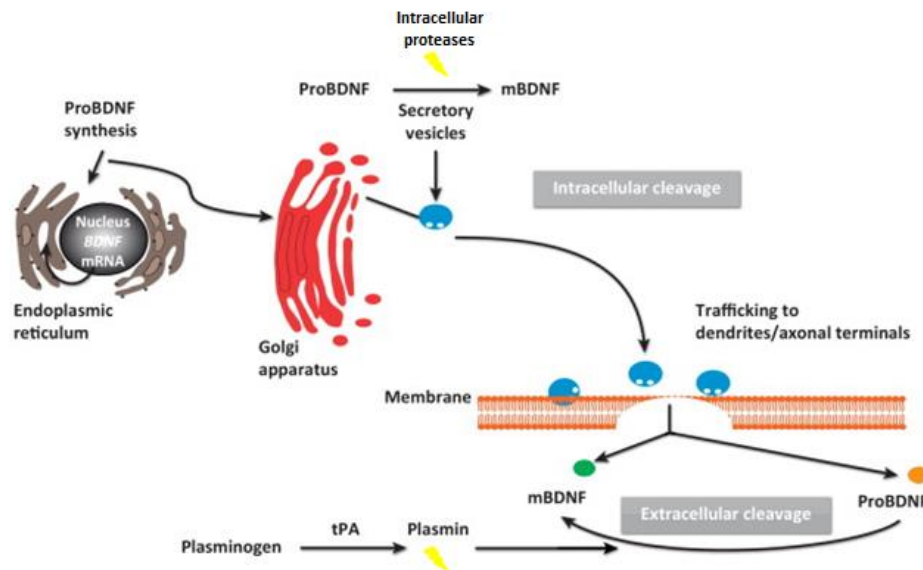


Figura 20 - Síntese e processamento do pro BDNF e mBDNF no neurônio. O gene BDNF é transcrito para BDNF mRNA, que é então traduzido para pró-BDNF, que é secretado, ou clivado para produzir BDNF maduro (mBDNF). O mBDNF ativa o receptor TrkB para promover a plasticidade e o pró-BDNF interage com o receptor p75 e induz efeitos pró-apoptóticos (Modificada de Marosi e Mattson, 2014).

A principal protease extracelular é a plasmina, que é expressa na forma de um zimogênio inativo, o plasminogênio (Cunha *et al.*, 2010; Noble *et al.*, 2011). A ativação do plasminogênio envolve outra protease, o ativador do plasminogênio tissular (tPA) e a proteína anexina II tetrâmero (Allt). A proteína Allt interage com ambos, plasminogênio e tPA, na superfície extracelular potencializando a geração de plasmina ativa (Kim e Hajjar, 2002).

A plasmina, por sua vez, cliva o pró-BDNF gerando BDNF maduro (Pang *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005). Tanto o tPA quanto o plasminogênio são vastamente expressos no sistema nervoso, em regiões como hipocampo, córtex, amígdala e hipotálamo (Melchor e Strickland, 2005). O plasminogênio é exclusivamente

expresso por neurônios e secretado na fenda sináptica e o tPA é secretado por neurônios, de maneira dependente de atividade, e também pela glia (Lu *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos associam o aumento da expressão do BDNF maduro ao aumento e ativação da tPA (Pang *et al.*, 2004; Lochner *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2010), e aproximadamente 80% das vesículas que estão sofrendo exocitose e liberando o pró-BDNF também contém a tPA e o plasminogênio (Lochner *et al.*, 2008).

Outros evidenciaram que estímulos externos que promovem aumento da atividade neuronal também regulam a transcrição e expressão da tPA (Melchor e Strickland, 2005; Obiang *et al.*, 2012). Podda e colaboradores (2016) mostraram que a conversão do pró-BDNF em BDNF maduro pela ativação da plasmina, é crítica para a expressão de LTP em hipocampo de ratos, e que tal conversão é mediada pela tPA.

Estudos anteriores já mostraram um aumento da intensidade de ambos (BDNF maduro e da tPA) após estimulação elétrica em culturas de neurônios hipocámpais, (Nagappan *et al.*, 2009).

Ainda, uma vez que esta clivagem do pró-BDNF em BDNF maduro pela plasmina ocorre extracelularmente, uma hipótese para a redução temporal nos níveis de pró-BDNF observadas no presente estudo após a *eDCS* anódica aguda se deva a ativação da tPA, levando conseqüentemente a uma maior conversão do pró BDNF em BDNF maduro nos tempos de 30 e 60 minutos.

Um padrão oposto ao da estimulação aguda, ou seja, um maior nível do BDNF total e das isoformas – pró-BDNF e BDNF maduro - foi observado 24 horas após o final das sessões repetitivas de estimulação anódica realizadas durante 5 dias consecutivos.

Entretanto, estes resultados de níveis aumentados de BDNF nos animais que receberam a *eDCS* anódica repetitiva são condizentes com as propriedades neuromodulatórias da neurotrofina, uma vez que a mesma é capaz de induzir modificações estruturais na sinapse, que poderiam estar relacionadas aos efeitos facilitatórios da estimulação cerebral anódica observadas em animais desempenhando tarefas com longos intervalos de retardo (Custodio *et al.*, 2013).

Bekinschtein e colaboradores demonstraram, em ratos, que, 12 horas após uma tarefa de aprendizado associativo, há uma fase ligada a síntese proteica dependente da presença do BDNF no hipocampo, que é crítica para a persistência da memória. Esses achados sugerem que uma fase de estabilização tardia é especificamente necessária para a manutenção, mas não para a aquisição da memória. Os autores propõem que a formação e a persistência da memória têm alguns mecanismos moleculares em comum, mas que etapas recorrentes posteriores, similares à etapa de aquisição/consolidação, ocorrem no hipocampo para a manutenção da memória adquirida (Bekinschtein *et al.* 2008).

Embora a maioria dos trabalhos tenha como alvo o hipocampo, o armazenamento temporário de informações, a memória operacional, e a plasticidade sináptica do tipo LTP também estão subjacentes ao córtex cerebral

(Squire e Kandel, 2009), e são dependentes de modificações relacionadas a eficácia dos receptores NMDA (Liebetanz *et al.*, 2002) bem como da síntese de proteínas, acompanhada por modificações nos níveis intracelulares de AMPc e Ca^{2+} (Nitsche *et al.*, 2008).

Estas respostas podem ser desencadeadas nos neurônios pela ligação do BDNF maduro ao receptor TrkB, reforçando a nossa hipótese de que a facilitação da memória operacional observada nos animais recebendo a *eDCS* anódica repetitiva em nosso estudo anterior, se deveu a modificações prolongadas nos neurônios e/ou nas sinapses - uma vez que não encontramos diferenças significativas no desempenho dos animais no período imediatamente posterior a estimulação, i.e., no pré-retardo (ver Fig. 4 da introdução), mas observamos uma facilitação significativa do desempenho após horas decorridas da aplicação da *eDCS* ao longo das sessões de teste - e que essas modificações podem estar relacionadas a alterações nos níveis de BDNF demonstradas no presente estudo.

Em um estudo recente também realizado em nosso laboratório, Martins (2016), ao investigar o envolvimento de receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico), nos efeitos da estimulação epidural anódica repetitiva (5 sessões) sobre o CPFm, observou que os animais que receberam as sessões de *eDCS* anódica (VEH/*eDCS*) apresentaram um desempenho significativamente melhor comparado aos animais que receberam *sham* (VEH/*sham*) (Figura 21), não apresentando alterações significativas no pré-retardo, ou seja, no desempenho imediatamente após a aplicação da *eDCS*.

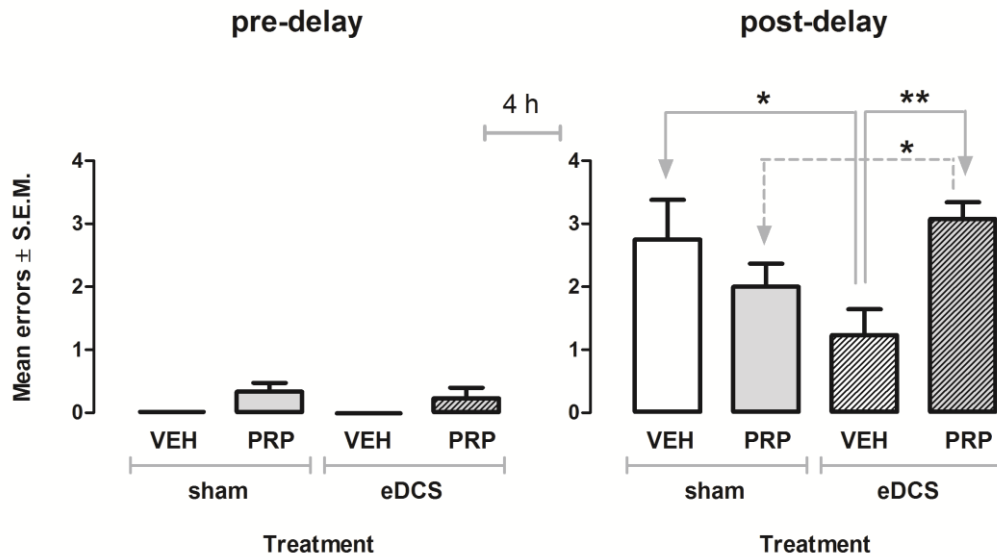


Figura 21 - Efeitos do perampanel (PRP), um antagonista seletivo para receptores AMPA, após *eDCS* (400 μ A por 13 minutos) repetitiva (uma vez ao dia por cinco dias consecutivos) sobre o CPFm (PRP/*eDCS*, $n = 13$) ou após procedimento *sham* (PRP/*sham*, $n = 12$) comparado ao veículo (VEH) após *eDCS* (VEH/*eDCS*, $n = 13$) ou após *sham* (VEH/*sham*, $n = 12$) sobre o desempenho de tarefa com retardo de 4 h (média \pm e.p.m.) no labirinto radial. * $p \leq 0,05$ comparado ao VEH/*sham* (para o VEH/*eDCS*) ou PRP/*sham* (para o PRP/*eDCS*), ** $p = 0,001$ comparado ao VEH/*eDCS* (para o PRP/*eDCS*) (Martins, 2016).

Esses dados, juntamente com as observações obtidas no presente estudo, nos leva novamente a hipótese de que os efeitos de facilitação da memória operacional observados pós-*eDCS* anódica podem estar relacionados a modulação da síntese e secreção de BDNF pela corrente elétrica, uma vez que observamos níveis aumentados dessa neurotrofina nos animais submetidos a *eDCS* anódica repetitiva no presente estudo.

5.1. Sinalização mediada pelo BDNF

Como já descrito, o pró-BDNF liga-se ao p75NTR, e juntamente com o co-receptor sortilina, favorece uma via pró-apoptótica (Teng *et al.*, 2005), enquanto a ligação do BDNF maduro com o receptor TrkB é responsável pelo controle do desenvolvimento e a manutenção dos seus alvos-celulares, refletindo uma sinalização anti-apoptótica (Reichardt, 2006) (Figura 22).

Porém os dados da literatura sobre funções específicas das isoformas do BDNF são conflitantes. Matsumoto *et al.* em 2008, propuseram ao estudarem a detecção do pró-BDNF e BDNF maduro no hipocampo de camundongo que, o pró-BDNF seria um intermediário transitório, o qual seria rapidamente convertido a BDNF maduro (Matsumoto *et al.*, 2008). Já Yang e colaboradores (2009), utilizando a quantificação do BDNF em neurônios também de camundongos, sugeriram que o pró-BDNF não é apenas um intermediário na rota biossintética, e que a eficiência na clivagem do pró-BDNF é regulada ao longo do desenvolvimento.

Já está bem estabelecido o papel do BDNF como principal regulador da transmissão sináptica e plasticidade em várias regiões do SNC. A versatilidade do BDNF na sua forma madura é enfatizada por sua contribuição a uma faixa de respostas adaptativas neurais, incluindo LTP, certas formas de plasticidade de curto e longo prazo, bem como na regulação homeostática da excitabilidade intrínseca neural (Kovalchuk *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2004). Já, o oposto ocorre

com o pró-BDNF, que quando administrado exogenamente, induziu a apoptose em neurônios da periferia (Teng *et al.*, 2005), e facilitou a LTD no hipocampo (Woo, *et al.*, 2005).

Estudos mostraram que a estimulação neural de baixa frequência induz principalmente, a secreção do pró-BDNF, e a de alta frequência aumenta o BDNF maduro extracelular em neurônios hipocampais (Negappan, *et al.*, 2009).

Com relação ao LTP, sabe-se que a indução da LTP no hipocampo somente se realiza quando um estímulo repetitivo de alta frequência, ativa simultaneamente o neurônio pré e pós-sináptico, envolvidos em uma via de transmissão, uma vez que esse tipo de estímulo é necessário para a ativação de receptores NMDA no neurônio pós-sináptico (Malenka 1994).

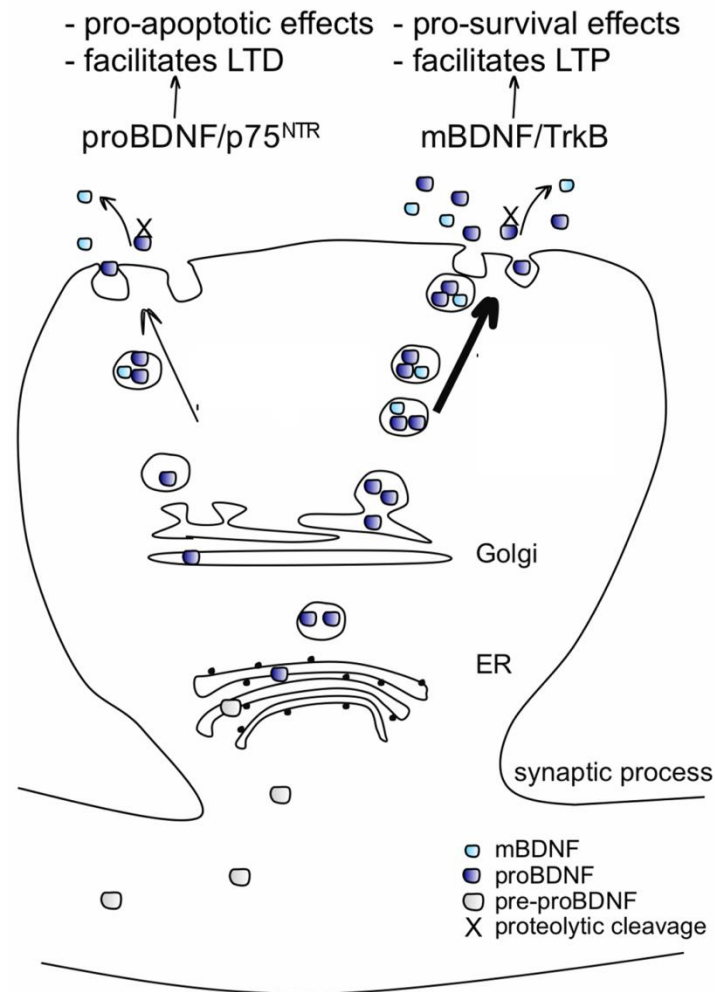


Figura22: O pró-BDNF e o mBDNF são direcionados para rotas celulares diferentes, através da interação a receptores distintos. O pró-BDNF liga-se ao p75NTR, e juntamente com o co-receptor sortilina, favorece a LTD e uma rota pró-apoptótica. A ligação do mBDNF com o receptor *TrkB* é responsável pelo controle do desenvolvimento e manutenção dos neurônios e está envolvido na LTP. (Modificado de Cunha, 2010)

Ainda no hipocampo, o que define se uma via sináptica produzirá LTP ou LTD é justamente a frequência do estímulo, e o aumento correspondente da concentração de Ca^{+2} . Em concentrações baixas, haverá LTD (Linden e Connor, 1995; Lisman, 1989), em concentrações altas, LTP (Robert; Feldman e Meyer, 1997; Bliss e Collingridge 1993, Malenka, 1994).

Quando consideramos os dados acima, podemos sugerir a hipótese de que estímulos de alta frequência, através da ativação de receptores NMDA levariam a uma maior proporção de BDNF maduro nos neurônios, levando a síntese proteica local e a um fortalecimento estrutural da sinapse, fenômeno relacionado ao mecanismo de LTP, e que pode estar relacionado aos resultados observados em nosso presente estudo, bem como os dados obtidos em nosso estudo anterior (Custodio, 2013).

Apesar de expressivo o número de estudos buscando a compreensão das funções e da relação entre estas isoformas, os mecanismos envolvidos no balanço dessa regulação pró-BDNF vs BDNF maduro, ainda não estão totalmente esclarecidos, considerando-se que a relação entre as ligações BDNF-TrkB e pró-BDNF-p75 seja crucial para as modificações das estruturas sinápticas e densidade das espículas dendríticas (Lu *et al*, 2005).

Em relação a sinalização promovida pelo BDNF maduro, o processo começa com sua interação com receptores tirosina cinase tipo B (TrkB), que ativa a sua cinase intrínseca que se auto-fosforila e fosforila proteínas-alvo específicas (Patapoutian e Reichardt, 2001), formando-se grandes complexos proteicos que ativam várias vias de sinalização intracelulares.

Apesar de serem eventos comuns a vários receptores tirosina cinase, a combinação única de proteínas adaptadoras, de enzimas ativadas e da própria regulação do tráfego do receptor TrkB, resulta em respostas específicas. Como referido, após a ativação e fosforilação dos receptores TrkB ocorre a ativação

de diversas cascatas de sinalização em poucos minutos, envolvendo as vias: **PLC γ** , **PI3K/Akt** e a **MAPK**. Essas vias são mostradas nas figuras 23 e 24.

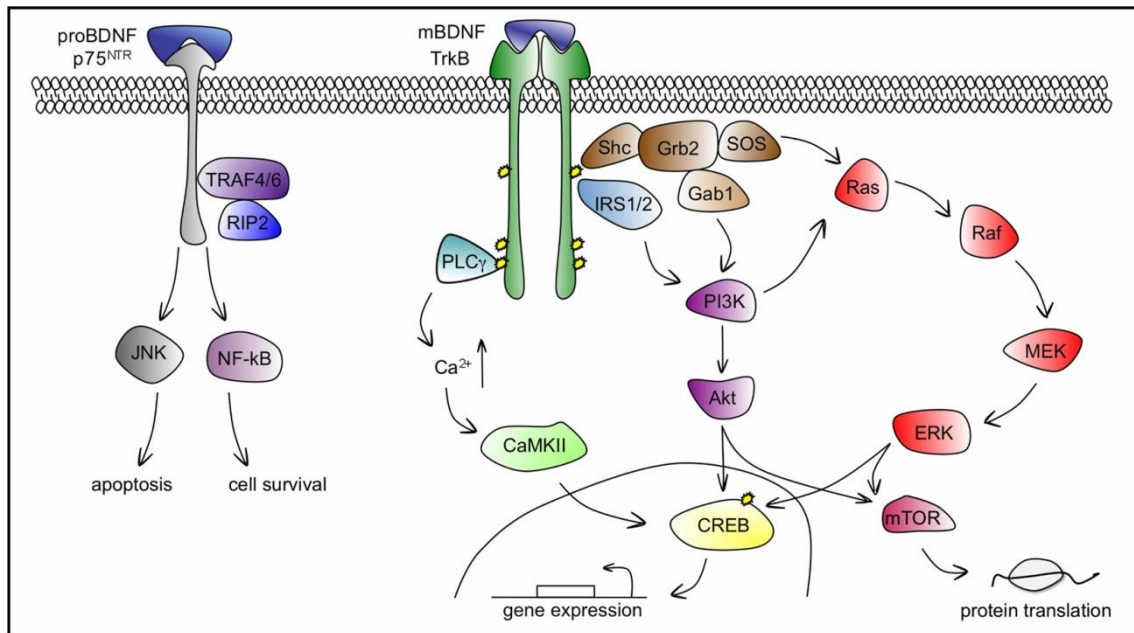


Figura 23: Vias de sinalização do pro BDNF e mBDNF no neurônio pré ou pós sináptico.

O BDNF liga-se ao receptor TrkB e induz sua dimerização e autofosforilação em resíduos de tirosina no domínio da cinase, criando sítios de ligação intracelular que servem como locais de ancoragem para moléculas efetoras e desencadeiam a ativação de três vias de sinalização principais: cascatas PLCγ, PI3K e ERK, que levam a fosforilação e ativação do fator de transcrição CREB que medeia a transcrição de genes essenciais para a sobrevivência e diferenciação de neurônios. O recrutamento de PLCγ aumenta os níveis intracelulares de Ca²⁺ e conduz à ativação de CaMKII para fosforilar CREB. O PI3K pode ser ativado através do complexo Shc / Grb2 / SOS através de Gab1 e por IRS1 / 2. Os produtos lipídicos gerados pela PI3K ativada, os fosfatidilinosídeos, ligam e ativam a proteína quinase Akt. A cascata ERK pode ser ativada tanto pelo complexo Shc / Grb2 / SOS quanto pela PI3K. A fosforilação de ERK leva diretamente a fosforilação do CREB. Ambos Akt e ERK ativam mTOR, responsável pela iniciação da tradução de proteínas. O pró-BDNF liga-se ao receptor p75^{NTR}, conduzindo à apoptose através da cascata JNK ou sobrevivência celular através da cascata NF-κB (PLCγ, fosfolipase Cγ; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; ERK, extracelular signal-regulated kinase; CaMKII, calcium-calmodulin dependent kinase; Shc, src homology domain containing; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; SOS, son of sevenless; Gab1, Grb-associated binder 1; IRS1/2, insulin receptor substrates 1/2; CREB, cAMP-calcium response element binding protein; Ras, GTP binding protein; Raf, Ras associated factor; MEK, MAP/Erk kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; TRAF4/6, tumour necrosis factor receptor associated factor 4/6; RIP2, receptor interacting protein 2; JNK, c-Jun N-terminal kinase; NF-κB, nuclear factor κ B) Modificada de Cunha *et al*, 2010.

A ativação dessas proteínas-alvo pode levar a uma variedade de sinalizações intracelulares, tais como ativação das cascatas dependentes de *Ras*-MAP quinase (MAPK), AMPc, CaMK II (cinase dependente de cálcio-calmodulina II), e o CREB (Barbacid, 1994; Patapoutian e Reichardt, 2001)

1) A via PLC γ

A ativação da via da PLC γ - leva à liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático (RE) e ativação da CaMKII, resultando na ativação do fator de transcrição (CREB) ativando deste modo a transcrição do BDNF. Esta via de sinalização tem sido implicada nos efeitos mediados pelo BDNF tanto na plasticidade sináptica como na transmissão sináptica (Choi *et. al.*, 2009, Cunha 2010).

2) via PI3K/Akt;

O BDNF pode também ativar a PI3K. Esta via é crucial para a promoção de sobrevivência em várias populações neuronais (Crowder *et al.*, 1998).

A ativação da PI3K e leva a fosforilação da proteína cinase B (Akt) , que controla diversas proteínas importantes na modulação da sobrevivência celular, e também do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Figura 22), que regula o início da tradução através da modulação da atividade do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E, ou 4E), entre outros substratos (Jaworski *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005).

De fato, administração local de BDNF aos dendritos de neurônios hipocâmpais *in vitro* resulta na fosforilação dependente de mTOR da proteína ribossomal S6,

que está envolvida na síntese de proteica local (Takei *et al.*, 2004), e estudos explorando o envolvimento do mTOR em alterações estruturais dos neurônios como a LTP demonstraram que a rapamicina, um antagonista de mTOR, bloqueia a LTP e que as proteínas envolvidas no alongamento dendrítico dependentes de mTOR estão perto de locais pós-sinápticos.

A proteína Akt também pode suprimir a ativação da cascata de sinalização JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), uma via com especial relevância na indução da apoptose neuronal, e que pode ser ativada pelo pró-BDNF (Kim *et al.*, 2001).

3) A via MAPK

A fosforilação das MAPK resulta na ativação de várias proteínas mediadoras e de fatores de transcrição, como o CREB. Este fator controla e regula a transcrição de diversos genes envolvidos na promoção da sobrevivência, crescimento axonal e diferenciação neuronal (Finkbeiner *et al.*, 1997; Lonze *et al.*, 2002). Deste modo a via *Ras*/MAPK, controla uma diversidade de funções tais como proliferação, diferenciação e crescimento celular (Grewal *et al.*, 1999)

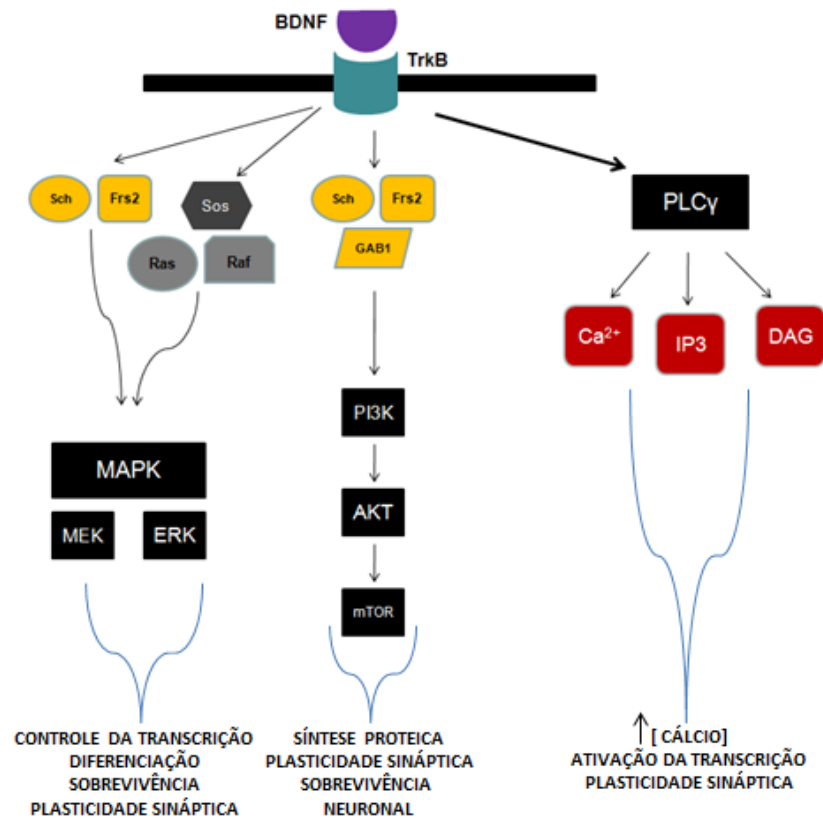


Figura 24: Envolvimento das diferentes vias de sinalização mBDNF/TrkB nos efeitos de plasticidade, manutenção e sobrevivência neuronal. A ativação da PLC- leva à liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático (RE) e ativação da cinase dependente de cálcio-calmodulina II (CamKII), resultando na fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB) e ativação da transcrição. O BDNF pode também ativar a PI3K que, por sua vez, fosforila a proteína cinase B (Akt) e o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) para regular o início da tradução através da modulação da atividade do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E, ou 4E), entre outros substratos. A ativação da via da ERK/MAPK pode tanto regular a transcrição, pela fosforilação de CREB e da proteína do tipo E-26 1 (Elk-1), quanto a transcrição, por fosforilar eIF4E. A transcrição dependente de CREB pode envolver a síntese de mRNA de genes de expressão imediata como o c-fos ou o zif268 (Modificado de Bekinschtein *et al.*, 2008).

A ativação diferencial e o papel dessas cascatas na sobrevivência neuronal irão depender do tipo de célula e o envolvimento de estímulos fisiológicos ou patológicos específicos (Zagrebelsky e Korte, 2013).

Considerando as várias vias de sinalização envolvidas nos efeitos fisiológicos do BDNF, são necessários estudos focalizando etapas específicas dessas vias para uma melhor compreensão sobre os efeitos das correntes elétricas na modulação do BDNF observada em nosso estudo.

5.2. A sinalização BDNF maduro/TrkB e os processos de aprendizagem e memória

O BDNF é considerado molécula essencial no mecanismo de formação da LTP, que é um dos mecanismos eletrofisiológicos mais estudados na formação de memórias. Este fenômeno corrobora a hipótese que o aprendizado envolve plasticidade sináptica e é definido como um aumento prolongado da magnitude da resposta sináptica de um neurônio pós-sináptico após uma estimulação curta e de alta frequência de um neurônio pré-sináptico (Lent, 2008).

Uma vez que a LTP é um aumento duradouro na resposta excitatória pós-sináptica, sendo o processo ocasionado após estímulo repetido de mesma intensidade e duração, acredita-se que esse processo de um estímulo na membrana sináptica promove a ativação da adenilato ciclase (AC), que converte o ATP em AMPc, o qual ativa PKA (proteína cinase A). O estímulo

repetido promove a translocação da subunidade catalítica da PKA para o núcleo, que recruta, desta forma, a MAPK.

No núcleo, a PKA e MAPK fosforilam e ativam a AMPc responsivo ao CREB e removem a ação repressiva do CREB-2, um inibidor do CREB-1. O CREB-1, por sua vez, ativa vários alvos, entre eles o BDNF que acaba por ocasionar mudanças estruturais nos neurônios, que resultam no crescimento de novas conexões sinápticas (Bramham e Messaoudi, 2005; Kandel, 2001, Lou *et al*, 2008).

Estudos em camundongos têm ajudado a elucidar a importância do BDNF nos processos de aprendizagem e memória utilizando modelos animais “*knock-out*”. A supressão gênica completa do BDNF (BDNF *-/-*) impede o conceito de progredir o desenvolvimento além da fase embrionária. A depleção do BDNF após o nascimento ocasiona extrema dificuldade de aprendizado e memória. A depleção na vida adulta, por sua vez, ocasiona em diminuição da LTP, sendo que camundongos BDNF +/- são incapazes de se orientarem em labirintos (Linnarson *et al*, 1997), apresentam diminuição de neurogênese e tamanho do hipocampo (Lee *et al*, 2002), assim como uma variedade de alterações neuroquímicas e comportamentais incluindo diminuição de serotonina (5-HT) em associação com agressividade e hiperfagia (Lyons *et al*, 1999).

Korte e. al. 1995 em um estudo com animais *knock-out* para o gene do BDNF, mostraram uma abolição da LTP nesses animais, que foi restaurada após a aplicação de BDNF exógeno (Korte *et al.*, 1995).

O Envolvimento da sinalização BDNF maduro/TrkB na LTP *in vitro* e *in vivo* também foi demonstrado por Minichiello (2009), onde o pesquisador observou

que a atividade neuronal que leva à LTP aumenta fortemente a expressão de BDNF em neurônios hipocâmpais em fatias cerebrais, sugerindo que sinais sinápticos fisiológicos podem induzir a liberação pós-sináptica de BDNF endógeno (Pang e Lu, 2004).

Em um trabalho publicado em 2008, Bramham evidenciou a importância do BDNF na consolidação da LTP tardia (L-LTP), mostrando que esta neurotrofina estimula a síntese e o rápido transporte para os dendritos de moléculas de mRNA do gene *Arc* (proteína associada ao citoesqueleto regulada pela atividade de genes de expressão imediata) (Bramham, 2008).

De fato, sabe-se que além de seus clássicos efeitos relacionados a sobrevivência neuronal, o BDNF também é capaz de promover o crescimento dos axônios e dendritos, onde também é sintetizado em estreita proximidade com as espinhas dendríticas (Tongiorgi, 2008). Esse fortalecimento estrutural da sinapse é essencial para os mecanismos de aprendizado e memória.

A variante do gene BDNF - *Val66Met* - ocorre em 20-30% da população caucasiana, sendo um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) responsável pela substituição do aminoácido Valina, na posição 66 do códon, por uma Metionina, e como citado anteriormente, esse fenômeno resulta em uma resposta diminuída da produção do BDNF (Marsal *et al* 1997; Llinás *et. al.*, 1994), estando associado a prejuízos em memória episódica em voluntários saudáveis (Egan *et al.*, 2003) e piora significativa na performance do Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (WCST) em pacientes *Val/Met* em comparação com pacientes com o genótipo *Val/Val* (Rybakowski *et al.*, 2006). Além disso, um estudo prospectivo demonstrou que pacientes portadores do

alelo *Met* apresentam uma maior redução do lobo temporal em comparação com pacientes *Val/Val* em um período de 4 a 10 anos de seguimento (McIntosh *et al.*, 2007).

A presença do alelo *Met* afeta ainda a anatomia cerebral, implicando em menor volume no hipocampo e no córtex pré-frontal, duas regiões relacionadas especificamente com a expressão de BDNF (Pezawas *et al.*, 2004), o que pode representar um fator de vulnerabilidade para o desenvolvimento de doenças, como o mal de Alzheimer e depressão, ambas relacionadas com a disfunção destas regiões cerebrais (Chen *et al.* 1995).

Em relação ao pró-BDNF ainda são escassos os trabalhos direcionados as suas ações sobre a plasticidade sináptica e sobre a morfogênese dos dendritos. Alguns estudos sobre a ativação do p75NTR pelo pró-BDNF, mostraram que a pró-neurotrofina é importante para LTD dependente do receptor NMDA em neurónios do hipocampo (Rosch *et al.*, 2005, Woo *et al.*, 2005), onde tal fenômeno se mostrou ausente em animais *knock out* para p75NTR (*p75NTR*_/_), sem que a LTP dependente de NMDA ou a LTD independente do receptor fossem alteradas (Rosch *et al.*, 2005, Woo *et al.*, 2005).

Consistente com esses dados, outros estudos indicam que camundongos *p75NTR*_/_ possuem um aumento no número de espinhas dendríticas hipocampais (Koshimizu *et al.*, 2009), e que uma superexpressão do receptor nesses neurônios produz uma redução no número de espinhas dendríticas (Zagrebelsky *et al.*, 2005). Ainda, a aplicação de um pró-BDNF exógeno

resistente à clivagem reduziu o número de espinhas em culturas de neurónios (Koshimizu *et al.*, 2009).

O papel dos vários mecanismos de sinalização na aprendizagem e memória tem sido bem documentado, no entanto, o papel exato que o BDNF desempenha modulando estas vias de sinalização durante a aprendizagem continua a ser elucidado. Assim, o BDNF parece poder ativar múltiplas vias de sinalização que podem agir de forma a regular os efeitos necessários para a plasticidade sináptica e formação da memória. A interação entre cada uma destas vias intracelulares dependes dos níveis de pró-BDNF, BDNF maduro, TrkB e p75NTR (Cunha, 2010).

A ativação dos receptores TrkB e p75 estariam, portanto, ligadas a promoção e supressão, respectivamente, do crescimento dendrítico, promovendo uma potenciação ou depressão sináptica. Esse balanço entre as ligações BDNF-TrkB e pró-BDNF-p75 são importantes para as alterações das estruturas sinápticas e densidade das espículas dendríticas (Lu *et al.*, 2005), e é fundamental para a chamada plasticidade sináptica. Sendo assim, a possível modulação desses fatores juntamente com uma melhor compreensão de seus mecanismos possibilitaria um enorme avanço na neuromodulação terapêutica.

5.3. A Estimulação Cerebral e o BDNF

Muitos protocolos de estimulação cerebral por correntes elétricas desenvolvidos permitem a geração de plasticidade do tipo LTP e LTD em seres humanos (Ziemann *et al.* 2008), sendo que tal fenômeno nem sempre depende

apenas da atividade neuronal pré e pós-sináptica, mas também da presença de neuromoduladores (Malenka e Bear 2004).

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 (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, *Apud* Lugon, 2015).

Em relação aos efeitos já relatados de protocolos de estimulação cerebral e a relação com os níveis de BDNF no SNC, estudos mostram que a LTP promovida pela estimulação direta por corrente contínua foi ausente em camundongos “*knockout*” de BDNF e TrKB (Fritsch, 2010). Paralelamente, estudos já observaram um aumento na arborização dendrídica em ratos tratados com corrente direta, e o BDNF parece estar subjacente aos efeitos observados (Yoon *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2012),.

A atividade neuronal que leva à LTP aumenta fortemente a expressão de BDNF em neurônios hipocámpais em fatias cerebrais, sugerindo que sinais sinápticos fisiológicos podem induzir a liberação pós-sináptica de BDNF endógeno (Pang e Lu, 2004).

Neste trabalho foi observado em aumento do nível de BDNF principalmente nos animais que receberam o tratamento anódico repetitivo.

Portanto, a secreção de BDNF e a ativação do receptor TrKB, parecem ser **mediadores chave potenciais** dos efeitos facilitatórios da estimulação cerebral na plasticidade sináptica.

5.4. Condições patológicas relacionadas a níveis disfuncionais de BDNF no SNC

Doenças associadas a algumas perturbações da sinalização BDNF são diversas: epilepsia (He *et al.*, 2004), distúrbios do humor (Neves-Pereira *et al.*, 2002; Sklar *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2005; Strauss *et al.*, 2005), doenças neurodegenerativas tais como a Doença de Huntington (Zuccato *et al.*, 2001, 2003; Lynch *et al.*, 2007), doença de Alzheimer (Nagahara *et al.*, 2009) e outras doenças do desenvolvimento neurológico incluindo Distúrbios do Espectro Autista (ASD).

Níveis periféricos diminuídos de BDNF foram encontrados em pacientes com depressão e transtornos do humor, e inibidores da recaptção de serotonina e estabilizadores de humor parecem aumentar esses níveis (Frey *et al.* 2006; Duman *et al.* 2008). Uma vez que nem todos os pacientes com depressão respondem bem às medicações antidepressivas disponíveis atualmente; e que apenas cerca de 50% dos indivíduos alcançam remissão total dos sintomas em resposta a estas drogas (Berton e Nestler, 2006; Racagni e Popoli, 2008), uma possibilidade de modulação através de correntes elétricas poderia reduzir a utilização de tais medicamentos no tratamento de pacientes levando a uma melhor resposta ao tratamento.

Uma revisão abordou a relação entre BDNF e respostas comportamentais, neuroquímicas e neuroadaptativas a drogas de abuso, bem como a relação com o sistema dopaminérgico mesolímbico. Estudos comportamentais envolvendo cocaína mostraram que animais heterozigotos

para BDNF apresentaram redução na preferência condicionada de lugar (Hall *et al.*, 2003), bem como redução na sensibilização locomotora (Horger *et al.*, 1999).

Evidências indicam também a participação do BDNF na regulação de comportamentos associados ao etanol. Estudos com camundongos heterozigotos para BDNF mostraram que esses animais apresentam aumento no consumo, na sensibilização comportamental e na preferência condicionada de lugar ao etanol, quando comparados aos animais selvagens (Mcgough *et al.*, 2004)

A redução nos níveis plasmáticos de BDNF foi também verificada em indivíduos dependentes de álcool, bem como nos indivíduos com histórico de alcoolismo familiar, sugerindo novamente que essa neurotrofina possa ter papel no desenvolvimento da dependência ao etanol (Joe *et al.*, 2007).

Em um protocolo realizado em nosso laboratório, observou-se uma melhora significativa do desempenho da função frontal em alcoolistas do tipo IV segundo a tipologia de *Lesch* recebendo *tDCS anódica* repetitiva, quando comparados com pacientes do grupo *sham* (da Silva *et al* 2013). Observaram-se evidências clínicas e eletrofisiológicas de aumento da atividade frontal induzida pela *tDCS* específica para esses indivíduos (Nakamura-Palacios, 2011). Considerando-se que a estimulação anódica repetitiva parece levar a um padrão de aumento na expressão de BDNF, estes resultados podem sugerir que esse aumento local da atividade frontal induzida pela *tDCS* pode estar relacionado a uma maior expressão de BDNF no CPF desses pacientes, promovendo um impacto clínico benéfico.

Em relação a estimulação catódica, nossos resultados mostraram que a estimulação catódica aguda reduziu o BDNF maduro, e que esta redução permanece significativa por pelo menos 30 minutos decorridos do término da estimulação. Ainda, esta tendência a redução se manteve após a estimulação repetitiva, ainda que não estatisticamente significante, comparado ao grupo *sham*, e significante quando comparado ao grupo anódico.

Sabe-se que o SNC precisa trabalhar de forma muito orquestrada para desempenhar suas complexas funções, muitas vezes, podemos imaginar inicialmente, que apenas intervenções que possam estimular a maquinaria neuronal teriam efeitos benéficos no seu funcionamento, porém, algumas disfunções do SNC como a epilepsia, estão relacionadas a descargas neuronais anormais, ou disfunções nos circuitos cerebrais, produzindo uma superexcitação dos neurônios ou o desequilíbrio entre os mecanismos de neurotransmissão inibitórios e excitatórios (Zouhar, 1989).

Em relação a aumentos disfuncionais nos níveis de BDNF no SNC, Lu *et.al.* encontraram níveis aumentados de BDNF no cérebro de animais após a retirada da cocaína, e mostraram que a busca pela cocaína induzida pela reexposição a pistas associadas à droga aumenta progressivamente ao longo dos dois primeiros meses após a retirada da auto-administração da droga, sugerindo uma incubação do *craving* ao longo deste tempo. Na busca por alguma evidência molecular desta incubação do *craving*, este mesmo trabalho mostrou a expressão crescente dos níveis de BDNF em áreas dopaminérgicas mesolímbicas. Segundo os autores, uma vez que o BDNF modula a eficácia sináptica e a plasticidade, sua expressão aumentada após a retirada da cocaína deve causar alterações sinápticas, que contribuem para as respostas

exacerbadas dos animais frente a pistas relacionadas a droga, bem como para o comportamento compulsivo de busca pela droga (Lu *et al.*, 2004c).

Neste mesmo ano, a *Journal of Neuroscience* publicou um estudo mostrando que uma única infusão do BDNF na área tegmentar ventral, induziu aumento de longa duração da busca pela cocaína por até 30 dias mediante exposição de pistas da droga (Lu *et al.*, 2004).

Ainda, o trabalho de Schulte-Herbrüggen *et al.* (2008) utilizando um modelo experimental para a doença de Alzheimer em camundongos, observaram que camundongos apresentavam - com a progressão do depósito de placas amilóides e conseqüente progressão da doença - elevação nas concentrações de BDNF no córtex pré-frontal, occipital, hipocampo e estriado.

Embora sejam necessárias mais pesquisas para efetivamente se avaliar os efeitos das diferentes polaridades e montagens dos eletrodos sobre os níveis de BDNF, muitas possibilidades terapêuticas poderiam se abrir com uma utilização mais efetiva dos diversos protocolos de estimulação por correntes elétricas.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Diversas áreas de pesquisa têm relacionado à biodisponibilidade do BDNF com resultados benéficos à saúde, proteína considerada fundamental para o desenvolvimento do sistema nervoso, exercendo ações neuroprotetoras em doenças neurodegenerativas. Ainda, vários estudos têm mostrado uma possível associação entre baixos níveis de BDNF e neuropatologias como déficit de aprendizagem, a depressão, a tendência ao abuso de drogas e álcool, esquizofrenia, o mal de Alzheimer e a esclerose múltipla.

A possibilidade de uma intervenção terapêutica capaz de modular seletivamente e localmente a expressão dessa e de outras substâncias neuromoduladoras poderia abrir possibilidades para o tratamento de um grande número de patologias. Para isso, precisamos buscar uma melhor compreensão sobre os eventos celulares relacionados à síntese, clivagem e secreção dessas moléculas.

Ao longo dos estudos que precederam a elaboração dessa tese, tentamos preencher algumas lacunas sobre o entendimento de alguns aspectos relacionados à estimulação por correntes elétricas de baixa intensidade.

Em um primeiro momento, tentamos buscar uma técnica alternativa de estimulação, que nos permitisse ter uma melhor focalização da nossa área de estudo, com o objetivo de compreendermos melhor os efeitos da estimulação cerebral anódica sobre o CPFm de roedores, o que culminou com a

constatação de que a *eDCS* anódica foi efetivamente capaz de proporcionar um melhor desempenho dos animais durante a realização de tarefas cognitivas relacionadas a memória operacional, mesmo após intervalos muito longos interpostos entre o início e a conclusão da tarefa (1, 4 e 10 horas), nos levando ao questionamento sobre que substâncias poderiam estar sendo responsáveis por esses efeitos facilitatórios tão duradouros.

Com base na literatura disponível e em nossos resultados, buscamos utilizar os mesmos parâmetros técnicos no que diz respeito à localização do eletrodo e intensidade de corrente dos nossos estudos anteriores, para avaliarmos que modificações celulares de persistentes estariam ocorrendo em resposta a estimulação realizada, que pudessem ajudar a explicar os efeitos observados.

Adicionalmente, nesse trabalho, buscamos avaliar, se polaridades opostas de estimulação gerariam respostas celulares opostas, uma vez que geram efeitos eletrofisiológicos antagônicos.

Escolhemos como molécula alvo o BDNF, uma vez que essa neurotrofina já está comprovadamente relacionada a diversos efeitos neuroplásticos no SNC, e constitui-se molécula chave nos processos de aprendizagem e memória, crescimento e manutenção da rede neuronal.

Nossos resultados indicaram - pela primeira vez - que a *eDCS* interfere nos níveis de BDNF no CPF, mostrando que:

A *eDCS* anódica - aplicada de forma aguda na intensidade de 400 μ A - levou a uma redução imediata na expressão de BDNF, e interferiu na formação do BDNF maduro, porém houve recuperação rápida (aos 30 minutos) deste último, aparentemente às custas de uma maior conversão a partir do pró-BDNF, já que houve uma redução persistente desta isoforma.

A *eDCS* catódica aguda na mesma intensidade também levou a uma redução, nos níveis de BDNF, porém diferente do grupo anódico, esta redução foi mantida por pelo menos 30 minutos pós-*eDCS*.

A *eDCS* anódica aplicada ao longo de 5 dias, promoveu um aumento nos níveis de ambas as formas de BDNF no CPF dos animais em relação aos grupos *sham* e *eDCS* catódico. Esse aumento foi significativo em relação aos níveis de pró-BDNF, tendo essa tendência se mantido em relação ao BDNF maduro, nos levando a necessidade de um melhor entendimento sobre como se dá esse processo de liberação e clivagem, e de que forma as enzimas responsáveis por esse processo podem ser moduladas pela *eDCS*.

O papel exato da *eDCS* em alterar os níveis das diferentes isoformas do BDNF, bem como os vários mecanismos de sinalização mBDNF/trkB e pró-BDNF/p75NTR potencialmente envolvidos na utilização de correntes elétricas e os efeitos tempo-dependente e polaridade-dependente sobre da *eDCS* sobre os níveis dessa neurotrofina em diferentes regiões do SNC ainda precisam ser elucidados.

Os dados gerados por este trabalho corroboram fortemente com a premissa que a aplicação da *eDCS* anódica repetitiva pode ocasionar alterações

estruturais na sinapse, levando a efeitos facilitatórios na cognição e transmissão sináptica, e que tais alterações tem o envolvimento do BDNF.

Ainda consideramos que esse trabalho constitui-se um estudo pioneiro, que abre perspectivas para futuras pesquisas que podem gerar dados importantes sobre o desenvolvimento de terapias não-farmacológicas bem direcionadas e eficazes para pacientes refratários aos tratamentos convencionais, ou que desejem como alternativas as técnicas atualmente disponíveis de intervenções neuromodulatórias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams RD, Victor M, Ropper AH. Principles of Neurology. 6^a ed., McGraw-Hill, Inc., New York, U.S.A., 1997.
2. Alonso, M. et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*, v. 12, n. 4, p. 551-60, 2002.
3. Alonso, M. et al. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, v. 22, n. 5-6, p. 663-74, Dec 2002.
4. Ammirante, M.; Rosati, A.; Gentilella, A. et al. The activity of hsp90 alpha promoter is regulated by NFkappaB transcription factors. *Nature*, v. 27, n.8, pp. 1175-8, 2007.
5. Andrews SC, Hoy KE, Enticott PG, Daskalakis ZJ, Fitzgerald PB. Improving working memory: the effect of combining cognitive activity and anodal transcranial direct current stimulation to the left dorsolateral prefrontal cortex. *Brain Stimulation*, 4:84-9, 2011.
6. Arévalo J.C and Wu S.H. Neurotrophin signaling: many exciting surprises. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1523-1537, 2006.
7. Baddeley AD, Logie RH. Working memory: the multiple component model. In: Miyake A, Shah P editors. Models of working memory. *Mechanism of active maintenance and executive control*. New York: Cambridge University Press 28-61, 1999.
8. Bashir ZI, Tam B & Collingridge GI. Activation of the glycine site in the NMDA receptor is necessary for the induction of LTP. *Neurosci Lett* 108: 261-266, 1990.

9. Barbacid M. The Family of neurotrophin receptors. *J Neurobiology*. 25:1386-1403, 1994.
10. Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res* 390:45-56, 1994
11. Barker PA. Whither proBDNF? *Nat Neurosci*.12(2):105-6, 2009
12. Batista EK, Klauss J., Fregni F., Nitsche MA., and Nakamura-Palacios EM. "A Randomized Placebo-Controlled Trial of Targeted Prefrontal Cortex Modulation with Bilateral tDCS in Patients with CrackCocaine Dependence." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (12): pyv066, 2015.
13. Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua LRM, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53(2):261-277, 2007
14. Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk L, Gonzalez C, Dorman G, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotox Res* 18(3-4):377-385, 2010.
15. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 1-7, 2013
16. Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*. 7:137–151, 2006.
17. Bibel M.& Bardel Y. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Dev*. 14:2919-2937, 2000.
18. Bliss, TVP & Collingridge, GL. A synaptic model of memory : long - term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39, 1993.

19. Boggio PS. Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre memória operacional e controle motor [tese]. São Paulo(SP): Universidade de São Paulo, Instituto de Psicologia; 2006.
20. Boggio PS, Sultani N, Fecteau S, Merabet L, Mecca T, Pascual-Leone A, Basaglia A, Fregni F. Prefrontal cortex modulation using transcranial DC stimulation reduces alcohol craving: A double-blind, sham-controlled study. *Drug Alcohol Depend*, 92:55–60, 2008.
21. Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol*. 2005;76(2):99-125, 2005.
22. Bramham CR Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol*.18(5):524-31. Oct 2008.
23. Brunoni AR, Pinheiro FS; Boggio OS. Estimulação transcraniana por corrente contínua. In FREGNI, F (Org.). Neuromodulação terapêutica: princípios e avanços da estimulação cerebral não invasiva em neurologia, reabilitação, psiquiatria e neuropsicologia. São Paulo: Sarvier, p.65-75, 2012.
24. Brunoni AR, Nitsche MA, Bolognini N, Bikson M, Wagner T, Merabet L, Edwards DJ, Valero-Cabre A, Rotenberg A, Pascual-Leone A, Ferruci R, Priori A, Boggio PS, Fregni F. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): Challenges and futures directions. *Brain Stimulation*, 2001
25. Cambiaghi M, Velikova S, Gonzalez-Rosa JJ, Cursi M, Comi G, Leocani L. Brain transcranial direct current stimulation modulates motor excitability in mice. *Eur. J. Neurosci*, 31:704–709, 2010.
26. Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D, Docagne F. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci* 11;32(15):5186-99, 2012

27. Chao, MV. Neurotrophins and their receptors: a converge point for many signaling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4 (4),199-309.
28. Chen C; Kano M; Abeliovich A; Chen L; Bao S; Kim JJ; Hashimoto K; Thompson RF & Tonegawa S. Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice. *Cell* 83: 1233-1242, 1995.
29. Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, Mcewen BS, Hempstead BL, Lee FS. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science.* 314(5796):140-3, 2006.
30. Choi S. H. et al. Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Mol Neurodegener,* 4 - 52, 2009.
31. Constantinidis C, Williams G.V. & Goldman-Rakic P. S. A role for inhibition in shaping the temporal flow of information in prefrontal cortex. *Nature Neuroscience* 5, 175 – 180, 2002.
32. Conti, C. L.; Nakamura-Palacios, E. M. Bilateral transcranial direct current stimulation over dorsolateral prefrontal cortex changes the drug-cued reactivity in the anterior cingulate cortex of crack-cocaine addicts. *Brain Stimul,* 7(1),130-2, 2014.
33. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.*25:295-301. 2002
34. Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neuroscience Letters.* 398(3):215-9, 2006.
35. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 3:1, 2010.

36. Custodio JCS, Martins CW, Lugon MDV, Fregni F, Nakamura-Palacios E. Epidural direct current stimulation over the left medial prefrontal cortex facilitates spatial working memory performance in rats., *Brain Stimul.* May;6(3):261-9, 2013.
37. Dalley JW, Cardinal RN, Robbins T. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28:771-784, 2004.
38. Damasio H., Grabowski T. R Frank., Galaburda AM., Damasio AR. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient.. *Science*, 264(5162):1102-5, 1994.
39. da Silva MC., Conti CL. , Klauss J., Alves LG., Cavalcante HMN., Fregni F. , Nitsche MA., Nakamura-Palacios EM. Behavioral effects of transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) induced dorsolateral prefrontal cortex plasticity in alcohol dependence. *Journal of Physiology - Paris* 107. 493–502, 2013.
40. Delatour B, Gisquet-Verrier P. Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory? *Behavioral Neuroscience*, 113:941-995, 1999.
41. Dityatev A, Rusakov DA. Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr Opin Neurobiol.* Apr;21(2):353-9, 2011.
42. Duman RS, Nakagawa S, Malberg J. (2001) Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 25:836–844
43. Duman RS, Monteggia LM. (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116–1127
44. Egan, M. F., M. Kojima, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal

- function. *Cell* 112(2): 257-69, 2003.
45. Finkbeiner S., Tavazoie SF, Maloratsky A., Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19(5):1031-47, 1997.
46. Floel A, Cohen LG. Contribution of noninvasive cortical stimulation to the study of memory functions. *Brain Res Rev*, 53:250-259, 2007.
47. Fregni, F., Boggio, P. S., & Brunoni, A. R. *Neuromodulação Terapêutica: Princípios e Avanços da Estimulação Cerebral Não-Invasiva em Neurologia, Reabilitação, Psiquiatria e Neuropsicologia*. São Paulo: Sarvier, 2012
48. Fregni F, Boggio OS, Nitsche M, Berman F, Antal A, Feredoes E, Marcolin MA, Rigonatti SP, Silva MTA, Paulus W, Pascual-Leone A. Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Exp Brain Res*, 166: 23–30, 2005^a.
49. Fregni F, Boggio PS, Mansur CG, Wagner T, Ferreira M J, Lima MC, et. al. Transcranial direct current stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neuroreport*, 16(14), 1551–1555, 2005^b.
50. Fregni, F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJ, Rocha RR, Natta L, et. al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*, 54(12), 3988–3998, 2006^a.
51. Fregni, F, Boggio PS, Nitsche MA, Marcolin M A, Rigonatti S P, & Pascual-Leone A. Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. *Bipolar Disorders*, 8(2), 203–204, 2006^b.
52. Fregni F, Boggio PS, Nitsche MA, Rigonatti SP & Pascual-Leone A. Cognitive effects of repeated sessions of transcranial direct current stimulation in patients with depression. *Depression and Anxiety*, 23(8), 482–484, 2006^c.

53. Fregni F, Thome-Souza S, Nitsche MA, Freedman SD, Valente KD, Pascual-Leone A. A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*, 47:335–42, 2006^d.
54. Fregni F, Boggio PS, Santos MC, Lima M, Vieira AL, Rigonatti SP, et. al. Non invasive cortical stimulation with transcranial direct current stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21(10):1693–702, 2006^e.
55. Fregni F, Liebetanz D, Monte-Silva KK, Oliveira MB, Santos AA, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Guedes RCA. Effects of transcranial direct current stimulation coupled with repetitive electrical stimulation on cortical spreading depression, *Exp. Neurol.* 204, pp. 462–466, 2007.
56. Fritsch R, Reis J, Martinowick K, Schambra HM, Ji Y, Cohen LG, Lu B. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity:potential implications for motor learning. *Neuron*, 66: 198-204, 2010.
57. Funahashi, S. Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience*, 139, 251-261, 2006.
58. Fuster, JM. Network memory. *Trends Neurosci*, 20, 451-459, 1997.
59. Fuster JM. Executive frontal functions. *Experimental Brain Research*, 133: 66-70, 2000.
60. Fuster JM. The prefrontal cortex – an update: time is of the essence. *Neuron*, 30: 319-333, 2001.
61. Fuster JM. Frontal lobe and cognitive development. *Journal of Neurocitology*, 31: 373 – 385, 2002.
62. Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci*; 79(3):281-286, 2006.

63. Goldman-Rakic P. Circuitry of primate prefrontal cortex and regulation of behaviour by representational memory. In Handbook of Physiology: the Nervous System(vol 5). Edited by Plum F, Mountcastle V: American Physiological Society, 373-417, 1987.
64. Goldman-Rakic PS. Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14: 477 – 485, 1995.
65. Goldman-Rakic, PS; Muly, EC; Williams, GV. D₁ receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res Rev* 31, 295-301, 2000.
66. Grewal SS, York RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 9(5):544-53, Oct. 1999.
67. Hagg, T. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist*, v. 15, n. 1, p. 20-7, Feb 2009.
68. Hall, F.S., Drgonova, J., Goeb, M., Uhl, G.R. Reduced behavioral effects of cocaine in heterozygous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) knockout mice. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28:1485–1490, 2003.
69. He, X P. et al. Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron*, v. 43, n. 1, p. 31-42, Jul 8 2004.
70. Horger BA, Iyasere CA, Berhow, MT., Messer, CJ., Nestler EJ., Taylor JR. Enhancement of Locomotor Activity and Conditioned Reward to Cocaine by Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Neuroscience*, 19 (10) 4110-4122, 1999
71. Islam N. Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain. *Res* 684 (2) 206-208, 1995.
72. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci.*;25:11300–11312, 2005.
73. Jiang, B., Xiong, Z., Yang, J., Wang, W., Wang, Y., Hu, Z.-L., Wang, F. and Chen, J.-G., Antidepressant-like effects of ginsenoside Rg1 are due to

- activation of the BDNF signalling pathway and neurogenesis in the hippocampus. *British Journal of Pharmacology*, 166: 1872–1887, 2012.
74. Joe KH, Kim YK, Kim TS, Roh SW, Choi SW, Kim YB, Lee HJ, Kim DJ. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 31:1833–1838, 2007.
75. Kandel L, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, v. 294, n. 5544, p. 1030-8, Nov 2 2001.
76. Kato-Semba, R; Takeuchi, I.; Semba, R.; Kato, K. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J. Neurochem.*, v. 69, pp. 34–42, 2007.
77. Kim J & Hajjar KA.; Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Frontiers in Bioscience* 7, d341-348, February 1, 2002
78. Klauss J , Pinheiro LCP , Merlo BLS, Santos GAC , Fregni F, Nitsche MA., Nakamura-Palacios EM., A randomized controlled trial of targeted prefrontal cortex modulation with tDCS in patients with alcohol dependence. *International Journal of Neuropsychopharmacology* (2014), 17, 1793–1803, 2014.
79. Kolb B. Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. *Brain Research Reviews*, 8: 65 – 98, 1984.
80. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem E, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 92:8856–8860, 1995.
81. Kovalchuk, Y; Hanse, E.; Kafitz, K.; Konnerth, A. Postsynaptic Induction of BDNF-mediated Long-Term Potentiation. *Science*, v.295, pp 1729-34, 2002.
82. Koshimizu H., Kiyosue K., Hara T., Hazama S, Suzuki S., Uegaki K., Nagappan G., Zaitsev E., Hirokawa T., Tatsu Y., Ogura A., Lu B. and Kojima M. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Molecular Brain*, 2:27 DOI: 10.1186/1756-6606-2-27, 2009

83. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci.* ;25:11288–11299, 2005
84. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, 227: 680-685.
85. Lamy JC¹, Boakye M. BDNF Val66Met polymorphism alters spinal DC stimulation-induced plasticity in humans. *J Neurophysiol.* 110(1):109-16. Apr 10, 2013.
86. Lee, R.; Kermani, P.; Teng, K.; Hempstead, B. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, v. 294, pp.1945–48, 2001.
87. Leffa, D.T, Souza A., Scarabelot VL., Medeiros FL., de Oliveira C. Grevet HE., Caumo W., Souza DO., Rohde LAP., Torres ILS. Transcranial direct current stimulation improves short-term memory in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *European Neuropsychopharmacology* Volume 26, Issue 2, Pages 368–377, Feb 2016
88. Lent, Roberto. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. In:Os neurônios se transformam: bases biológicas da neuroplasticidade. São Paulo: Atheneu. cap. 5, p.135-165, 2005.
89. Lessmann V.,Gottmann K.,Malcangio M. Neurotrophin secretion: currents facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, v.69 (5): 351-374, 2003.
90. Liebetanz, D., Fregni, F., Monte-Silva, K. K., Oliveira, M. B., Amancio-dos-Santos, A., Nitsche, M. A., et al. (2006). After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. *Neurosci Lett*, 398(1-2), 85-90, 2006.
91. Liebetanz, D., Klinker, F., Hering, D., Koch, R., Nitsche, M. A., Porschka, H., et al. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in

- the rat cortical ramp model of focal epilepsy. *Epilepsia*, 47(7), 1216-1224, 2006.
92. Liebetanz, D., Koch, R., Mayenfels, S., König, F., Paulus, W., & Nitsche, M. A. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin Neurophysiol*, 120(6), 1161-1167, 2009.
93. Liebetanz, D., Nitsche, M. A., Tergau, F., & Paulus, W. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain*, 125 (Pt 10), 2238-2247, 2002
94. Linnarsson S, Björklund A, Ernfors P. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci.*;12:2581-7, 1997.
95. Linden DJ & Connor JA. Long term synaptic depression. *Annu Rev Neurosci.* 18: 319-357, 1995.
96. Llinás RR; Sugimori M; Lang EJ; Morita M; Fukuda M; Niinobe M & MIKOSHIBA K . The inositol high-polyphosphate series block synaptic transmission by preventing vesicular fusion : a squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12990-12993, 1994.
97. Lisman J. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9574-9578, 1989.
98. Lochner JE, Spangler E, Chavarha M, Jacobs C, Mcallister K, Schuttner LC, Scalettar BA. Efficient Copackaging and Cotransport Yields Postsynaptic Colocalization of Neuromodulators Associated with Synaptic Plasticity. *Dev Neurobiol* 68(10):1243-1256, 2008.
99. Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*.34(3):371-85, Apr 25.2002.
100. Lou XY, Chen GB, Yan L, Ma JZ, Mangold JE, Zhu J, Elston RC, Li MD: A generalized combinatorial approach for detecting gene-by-gene and gene-by-

- environment interactions with application to nicotine dependence. *The American Journal of Human Genetics*; 80:1125-1137, 2007.
101. Lou XY, Chen GB, Yan L, Ma JZ, Mangold JE, Zhu J, Elston RC, Li MD: A combinatorial approach to detecting gene-gene and gene-environment interactions in family studies. *The American Journal of Human Genetics*; 83:457-467, 2008.
 102. Lu L, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y. A single infusion of BDNF into the ventral tegmental area induces long lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *The journal of neuroscience* 24:1604---1611, 2004 a.
 103. Lu L, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y. A single infusion of brain derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *The Journal of neuroscience* 24:1604-1611, 2004_b.
 104. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev.Neurosci.*; 6, 603–614, 2005
 105. Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem.*; 89(3):312-23, 2008.
 106. Lugon MD, Batsikadze G, Fresnoza S, Grundey J, Kuo MF, Paulus W, Nakamura-Palacios EM, Nitsche MA. Mechanisms of Nicotinic Modulation of Glutamatergic Neuroplasticity in Humans. *Cereb Cortex.* pii: bhv25, [Epub ahead of print] Oct 22, 2015.
 107. Lugon MD. Efeitos da modulação nicotínica sobre a neuroplasticidade glutamatérgica em humanos. [tese]. Vitória (E.S): Universidade Federal do Espírito Santo; Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.

108. Luria AR. Fundamentos de Neuropsicologia. *Editora da USP*, São Paulo, 1981.
109. Lynch G¹, Kramar EA, Rex CS, Jia Y, Chappas D, Gall CM, Simmons DA. Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 7(16):4424-34, Apr 18, 2007.
110. Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*.96(26):15239-44, 21 Dec. 1999.
111. Malenka RC. Synaptic plasticity in the hippocampus : LTP and LTD. *Cell* 78: 535-538, 1994.
112. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5–21, 2004.
113. Mankad, M. V., Beyer, J. L., & Krystal, A. *Clinical Manual of Electroconvulsive Therapy*: American Psychiatric Publishing, Inc., 2010
114. Martínez-Moreno A, Durán LFR, Escobar ML. Late protein synthesis independent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Front Behav Neurosci* 5:1-6, 2011
115. Marsal J; RUIZ-Montacell B; Blasi J; Moreira JE; Contreras D; Sugimori M & LLINAS RR. Block of transmitter release by botulinium C1 action on syntaxin at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14871-14876, 1997.
116. Martins CW. Antagonista do receptor tipo AMPA reverte a modulação pré-frontal induzida pela estimulação epidural por corrente contínua na memória operacional espacial [Dissertação]. Vitória (E.S): Universidade

Federal do Espírito Santo; Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2016.

117. Matsumoto, T.; Rauskolb, S.; Polack, M. *et al.* Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci.*, v. 11, n. 2, pp. 131-33, 2008.
118. Marosi, K. e Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges *Trends in Endocrinology & Metabolism* , Volume 25 , Issue 2 , 89 – 98, 2014.
119. McIntosh, A M, et al. "Temporal grey matter reductions in bipolar disorder are associated with the BDNF Val66Met polymorphism." *Molecular Psychiatry*, vol. 12, no. 10, p. 902, 2007.
120. Melchor J P & Strickland S. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost*; 93: 655-60, 2005.
121. Merzagora AC, Foffani G, Panyavin I, Mordillo-Mateos L, Aguilar J, Onaral B, Oliviero A. Prefrontal hemodynamic changes produced by anodal direct current stimulation. *Neuroimage*.1;49(3):2304-10, 2010
122. Miller EK & Cohen, (2001). An Integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:167-202
123. Minichiello L. TrkB signaling pathways in LTP and learning. *Nature reviews. Neuroscience.* 10:850-860, 2009.
124. Mizuno K, Dempster E, Mill J, Giese KP (2012) Long-lasting regulation of hippocampal BDNF gene transcription after contextual fear conditioning. *Genes Brain Behav* 11(6):651-659.
125. Moorhouse, P.; Gorman, M.; Rockwood, K. Comparison of EXIT-25 and the Frontal Assessment Battery for evaluation of executive dysfunction in

- patients attending a memory clinic. *Dement Geriatr Cogn Disord*, v. 27, n. 5, p. 424-8, 2009.
126. Molaee-Ardekani, Behnam et al. Effects of transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) on cortical activity: A computational modeling study *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation* , Volume 6 , Issue 1 , 25 – 39
 127. Monte-Silva, K., Kuo, M. F., Thirugnanasambandam, N., Liebetanz, D., Paulus, W., Nitsche, M. A. (2009). Dose-dependent inverted U-shaped effect of dopamine (D2-like) receptor activation on focal and nonfocal plasticity in humans. *J Neurosci* 29(19), 6124-6131, 2009.
 128. Monte-Silva, K. K., Kuo, M. F., Liebetanz, D., Paulus, W., & Nitsche, M. A. Shaping the optimal repetition interval for cathodal transcranial direct current stimulation (tDCS). *J Neurophysiol*, 103(4), 1735-1740, 2010.
 129. Murer, M. G.; YAN, Q.; Raisman-Vozari, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, v. 63, n. 1, p. 71-124, Jan 2001.
 130. Müller M & Connor JA. Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca⁺⁺ responses. *Nature* 354: 73-76, 1991.
 131. Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, Yang J, Hempstead BL, Lu B Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Pnas* 106(4):1267-1272, 2009_a.
 132. Nagappan, G.; Zaitsev, E.; Senatorov, V. et al. Control of extracellular cleavage of proBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 106, n.4, pp. 1267-72, 2009_b.
 133. Nakamura-Palacios EM. Working Memory and Prefrontal Cortex and Their Relation with the Brain Reward System and Drug Addiction. In: LEVIN,

- ES (Org.). *Working Memory: Capability, Developments and Improvement Techniques*. New York: NOVA Publishers, p. 109-140, 2011.
134. Nakamura-Palacios EM, Benevides MCA, Zago-Gomes MP, Oliveira RWD, Vasconcelos VF, Castro LNP, Silva MC, Ramos P, Fregni F. Auditory event-related potentials (P3) and cognitive changes induced by frontal direct current stimulation in alcoholics according to Lesch alcoholism typology. *Internacional Journal of Neurophychopharmacology* pp1-16, 2011
135. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: Evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet* 71:651– 655, 2002.
136. Nitsche, MA & Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology* 57, 1899–1901, 2001.
137. Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J. Physiol*, 553: 293-301, 2003.
138. Nitsche MA, Liebetanz D, Antal A, Lang N, Tergau F & Paulus W. Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation—technical, safety and functional aspects. *Supplements to Clin Neurophysiol*, 56, 255–276, 2003.
139. Nitsche MA, Niehaus L, Hoffmann KT, et al. MRI study of human brain exposed to weak direct current stimulation of the frontal cortex. *Clin Neurophysiol*, 115:2419-2423, 2004.
140. Nitsche MA, Doemkes S, Jarakose T, Antal A, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, Paulus W. Shaping the effects of Transcranial Direct Current Stimulation of the human motor cortex. *J Neurophysiol* , 97, 3109-3117, 2007.

141. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, Paulus W, Hummel F, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A. Transcranial direct current Stimulation: state of the art 2008. *Brain Stimul*, 1:206–23, 2008.
142. Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(5):1053-1069, 2011.
143. Obiang P., Macrez R., Jullienne A., Bertrand T., Lesept F., Ali C, Maubert E., Vivien D., and Agin V., GluN2D Subunit-Containing NMDA Receptors Control Tissue Plasminogen Activator-Mediated Spatial Memory *Journal of Neuroscience* , 32 (37) 12726-12734, September 2012.
144. Olton DS, Collinson C, Werz MA. Spatial memory and radial arm maze performance of rats. *Learning and motivation*, 8: 289 – 314, 1977.
145. Olton DS. Mazes, Maps, and Memory. *American Psychologist*, 34 (7): 583 – 597, 1979.
146. Ou LC, Gean PW (2007) Transcriptional regulation of brain derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. *Mol Pharmacol* 72:350-358.
147. Ou LC, Yeh SH, Gean PW (2010) Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiol Learn Mem* 93(3):372-382.
148. Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Research Reviews*. 3(4):407-30, 2004.
149. Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.*;11(3):272-80, 2001.

150. Pezawas L, Beth A, Verchinski, Venkata S, Joseph H, Bhaskar S, et al. The brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci*. 2004;45:10099-102.
151. Poo, M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(4):24-32.
152. Ploughman, M.; Granter-Button, S.; Chernenko, G.; Tucker, B. A.; Mearow, K. M.; Corbett, D. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. *Neuroscience*, v.136, p.991-1001, 2005.
153. Post, R. M. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. *Neurosci Biobehav Rev* 31(6): 858-73. 83. 2007
154. Post, R. M. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications." *J Psychiatr Res* 41(12): 979-90. 2007
155. Racagni G, Popoli M. Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci*. 10:385–400, 2008.
156. Reichardt L. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2006 361 1545-1564; DOI: 10.1098/rstb.2006.1894. Published 29 September 2006
157. Rios, M. *et al*. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol. Endocrinol.* 15, 1748–1757 (2001).
158. Robert S; Feldman JS & Meyer LF. Principles of neuropsychopharmacology. Ed. Sinauer Assoc., Massachussets, 1997.

159. Rösch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde YA, Korte M. The neurotrophin receptor p75^{NTR} modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7362–7367, 2005.
160. Rosen SC e Stamm JS. Transcortical Polarization: Facilitation of Delayed Response Performance by Monkeys. *EXPERIMENTAL NEUROLOGY* 35, 282-289, 1972.
161. Rybakowski JK, Borkowska A, Skibinska M, Szczepankiewicz A, Kapelski P, Leszczynska-Rodziewicz A, Czerski PM, Hauser J. Prefrontal cognition in schizophrenia and bipolar illness in relation to Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Psychiatry Clin Neurosci.* 60(1):70-6, Feb. 2006.
162. Schumacher J, Jamra RA, Becker T, Ohlraun S, Klopp N, Binder EB, et al. : Evidence for a relationship between genetic variants at the brain derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biol Psychiatry* 58:307–314, 2005.
163. Schulte-Herbrüggen O¹, Eckart S, Deicke U, Kühl A, Otten U, Danker-Hopfe H, Abramowski D, Staufenbiel M, Hellweg R. Age-dependent time course of cerebral brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 in APP23 transgenic mice. *J Neurosci Res*;86(12):2774-83, 2008.
164. Shaltiel G, Chen G, Manji HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Current Opinions in Pharmacology.* 7(1):22-6, 2007.
165. Sklar P, Gabriel SB, McClinnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, et al.: Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neurotrophic factor. *Mol Psychiatry* 7:579 –593, 2002.

166. Squire LR, Kandel ER. *Memory: from mind to molecules*. 2.ed. Colorado: Roberts & Company, 2009.
167. Strauss J, Barr CL, George CJ, Devlin B, Vetro A, Kiss E, et al.: Brain-derived neurotrophic factor variants are associated with childhood-onset mood disorder: Confirmation in a Hungarian sample. *Mol Psychiatry* 10:861–867, 2005.
168. Sung NS, Crowley Júnior WF, Genel M, Salber P, Sandy L, Sherwood LM, Johnson SB, Catanese V, Tilson H, Getz K, Larson EL, Scheinberg D, Reece EA, Slavkin H, Dobs A, Grebb J, Martinez RA, Korn A, Rimoïn D. (2003) Central Challenges Facing the National Clinical Research Enterprise. *JAMA* 2003; 289(10):1278-1287.
169. Takei N, Inamura N, Kawamura M, Namba H, Hara K, Yonezawa K, Nawa H. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci.*24:9760–9769, 2004
170. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.*;25:5455-63, 2005.
171. Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD (2002) From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9(5):224-237.
172. Tongiorgi, E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci Res*, v. 61, n. 4, p. 335-46, Aug 2008.
173. Tzschentke, T. The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. *Amino Acids*, 19: 211, 2011.

174. Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B. Do rats have prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 146: 3 – 17, 2003.
175. Vaynman, S.; Ying, Z.; Gómez-Pinilla, F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience*, v.122, p. 647-657, 2003.
176. Working Memory: Capacity, Developments and Improvement Techniques. New York: Nova Science Publishers 2011. (Neuroscience Research Progress).
177. Woo, N.; Teng, H.; Siao, T-J., et al. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long term depression. *Nat neurosc.*, v. 8, pp. 1069-77, 2005.
178. Wu, A.; Ying, Z; Gómez-Pinilla; F. The interplay between oxidative stress and brains-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 1699-1707, 2004.
179. Yang, J.; Sião, C-J; Nagappan, G., et al. Neuronal release of pro-BDNF. *Nat Neurosci*, v.12, n.2, pp.113-15, 2009.
180. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol.* 70(5):304-22, Apr. 2010
181. Yoon KJ, Oh BM, Kim DY. Functional improvement and neuroplastic effects of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) delivered 1 day vs. 1 week after cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1452:61–72, 2012.
182. Zaehle T, Sandmann P, Thorne JD, Jäncke L, Herrman CS, Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates

working memory performance: combined behavioural and electrophysiological evidence. *BMC Neuroscience* 12:2, 2011

183. Zagrebelsky, M.; Korte, M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. *Neuropharmacology*, Jun 8 2013.
184. Ziemann, U. et al Consensus: Motor cortex plasticity protocols. *Brain Stimulation*. Volume 1 , Issue 3 , 164 – 182, 2008.
185. Zouhar, A., Mare, P., Lišková-Bernášková, K. and Mudrochová, M., Motor and Electrographic Epileptic Activity Induced by Bicuculline in Developing Rats. *Epilepsia*, 30: 501–510, 1989..
186. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*;293(5529):493–498. 2001.
187. Zuccato C, Liber D, Ramos C, Tarditi A, Rigamonti D, Tartari M, Valenza M, Cattaneo E. Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol Res*. 2(2):133–139, 2005.