**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA EXPERIMENTAL**

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO
TRANSCRANIANA POR CORRENTE
CONTÍNUA SOBRE O PROCESSAMENTO
VISUAL BÁSICO**

**Aluno: Thiago Leiros Costa
Orientadora: Dora Fix Ventura
Coorientador: Paulo Sérgio Boggio**

**São Paulo
2014**

THIAGO LEIROS COSTA

Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua
sobre o processamento visual básico

Tese apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de
São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do grau
de Doutor em Psicologia

Área de concentração: Psicologia
experimental

Orientadora: Dora Fix Ventura

Coorientador: Paulo Sérgio Boggio

São Paulo
2014

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.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Costa, Thiago Leiros.

Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre o processamento visual básico / Thiago Leiros Costa; orientadora Dora Selma Fix Ventura, co-orientador Paulo Sérgio Boggio. -- São Paulo, 2014.

127 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Estimulação transcraniana por corrente contínua 2. ETCC 3. Visão de cores 4. Mecanismos de ação 5. Via I. Título.

BF241

Nome: Costa, Thiago Leiros

Título: Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre o processamento visual básico

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Psicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio ao projeto.

Aos meus pais e a Marília, por todo apoio e carinho.

Aos meus orientadores Dora Fix Ventura e Paulo Sérgio Boggio por tantas oportunidades de aprendizado.

Aos bons e maus professores que tive.

RESUMO

Costa, T. L. Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre o processamento visual básico. Tese de doutorado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) é um método para modulação não-invasiva da atividade cerebral que vem sendo amplamente utilizado na pesquisa clínica e na investigação da relação complexa entre comportamento e atividade cerebral. Por outro lado, os efeitos da ETCC sobre o desempenho visual ainda foram pouco estudados, e a especificidade de vias visuais e funções afetadas pela estimulação não foi investigada. É fundamental elucidar tais questões antes de propor aplicações clínicas adequadas da ETCC na reabilitação visual. Aqui, utilizamos testes psicofísicos e eletrofisiológicos sensíveis a alterações em diferentes vias e grupos de células do sistema visual para avaliar os efeitos da ETCC. Realizamos experimentos em voluntários saudáveis e um modelo animal. Nos experimentos em humanos, os participantes receberam ETCC anódica, catódica e placebo (Oz-Cz, $0,06\text{mA}/\text{cm}^2$) em sessões distintas. (1) Para testar a visão de cores, utilizamos Cambridge Colour Test (CCT) e uma tarefa de contraste de cores com grade senoidal verde-vermelho. No CCT a ETCC anódica aumentou a sensibilidade no eixo tritan ($p < 0,001$) e não teve efeito sobre a sensibilidade nos eixos protan e deutan. ETCC catódica diminuiu a sensibilidade no eixo deutan e aumentou a sensibilidade no eixo tritan. Os efeitos retornaram à linha de base após 15 min. (2) Para testar visão de acromática utilizamos testes psicofísicos de sensibilidade ao contraste de grades e Pedestal- Δ -Pedestal. Utilizamos também Potencial Visual Evocado de Varredura (PVEv) para contraste e acuidade de Vernier. ETCC não afetou sensibilidade ao contraste psicofísica ou os limiares de Vernier ou contraste medidos com PVEv. ETCC anódica aumentou significativamente limiares para decremento do pedestal apenas nas respostas mediadas pela via magnocelular. Para o PVEv de contraste, ETCC catódica aumentou amplitude da resposta supraliminar para 0,5cpg e diminuiu para 4cpg sem afetar as respostas para 16cpg. ETCC catódica aumentou a fase para 4cpg e diminuiu para 16cpg. Houve efeito significativo da ETCC catódica e anódica sobre resposta supraliminar de Vernier. (3) Para avaliar os efeitos sobre o campo visual utilizamos os protocolos 10-2 e 60-4 do campímetro Humphrey. A ETCC só afetou significativamente o desempenho sobre os pontos mais excêntricos medidos com o campímetro, aumentando a sensibilidade. Ainda, resultados anteriores da literatura não foram replicados. O efeito diferencial da ETCC catódica sobre a sensibilidade tritan, deutan e o processamento de diferentes faixas de frequência espacial sugere que diferentes vias e grupos de células no sistema visual são afetados de maneira distinta pela ETCC. Em geral, os resultados encontrados sugerem que ETCC pode ter um efeito distinto em diferentes grupos de células no córtex visual e assim, é uma ferramenta em potencial para estudar a organização do sistema visual. Além disso, as alterações de latência encontradas sugerem que a ETCC pode levar a alterações funcionais modulando a somação temporal das células

estimuladas. Futuros estudos devem levar em consideração possíveis efeitos diferenciais da ETCC em diferentes grupos de células nas áreas estimuladas. (4) No experimento realizado com modelo animal, coelhos albinos receberam ETCC sobre o córtex visual primário. PVE por *flashes* foram medidos antes e após ETCC. Apenas a ETCC catódica produziu efeitos significativos. Os resultados estão de acordo com a literatura em humanos e foram consistentes para todos os animais. O uso deste modelo possibilitará pesquisas no nível celular e molecular dos efeitos da ETCC sobre o córtex visual.

Palavras-chave: 1. Estimulação transcraniana por corrente contínua 2. ETCC 3. Visão de cores 4. Mecanismos de ação 5. Vias Visuais

ABSTRACT

Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) is a noninvasive brain stimulation method that has been widely used in clinical research and investigations of the complex relationship between behavior and brain activity. Nevertheless, the effects of tDCS on visual performance are still poorly understood and specificity of the visual pathways and functions affected by stimulation was not yet investigated. It is essential to elucidate such issues before proposing appropriate clinical applications of tDCS on visual rehabilitation . Here, we used psychophysical and electrophysiological methods sensitive to changes in different groups of cells and pathways of the visual system to evaluate the effects of tDCS . We conducted experiments in healthy volunteers and an animal model . In human experiments , participants received anodal , cathodal and sham tDCS (Oz - Cz , 0.06 mA/cm²) in separate sessions. (1) To test color vision , we used Cambridge Colour Test (CCT) and a color contrast sensitivity task with red-green sinusoidal gratings. Anodal tDCS increased sensitivity in the tritan axis ($p < 0.001$) and had no effect on the sensitivity in protan and deutan axes . Cathodal tDCS decreased sensitivity in deutan axis and increased sensitivity in the tritan axis. The effects returned to baseline after 15 min. (2) To test achromatic vision we used psychophysical tests of grating contrast sensitivity and Pedestal - Δ - Pedestal . We also used Sweep Visual Evoked Potential (PVEv) for contrast sensitivity and vernier acuity. TDCS did not affect psychophysical of PVEv contrast thresholds. Anodal tDCS significantly increased thresholds for the pedestal decrement only in the magnocellular pathway mediated responses. For PVEv contrast , cathodal tDCS increased to suprathreshold response amplitude to 0.5 cpd and decreased it for 4cpd without affecting responses to 16cpd . Cathodal tDCS increased the phase for 4cpd and decreased it to 16cpd . There was a significant effect of anodal and cathodal tDCS on suprathreshold Vernier responses. (3) To evaluate the effects on the visual field we used the 10-2 and 60-4 protocols of the Humphrey perimeter. tDCS only significantly affected the performance of the most eccentric points measured with the perimeter, increasing sensitivity. Still , previous literature results were not replicated. The opposite effect of cathodal tDCS on the tritan and deutan sensitivity, and in the processing of different spatial frequency bands suggests that different pathways and groups of cells in the visual system are affected differently by tDCS. In general , the results suggest that tDCS may have a different effect on different groups of cells in the visual cortex and thus is a potential tool for studying the organization of the visual system . Furthermore, the change latency encountered suggest that tDCS can lead to functional alterations of the temporal summation in the stimulated cells. Future studies should take into account possible differential effects of tDCS on different groups of cells in the stimulated areas. (4) In the experiment with the animal model, albino rabbits received tDCS over the primary visual cortex . VEP flashes were measured before and after tDCS. Only cathodal tDCS produced significant effects. The results are consistent with the literature in humans and were consistent for all animals . The use of this model will enable research of cellular and molecular mechanisms of tDCS on visual cortex .

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

1.1 Mecanismos de ação 14

1.2 Efeitos colaterais e parâmetros de segurança 17

1.3 Justificativa 19

2 OBJETIVOS 21

2.1 Objetivo geral 21

2.2 Objetivos específicos 21

3 MÉTODOS 22

3.1 Contexto 22

3.2 Participantes 22

3.3 Equipamentos e testes visuais 23

3.3.1 Estimulação transcraniana por corrente contínua 23

3.3.2 Testes de visão de cores 25

3.3.2.1 Cambridge Colour Test 25

3.3.2.2 Sensibilidade ao Contraste Cromático 27

3.3.3 Sensibilidade ao contraste acromático 28

3.3.3.1 Sensibilidade ao contraste de grades senoidais (Eletrofisiologia) 28

3.3.3.2 Sensibilidade ao contraste de grades senoidais (Psicofísica) 31

3.3.3.3 Pedestal- Δ -Pedestal 32

3.3.4 Campo visual 33

3.3.5 Acuidade visual de Vernier 35

3.3.6 Desenvolvimento de Modelo Animal 36

3.4 Procedimentos 37

3.4.1 Visão de cores 38

3.4.2 Visão acromática 39

3.4.3 Campo visual 40

3.4.4 Modelo animal 41

3.5 Análise de dados 41

4 RESULTADOS 44

4.1 Visão de cores 44

4.2 Sensibilidade ao contraste acromática 50

4.3 Acuidade de Vernier 59

4.4 Campo visual 62

4.5 Modelo animal 64

5 DISCUSSÃO 69

5.1 Visão de cores 69

5.2 Sensibilidade ao contraste acromático 80

5.3 Acuidade de Vernier 91

5.4 Campo visual 92

5.5 Modelo Animal 102

5.6 Discussão Geral 105

6 CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

Métodos não invasivos de modulação da atividade cortical através de correntes elétricas são usados desde o século 1 AC (Priori, 2003). Porém, apenas com o advento e popularização da eletroconvulsoterapia (ECT) no século XX tais métodos passaram a ser estudados e discutidos mais amplamente. As polêmicas relacionadas ao uso inadequado da ECT, associadas à insatisfação com a estrutura e funcionamento dos hospitais psiquiátricos, dificultaram o desenvolvimento e a aplicação da ECT e de outros tratamentos semelhantes (Lynne, 2007). Apesar das polêmicas, pesquisas com modelos animais mostraram que a excitabilidade cortical poderia ser significativamente modulada pela aplicação superficial de correntes de baixa intensidade cujo efeito era dependente da direção de corrente (por exemplo, Creutzfeld, Fromm & Kapp, 1962; Purpura & McMurtry, 1964). Os efeitos da estimulação se mostraram relativamente duradouros, considerando que sessões de 10 a 30 minutos de duração chegavam a modular a excitabilidade cortical por até 5 horas (Bindman, Lippold & Redfearn, 1962; Gorman 1966).

Recentemente, Nitsche e Paulus (2000) testaram os efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) de baixa intensidade ($0.028\text{mA}/\text{cm}^2$) na excitabilidade do córtex motor de voluntários saudáveis. Os autores relataram alterações de até 40% na amplitude do potencial motor evocado, constatando que a estimulação anódica (eletrodo com carga positiva, que atrai ânions) resultava em um aumento da excitabilidade cortical, efeito contrário ao da estimulação catódica (eletrodo com carga negativa, que atrai

cations). A partir deste trabalho, uma série de estudos passou a utilizar a ETCC em humanos, tanto com fins terapêuticos como de elucidação das relações complexas entre atividade cerebral e comportamento. Foram relatados efeitos significativos da estimulação sobre o desempenho sensorial, motor e funções cognitivas como atenção, memória e tempo de reação (para revisões ver: Nitsche et al. 2008; Ukuieberuwa, 2010; Kue & Nitsche, 2012).

Além disso, alguns trabalhos demonstram que a ETCC pode modular a atividade do córtex visual. Dentre os resultados significativos destacamos: modulação da sensibilidade ao contraste para grades senoidais (Antal, Nitsche & Paulus, 2001; Antal et al. 2004a; Accornero et al., 2007), redução de limiar para o aparecimento de fosfenos (Antal et al., 2003a, 2003b), aumento de sensibilidade na área central do campo visual medida com campimetria automatizada (Kraft et al., 2010), modulação de movimentos oculares sacádicos e anti-sacádicos (Kanai et al., 2012) e aumento de habilidades visuo-motoras diversas (Antal et al., 2004b; Antal et al., 2004c; Bolognini et al., 2010a, 2010b). Além disso, ETCC também tem um efeito significativo sobre o desempenho em tarefas de integração multi-modal (Bolognini et al., 2010a, 2011) e sobre o processamento de ilusões visuais (Varga et al., 2007; Bolognini et al., 2011). Para revisões ver Antal e Paulus (2008) e Antal, Nitsche e Paulus (2011).

Apesar do aparente consenso acerca do potencial neuromodulatório da ETCC sobre o sistema visual (Antal & Paulus, 2008), ainda há muitas questões a serem investigadas. Efeitos da ETCC sobre funções visuais básicas como visão de cores ainda não foram avaliados. Os efeitos específicos da ETCC sobre o processamento de informação visual mediado pelas vias Magno, Parvo ou

Koniocelulares não foram avaliados e geralmente não são discutidos na literatura da área. Os trabalhos que avaliam efeitos da ETCC sobre visão de contraste acromático se restringem a utilizar apenas uma frequência espacial e temporal em poucos níveis de contraste (por exemplo: Antal et al. 2004a; Accornero et al. 2007). Existem também muitas questões em aberto no que diz respeito aos mecanismos de ação da ETCC sobre o sistema visual.

1.1 Mecanismos de Ação

Existem diversos exemplos demonstrando que o desempenho humano pode ser aumentado ou inibido durante a aplicação da ETCC (Nitsche et al. 2008), efeitos de uma sessão de estimulação podem durar por horas (Kue e Nitsche, 2012) e efeitos de sessões repetidas podem durar semanas (Brunelin et al. 2012). Apesar de os efeitos estarem comprovados, os mecanismos de ação da ETCC ainda não foram plenamente elucidados. Em resumo, os efeitos da ETCC no nível celular parecem ser determinados primeiramente por uma modulação do potencial de repouso das células estimuladas, seguida de um aumento (ou diminuição) na taxa de disparo, resultando em alterações funcionais relativamente duradouras provavelmente mediadas por mecanismos de plasticidade “*LTP-like*” e “*LTD-like*” (Stagg e Nitsche, 2011). Tais efeitos podem não se limitar à área estimulada (Zaghi et al. 2010; Márquez-Ruiz et al. 2012). Aparentemente a ETCC não induz potenciais de ação diretamente (Bindman et al. 1964; Nitsche et al. 2008). Em geral há um efeito excitatório na área estimulada com o ânodo e um efeito inibitório na área estimulada com o cátodo,

com algumas exceções (Nitsche et al. 2008; Kue e Nitsche 2012). Por exemplo, por vezes ambas as direções de corrente apresentam efeitos na mesma direção (ex: Jones & Berryhill, 2012) ou a estimulação catódica pode ter um efeito excitatório (ex Antal et al. 2004d).

Alguns trabalhos vêm investigando os mecanismos de ação da ETCC no nível molecular. A administração do bloqueador de canais de cálcio (flunarizina) diminuiu, enquanto que um bloqueador de canais de sódio (carbamazepina) aboliu os efeitos da estimulação anódica medidos durante ETCC (Nitsche et al. 2003). Por outro lado, a administração de antagonistas de receptores NMDA ou agonistas de GABA não afetou os efeitos da ETCC medidos durante a estimulação (Stagg e Nitsche, 2011). Ainda, efeitos pós-ETCC anódica e catódica foram abolidos pela administração de antagonistas de receptores NMDA (Liebetanz et al. 2022; Nitsche et al. 2003b). Estes resultados sugerem que os efeitos da ETCC podem ser mediados por diferentes mecanismos em diferentes momentos do tempo e que mecanismos “*LTP-like*” e “*LTD-like*” parecem estar envolvidos nos efeitos em longo prazo.

É importante ressaltar que a maior parte do conhecimento acerca dos mecanismos de ação da ETCC vem de pesquisas focadas na atividade do córtex motor primário. Investigações dos mecanismos subjacentes aos efeitos da ETCC sobre funções sensoriais são raras, e embora diferentes modalidades possam empregar mecanismos similares, isso deve ser levado em consideração. Em uma das raras investigações dos mecanismos de ação da ETCC sobre uma função sensorial, Márquez-Ruiz et al. (2012) demonstraram que o bloqueio de receptores adenosina A1 diminuíram os efeitos pós-ETCC catódica no córtex

somatosensorial de coelhos não anestesiados, sugerindo que mecanismos “*LTD-like*” estão envolvidos nos efeitos pós-ETCC em áreas sensoriais.

Alguns trabalhos recentes ilustram que a modulação induzida pela ETCC pode afetar diferentes áreas corticais e subcorticais em uma rede de efeitos complexa envolvendo áreas que não foram diretamente atingidas pela corrente (ver Zaghi et al. 2010). Márquez-Ruiz et al. (2012) demonstraram também que a ETCC do córtex somatosensorial pode modular sinapses thalamocorticais no nível pré-sináptico. Marshall et al. (2004) demonstraram com eletroencefalograma que a estimulação de uma área pode levar a alterações sincrônicas em outras áreas não estimuladas. Ainda, Zheng et al. (2011) observaram alterações no fluxo sanguíneo regional de áreas funcionalmente relacionadas à área estimulada sem que estas áreas recebessem ETCC diretamente.

É importante ressaltar que efeitos da estimulação elétrica por corrente contínua parecem estar relacionados ao *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF, uma proteína que influencia a plasticidade sináptica no cérebro adulto) em estudos *in vitro* (Fritsch et al. 2010). A estimulação induziu a secreção de BDNF na área M1 de camundongos normais, enquanto que o LTP normalmente induzido pela estimulação foi abolido em camundongos BDNF *knockout*.

Estes resultados sugerem que o BDNF parece ter um papel na plasticidade induzida pela ETCC. Alguns estudos vêm demonstrando também que diferentes polimorfismos de genes ligados ao BDNF podem levar a diferentes resultados da ETCC. Antal et al. (2012) demonstrou que carreadores do polimorfismo Val66Met apresentam maior plasticidade induzida por ETCC que carreadores do Val66Val. Por outro lado Di Lazzaro et al. (2012) e Brunoni et al.

(2013) não encontraram diferenças significativas entre estes grupos. Brunoni et al. (2013) encontrou ainda que os efeitos da ETCC no tratamento da depressão parecem ser dependentes de variações na 5-HTTLPR (*serotonin-transporter-linked polymorphic region*), uma região polimórfica associada ao transporte da serotonina. Este resultado reforça o envolvimento do sistema serotoninérgico nos efeitos da ETCC. Nitsche et al. (2009) havia levantado esta hipótese após constatar que o Citalopram (um inibidor seletivo da recaptação de serotonina) aumenta significativamente o efeito da ETCC sobre a excitabilidade do córtex motor.

Por fim, fica claro que diferentes fatores parecem estar envolvidos nos efeitos da ETCC e que mais pesquisas são necessárias para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação e uma otimização de seus parâmetros e protocolos clínicos.

1.2 Efeitos Colaterais e Parâmetros de Segurança

Apesar dos mecanismos de ação da ETCC ainda não terem sido plenamente elucidados, a técnica vem se mostrando segura quando aplicada seguindo os parâmetros de segurança estabelecidos para a área (Nitsche et al., 2008). Em geral, os estudos com ETCC em humanos envolvem efeitos colaterais leves e transientes (Ukueberuwa, 2010; Nitsche et al. 2008; Brunoni et al. 2012). Em uma revisão de 172 publicações que descrevem 209 experimentos aplicando ETCC em humanos, Brunoni et al. (2011) constataram que 56% mencionaram

efeitos colaterais e estes se limitaram à sensação de prurido sob os eletrodos, dores de cabeça e desconforto. É importante mencionar que tais efeitos colaterais também foram relatados por participantes recebendo ETCC placebo. Assim, é possível que em muitos casos as queixas sejam determinadas por outros fatores que não a corrente elétrica em si. Não foram relatadas a persistência das queixas ou outras repercussões negativas associadas à aplicação da ETCC.

O fato de efeitos colaterais associados à ETCC serem raros e moderados se deve em grande medida à baixa intensidade das correntes aplicadas. Em geral os trabalhos utilizam densidades de corrente que variam entre 0.028 mA/cm^2 (para 1 mA em eletrodo de 35 cm^2) e 0.057 mA/cm^2 (para 2 mA em eletrodo de 35 cm^2), valores que estão respectivamente 875 e 437,5 vezes abaixo do valor proposto por McCreery e colaboradores (1990) como seguro (Boggio, 2006). Segundo McCreery et al., densidades de corrente abaixo de 25 mA/cm^2 não são capazes de provocar dano ao tecido cerebral, mesmo quando a corrente é aplicada por várias horas.

Além da densidade de corrente transmitida por cada eletrodo, é importante considerar a carga total de corrente aplicada ao longo da sessão. Se considerarmos o uso de eletrodos de 35 cm^2 aplicando corrente de 2 mA por 30 minutos (um exemplo de parâmetros de estimulação de maior intensidade dentre aqueles utilizados nas pesquisas na última década, como visto em Nitsche et al. 2008), a carga total da sessão é de $0,103 \text{ C/cm}^2$, valor 2100 vezes mais baixo do que o sugerido por Yuen et al. (1981) como seguro. Ainda, estudos recentes demonstraram que a ETCC não eleva a concentração de marcadores de dano

neural e não induz edemas ou alterações estruturais no sistema nervoso (Nitsche et al. 2003a,b; 2008). Para outros estudos que corroboram a salubridade da aplicação de ETCC com os parâmetros utilizados no presente trabalho, ver: Nitsche et al. (2004) ou Poreisz et al. (2007).

1.3 Justificativa

A ETCC é conhecida como uma técnica pouco focal, porém, isso não implica que a técnica tenha um efeito difuso sobre todos os grupos de células e funções mediadas pela área estimulada. Aqui, estamos avaliando os efeitos da ETCC sobre a visão de cores, sobre diferentes áreas do campo visual, sobre a sensibilidade ao contraste para diferentes faixas de frequência espacial e para incrementos e decrementos de luminância em diferentes níveis de contraste. Todos os testes aqui utilizados são sensíveis em maior ou menor grau à atividade de diferentes vias retino-corticais ou à atividade de diferentes grupos de células em V1. Assim, está sendo possível avaliar se as repercussões da ETCC são equivalentes para o processamento visual mediado por diferentes vias e grupos de células responsáveis pelas diversas funções estudadas. Esse esclarecimento é essencial para propor aplicações clínicas adequadas da ETCC sobre o sistema visual e a literatura atual não possibilita tal discussão. Os trabalhos que avaliam sensibilidade ao contraste se limitam a utilizar uma frequência espacial apenas (Antal et al. 2001, 2004a), efeitos sobre a sensibilidade no campo visual central não foram comparados com efeitos no campo visual periférico (Kraft et al. 2010) e efeitos sobre a visão de cores e vias ON / OFF de luminância não foram

avaliados até o momento.

Utilizaremos testes específicos para a atividade das vias retinocorticais Parvo, Magno e Koniocelular, áreas retinotópicas distintas e vias ON e OFF de processamento de luminância. Se o efeito da ETCC sobre o córtex visual for difuso, encontraremos alterações semelhantes nos diferentes testes. Caso contrário, a ETCC pode ser mais eficaz para modular algumas funções visuais e grupos de células que outros e esse conhecimento será relevante para otimizar protocolos clínicos e guiar a pesquisa básica.

O potencial terapêutico da ETCC vem sendo demonstrado em diversos estudos (para revisões ver: Nitsche et al. (2008); Zaghi et al. (2010); Brunoni et al. 2011). Por outro lado, o potencial terapêutico da ETCC na reabilitação visual ainda foi pouco estudado. A reabilitação do campo visual de pacientes que sofreram acidente vascular encefálico é um dos poucos casos em que a ETCC foi aplicada sobre o sistema visual com propósito clínico (Ko et al. 2008; Halko et al. 2011; Plow et al. 2012). Há também um caso em que a ETCC anódica foi eficaz em melhorar sensibilidade ao contraste em amblíopes (Spiegel et al. 2013). Para otimizar e avançar com as pesquisas envolvendo ETCC na reabilitação visual, é crítico conhecer os efeitos da estimulação sobre diferentes grupos de células e vias visuais.

Ainda, para que a ETCC venha a ser adotada em pacientes fora do contexto de pesquisa é necessário que os mecanismos de ação por trás de seus efeitos sejam melhor compreendidos. Apesar de importantes avanços nesse sentido, muitas perguntas continuam sem resposta no que diz respeito aos mecanismos de ação da ETCC (Stagg e Nitsche, 2011). O uso de modelos

animais não anestesiados é fundamental para a elucidação dessas questões (Márquez-Ruiz et al., 2012) e até a presente data nenhum modelo desta natureza foi proposto para o estudo dos efeitos da ETCC sobre o córtex visual. O presente trabalho também se propõe a desenvolver tal modelo.

No que diz respeito à investigação dos mecanismos de ação da ETCC, é importante ressaltar também que nas neurociências, o sistema visual é um modelo de estudo para o qual foi compilada uma quantidade de informação sem paralelo em outras funções perceptuais e cognitivas. Ainda, a neurociência visual contemporânea oferece um grande número de ferramentas para avaliar a atividade de diferentes grupos de células numa área cortical específica em humanos. Assim, a investigação aqui proposta representa uma oportunidade sem precedentes para a elucidação dos efeitos e mecanismos de ação da ETCC.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da ETCC sobre funções visuais básicas processadas por diferentes vias e grupos de células no sistema visual.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos da ETCC aplicada ao córtex visual na visão de cores.
2. Avaliar os efeitos da ETCC aplicada ao córtex visual sobre a sensibilidade ao contraste acromática e sobre a acuidade visual.

3. Avaliar os efeitos da ETCC aplicada ao córtex visual sobre o campo visual central e periférico.
4. Comparar como as vias Magno, Parvo e Koniocelular são afetadas pela ETCC.
5. Desenvolver um modelo animal desperto para estudos dos mecanismos envolvidos nos efeitos da ETCC no córtex visual.

3. MÉTODO

3.1 Contexto

O presente trabalho vem sendo realizado no Laboratório da Visão (Psicofísica e Eletrofisiologia Visual Clínica) do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo coordenado pela Professora Doutora Dora Fix Ventura. Conta também com a colaboração do Professor Doutor Paulo Sérgio Boggio (Núcleo de Neurociências da Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo-SP) como co-orientador e consultor de questões referentes à ETCC.

O aluno também foi convidado a realizar um estágio em Eletrofisiologia e ETCC na Universidade Pablo de Olavide em Sevilha, Espanha, sob a supervisão do Professor Doutor Javier Márquez-Ruiz nos meses de outubro e novembro de 2012. Durante este período foi desenvolvido o modelo animal descrito abaixo.

3.2 Participantes

Cada teste visual foi aplicado em uma etapa da pesquisa. Em cada etapa

participaram entre 15 e 20 voluntários com idades entre 20 e 40 anos, recrutados entre os estudantes da Universidade de São Paulo. Os critérios de exclusão adotados foram: histórico de doenças neuropsiquiátricas, fumo ou doenças do sistema visual, utilização de analgésicos ou outros medicamentos que pudessem afetar a excitabilidade cortical, além de histórico de convulsões, implantes ou lesões na região da cabeça.

3.3 Equipamentos e testes visuais

3.3.1 Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua em humanos

O aparelho de ETCC utilizado aqui foi desenvolvido por Paulo S. Boggio e colaboradores (Boggio et al., 2009; Boggio et al., 2008; Boggio et al. 2007; Fregni et al., 2005; Fecteau et al., 2007). O aparelho consiste em um circuito simples alimentado por duas baterias de 9V. Os eletrodos são compostos por borracha condutora envolta por esponjas. As esponjas diminuem o risco de lesão dermatológica, evitando o contato direto dos eletrodos com a pele. Os eletrodos são presos à cabeça do participante por uma fita elástica. As esponjas dos eletrodos são embebidas em soro fisiológico para diminuir o risco de lesão dermatológica e de reações químicas que poderiam resultar da interação entre pele e eletrodo (Nitsche et al., 2003). Cada eletrodo mede 5x5cm, ou seja, 25cm².

Figura 1 - Exemplo de aparelho de ETCC (Fonte: Zaghi et al., 2010).

Utilizamos um delineamento de medidas repetidas no qual cada participante realiza cada teste três vezes, em sessões em dias diferentes. O participante recebe um tipo de estimulação (anódica, catódica ou placebo) em cada sessão. A ordem das sessões foi aleatória e o intervalo mínimo entre sessões foi de 7 dias, evitando efeitos cumulativos da estimulação (Nitsche et al. 2008; Antal et al. 2008).

As sessões de ETCC têm duração máxima de 30 minutos. A aplicação inicia com corrente de 0mA, que nos primeiros 10 segundos de estimulação será gradualmente aumentada até 1,5 mA, mantendo-se nessa intensidade até o final da sessão. O participante recebe 5 minutos de estimulação antes do início dos testes visuais, e continua recebendo a estimulação ao longo de todo o teste. Ao fim do teste, a corrente é diminuída gradualmente ao longo de 10 segundos até chegar ao valor de 0mA. Nas sessões de ETCC placebo, todo o procedimento é realizado da mesma forma, sendo que o aparelho é desligado após 30 segundos de estimulação, medida que torna o procedimento inócuo (Gandiga, Hummel &

Cohen, 2006; Nitsche et al. 2008). Os eletrodos são aplicados de acordo com o sistema internacional 10-20 para eletroencefalograma (Jasper, 1958). O eletrodo ativo é posicionado sobre Oz e o eletrodo de retorno sobre Cz.

3.3.2 Testes de visão de cores

A visão de cores foi avaliada com dois testes psicofísicos computadorizados: Cambridge Colour Test 2.0 (Cambridge Research Systems) e um teste de sensibilidade ao contraste cromático desenvolvido em nosso laboratório. Ambos os testes foram executados em um sistema gerador de estímulos VSG 2/5 (Cambridge Research Systems) com um monitor CRT Viewsonic G90fB 19". A correção Gamma do monitor foi realizada imediatamente após o início das coletas utilizando um fotômetro Optical 200E (Cambridge Research Systems). Os participantes foram posicionados a 3 metros da tela do monitor e os testes foram executados com visão binocular.

3.3.2.1 Cambridge Colour Test

Baseado em estímulos pseudoisocromáticos, o Cambridge Color Test (CCT) é um teste computadorizado que avalia capacidade discriminativa de cores. Utiliza como estímulo uma adaptação do "C" de Landolt com ruído de luminância, eliminando "pistas" de luminância referentes ao contorno do estímulo. Tal estímulo é composto por círculos de diversos tamanhos (diâmetros entre 5,7 e 22,8 arcmin) e luminâncias que variam em seis níveis entre 7,0 e 15,0 cd/m². A

tarefa do participante consiste em identificar a orientação do “C” de Landolt (Figura 2A) em um método psicofísico de escolha forçada de quatro alternativas com escada dupla, que pode se iniciar de forma ascendente ou descendente. A cromaticidade do alvo (“C”) se aproxima da cromaticidade do fundo para cada resposta correta e se distancia para cada resposta errada. O tamanho do passo na escada é dobrado ou dividido por dois após cada resposta incorreta ou correta, respectivamente. O teste chega ao fim quando 11 reversões são obtidas para cada eixo testado, porém o limiar é estimado a partir das 6 reversões finais de cada eixo (Reagan, Reffin & Mollon, 1994; Reffin, Astell & Mollon, 1991).

Utilizamos dois protocolos de teste distintos, de forma complementar. O protocolo mais rápido, chamado *Trivector*, mede limiares de discriminação nos eixos de confusão protan, deutan e tritan independentemente, enquanto que o mais longo (teste das elipses), gera uma elipse de MacAdam a partir da estimação dos limiares para 8 vetores distintos espaçados 45° entre si no espaço de cores CIE 1976 (Ventura et al. 2003). Assim, podemos avaliar a discriminação de cores em 360° no espaço de cores CIE. Ao longo do teste o participante registra cada resposta com um controle remoto modelo CT6 (Cambridge Research Systems).

Figura 2 - (A) Exemplo da adaptação pseudoisocromática do “C” de Landolt utilizada no CCT (B) Espaço de Cores CIE 1976 com eixos de confusão protan (P) deutan (D) e tritan (T). O triângulo de cores representa os limites do *gamut* do monitor no espaço CIE 1976. (C) Exemplo da Elipse de McAdam com oito vetores. (D) Exemplo de grade senoidal verde-vermelho.

3.3.2.2 Sensibilidade ao Contraste Cromático

O teste de sensibilidade ao contraste cromático foi utilizado para estimar a sensibilidade ao contraste a grades senoidais verde-vermelho (Figura 2D, vermelho: $u'=0.288$, $v'=0.480$; verde: $u'=0.150$, $v'=0.480$). Utilizamos uma grade senoidal vertical de 3 ciclos por grau de ângulo visual (cpg). Antes de iniciar o teste de sensibilidade ao contraste cromático, o participante realiza uma sessão de *Heterochromatic Flicker Photometry* (HFP) a 20Hz. A tarefa no HFP consiste em equiparar perceptualmente os componentes verde e vermelho da grade

senoidal para que aparentem ter a mesma luminância e para que durante o teste de sensibilidade ao contraste pistas de luminância não venham a influenciar a detecção do estímulo (Mullen, 1985).

Após o HFP o teste de sensibilidade ao contraste era iniciado. O estímulo iniciava com um contraste de 4% e valores de cromaticidade determinados pelo HFP de cada participante. Foi utilizado o método de escolha forçada de 2 intervalos, onde a tarefa do participante era discriminar a grade senoidal do fundo com a cromaticidade média, respondendo em um controle remoto se a grade era apresentada no primeiro ou segundo de dois intervalos de tempo. Uma escada 3 X 1 foi utilizada: o contraste diminuía 20% após três respostas corretas consecutivas e aumentava 25% após cada resposta incorreta. O teste termina após seis reversões de resposta e um limiar é calculado como uma média dos valores de cromaticidade do estímulo em cada reversão.

Os métodos utilizados em nossa avaliação de visão de cores são particularmente adequados para um delineamento de medidas repetidas. Costa et al. (2006) demonstrou que o desempenho CCT não sofre um efeito significativo da aprendizagem após repetidas sessões.

3.3.3. Sensibilidade ao contraste acromático

3.3.3.1 Sensibilidade ao contraste para grades senoidais (eletrofisiologia)

Para avaliação eletrofisiológica da sensibilidade ao contraste para grades senoidais, utilizamos a técnica do potencial visual evocado de varredura (PVEv).

O PVEv foi medido com o sistema Power Diva 2.0, um sistema de aquisição e análise de potenciais visuais evocados de estado estável desenvolvido por Norcia e Tyler (1985). Utilizamos também um amplificador Grass modelo 12 com ganho de 50.000 vezes e filtragem analógica das frequências entre 1 e 100Hz. Os registros foram realizados com três eletrodos ativos posicionados em O1, Oz e O2 com referência em Fpz (seguindo o sistema internacional 10-20). Durante o registro, o sinal era filtrado em tempo real a uma taxa de amostragem de 607Hz.

O procedimento experimental e as análises realizadas para o PVEv seguem o proposto pelos trabalhos realizados por Norcia et al. nas últimas décadas (por exemplo: Norcia et al. 1989; Peterzell e Norcia, 1997). Os estímulos testados foram apresentados por 10 segundos em uma varredura que ia de um nível sublimiar de estímulo para um nível supralimiar, sendo que para as grades senoidais o parâmetro modulado era contraste (ver figura 3). O contraste das grades senoidais e o deslocamento das barras no estímulo de Vernier aumentavam em escala logarítmica ao longo da varredura. Para cada estímulo, a varredura era repetida 10 vezes e uma média destes registros foi realizada como uma forma de aumentar a razão sinal ruído das respostas. Os valores de amplitude e fase resultantes foram divididos em 10 segmentos (*epochs*) de um segundo. Para filtrar a amplitude e fase da resposta nos harmônicos relevantes da frequência de apresentação do estímulo, utilizamos o filtro adaptativo e recursivo dos quadrados mínimos (*Recursive Least Squares* – RLS).

Figura 3 - Exemplo de sequência de apresentação de estímulos no potencial visual evocado de varredura.

Os estímulos utilizados em cada condição de sensibilidade ao contraste foram grades senoidais horizontais dinâmicas (6Hz). Ao todo, três estímulos foram testados. Cada estímulo consistia em uma grade senoidal em uma frequência espacial diferente (ver Figura 4). As frequências espaciais empregadas foram de 0,5; 4,0 e 16,0 cpg (ciclos por grau de ângulo visual) com uma luminância média de 141cd/m^2 . As respostas de maior amplitude e que recebem maior ênfase em estudos da área são observadas no segundo harmônico (2F, 12Hz) para sensibilidade ao contraste de grades senoidais. Estas foram as respostas analisadas neste experimento.

Figura 4 - Exemplos de grades senoidais de frequência espacial baixa (à esquerda) e média (à direita).

3.3.3.2 Sensibilidade ao contraste de grades senoidais (psicofísica)

O teste psicofísico de sensibilidade ao contraste para grades senoidais utilizou parâmetros de estímulos compatíveis com aqueles do PVEv. Grades senoidais horizontais dinâmicas (6Hz) nas frequências de 0,5; 4,0 e 16,0 cpg foram apresentadas utilizando um método psicofísico de escolha forçada de duas alternativas espaciais (2AFC). As apresentações de estímulo iniciavam em um nível de contraste supralimiar. Para cada duas respostas corretas consecutivas o valor de contraste diminuía em 15%, enquanto que para cada resposta incorreta o contraste aumentava em 20%. Para cada estímulo, um valor de limiar era calculado como a média dos valores de contraste em 8 reversões de resposta. Este procedimento psicofísico foi adaptado do método proposto por Garcia-Perez, (1998) como fornecendo resultados mais robustos e maior replicabilidade teste-tesete. A sensibilidade ao contraste foi calculada como o inverso do limiar de contraste para cada frequência ($1 / \text{limiar de contraste}$).

3.3.3.3 Pedestal- Δ -Pedestal

O teste PdP utilizado aqui consiste em uma adaptação daquele proposto por Pokorny e Smith (1997) e adaptado por Sun e Swanson (2008). O estímulo utilizado consiste em quatro quadrados (pedestal, $1^\circ \times 1^\circ$) que mudam de luminância em um pulso simultâneo de 200ms, enquanto que por 27ms um dos quadrados assume uma luminância distinta dos outros (estímulo teste). O teste possui duas etapas, uma na qual o estímulo de teste aumenta de luminância em relação aos outros (incremento) e a outra em que o estímulo diminui de luminância (decremento). A tarefa do participante é identificar o estímulo teste em um método psicofísico de escolha forçada com quatro alternativas (4AFC). Os valores de diferença de luminância utilizados (razão entre a luminância do pedestal e do pulso) foram 0,0; 0,018; 0,036; 0,054; 0,18; 0,25 e 0,34. A literatura contemporânea sugere que as respostas aos valores de diferença de luminância entre 0,018 e 0,054 são mediadas principalmente pela via magnocelular, enquanto que as respostas para os valores entre 0,18 e 0,34 são mediadas principalmente pela via Parvocelular (Pokorny e Smith, 1997; Sun et al., 2008). O limiar para cada valor de diferença de luminância foi calculado como uma média dos valores de luminância do estímulo de teste em 14 reversões de resposta. Este procedimento psicofísico foi adaptado do método proposto por Garcia-Perez, (1998) como fornecendo resultados mais robustos e maior replicabilidade teste-
reset.

Figura 5 - Exemplo da apresentação de estímulos no teste Pedestal- Δ -Pedestal (Sun e Swanson, 2008).

3.3.4 Avaliação do campo visual

Os efeitos da ETCC sobre diferentes áreas do campo visual estão sendo avaliados com o campímetro Humphrey Field Analyzer II – 750i (Carl Zeiss Meditec), aparelho que possibilita estimar o limiar de detecção de luminância para até 60° de ângulo visual em cada olho. Os estímulos são apresentados em um estimulador tipo Ganzfeld e suas características dependem do protocolo utilizado. Dois protocolos complementares foram utilizados. No protocolo central 10-2 “branco-branco”, são estimados limiares para a detecção de pontos de luz branca com aproximadamente 0,43° de ângulo visual (4mm² a 30cm do observador, estímulo “mira III”) na região da Fóvea e em outros 52 pontos dos 10° centrais do campo visual. No protocolo 60-4 “branco-branco”, os mesmos estímulos são

apresentados entre 30° e 60° do campo visual. Em ambos os protocolos os estímulos são apresentados por 200ms contra um fundo branco com a luminância média de 10 cd/m². A tarefa do participante consiste em apertar o controle remoto sempre que perceber algum ponto de luz no campo visual, enquanto mantém a fixação em um ponto de referência central no Ganzfeld. A fixação foi controlada por uma câmera de vídeo.

Para a otimização dos resultados e do tempo de testagem, utilizamos o algoritmo SITA padrão (Swedish Interactive Threshold Algorithm) (Sekhar et al., 2000), o qual diminui em 29% a quantidade de estímulos apresentados. Na estimação do limiar para cada ponto testado, o sistema leva em consideração as respostas que vêm sendo dadas para os estímulos adjacentes e a média de sensibilidade de um grupo controle na mesma faixa etária. O sistema também implementa um método de máxima probabilidade de resposta (do inglês *maximum likelihood*) em alguns dos pontos testados como uma forma de avaliação de falsos positivos e falsos negativos (Bengtsson, Olsson, Heijl & Roozén, 1997). Uma câmera de vídeo auxilia na manutenção da fixação dos participantes ao longo do teste.

O método psicofísico utilizado consiste numa adaptação do método “sim e não” com a escada padrão do campímetro Humphrey. Nesta escada, era computada uma resposta “sim” quando o botão era pressionado e uma resposta “não” quando havia omissão de resposta após a estimulação. Os estímulos foram apresentados com uma intensidade inicial de 30dB, e a cada resposta “sim” correta, a sua intensidade diminuía em 2dB, enquanto que para cada omissão de

resposta, a intensidade aumentava em 4dB. Um valor de limiar era computado para cada ponto após duas reversões de resposta.

3.3.5 Acuidade visual de Vernier

A acuidade visual de Vernier foi avaliada com o PVEv. Os métodos utilizados e equipamentos utilizados foram os mesmos utilizados para medir sensibilidade ao contraste, descritos na seção 3.3.3.1. Para avaliar a acuidade de Vernier, utilizamos uma grade quadrada como estímulo. Ao longo da varredura as barras do estímulo iam de um nível de desalinhamento de 0,1 a 7,5 minutos de arco (arcmin), oscilando em uma frequência de 6Hz (ver figura 6). As respostas de maior amplitude e que recebem maior ênfase em estudos da área são observadas no primeiro harmônico (1F, 6Hz) para estímulos de Vernier. Estes foram os parâmetros alterados no experimento.

Figura 6 - Exemplo da apresentação de estímulos de Vernier no PVEv (figura adaptada de Hou et al. 2011)

3.3.6 Desenvolvimento de modelo animal

Três coelhos adultos da linhagem New Zealand White foram testados despertos e com movimentos restritos por uma caixa especial (Figura 7). Potenciais Visuais Evocados (PVE) foram registrados utilizando um fotoestimulador de *flashes* Grass PS33+ a 1Hz posicionado a 12cm do olho direito e um sistema de aquisição de dados Cambridge Electronic Design 1401. A aquisição dos dados e a apresentação de estímulos foi controlada com o *software* Spike 2.0. Cada animal foi submetido a duas sessões de ETCC (uma catódica e uma anódica, 2mA) separadas por uma semana em ordem aleatória. A ETCC foi aplicada através de um eletrodo de retorno na orelha contralateral e quatro

eletrodos esféricos de prata com aproximadamente 1mm cada posicionados eqüidistantes a 2mm do ponto *AP10mm / L7mm*. Tal ponto encontra-se sobre o córtex visual primário esquerdo. Esta montagem de eletrodos é compatível com procedimentos eletrofisiológicos invasivos e mais informações podem ser encontradas em Márquez-Ruiz et al., 2012. Os registros de PVE foram realizados utilizando os mesmos 4 eletrodos esféricos de prata, simultaneamente.

Figura 7 - Animal em caixa de constrição conectado ao aparato de registro eletrofisiológico.

3.4 Procedimentos

Os experimentos apresentados no presente trabalho foram separados em

blocos executados em etapas diferentes. Os experimentos envolvendo visão de cores, visão acromática e campo visual consistem em 3 protocolos distintos apresentados a seguir.

3.4.1 Visão de cores

Em cada sessão os participantes receberam cinco minutos de ETCC, seguidas por 15 minutos de testes de visão de cores sem que a estimulação fosse interrompida. Os testes realizados durante a ETCC foram: contraste cromático com grades senoidais e os protocolos das Elipses e Trivector no Cambridge Colour Test (CCT). Após o fim destes testes o participante era submetido a um Período de 15 minutos de repouso sem ETCC e então repetia o teste Trivector ainda sem a ETCC. Cada participante foi testado em três sessões diferentes separadas por um intervalo uma semana, sendo que em cada sessão um tipo de ETCC (anódica, catódica ou placebo) diferente era aplicado. A ordem das sessões de ETCC assim como a ordem dos testes psicofísicos foi randomizada entre participantes e entre sessões. Ao todo, 15 participantes foram testados nesta etapa.

Figura 8 – Resumo esquemático das sessões de ETCC onde foi testada a visão de cores.

3.4.2 Visão acromática

Nesta etapa, os participantes foram testados com testes psicofísicos e eletrofisiológicos. Testes psicofísicos de sensibilidade ao contraste de grades senoidais e Pedestal- Δ -Pedestal foram aplicados em cada sessão. O potencial visual evocado de varredura (PVEv) foi usado para avaliar a sensibilidade ao contraste para grades senoidais e a acuidade de Vernier. Dificuldades técnicas não permitiram que a ETCC fosse aplicada durante o registro do PVEv. Em cada sessão o participante era testado no PVEv, em seguida recebia 5 minutos de ETCC seguida da aplicação dos testes FSC e PdP sem que a ETCC fosse interrompida. Após 30 minutos de ETCC e testes psicofísicos, a ETCC era interrompida e o mesmo protocolo de PVEv era retestado. Ao todo a sessão dura aproximadamente 1 hora e 15 minutos. Cada participante foi testado em três sessões diferentes separadas por um intervalo uma semana, sendo que em cada sessão um tipo de ETCC (anódica, catódica ou placebo) diferente era aplicado. A ordem das sessões de ETCC assim como a ordem dos testes psicofísicos foi randomizada entre participantes e entre sessões. Ao todo, 17 voluntários saudáveis foram testados nesta etapa.

Figura 9 – Resumo esquemático das sessões de ETCC onde foram realizados testes de visão acromática (sensibilidade ao contraste e acuidade de Vernier)

3.4.3 Campo visual

Em cada sessão o participante realiza a avaliação do campo visual antes da ETCC e repete a avaliação durante a ETCC. A ordem das sessões de ETCC é randomizada entre participantes e a ordem dos testes de campo visual é randomizada entre sessões. Cada participante é testado em três sessões diferentes separadas por um intervalo uma semana, sendo que em cada sessão um tipo de ETCC (anódica, catódica ou placebo) diferente era aplicado. A ordem das sessões de ETCC, assim como a ordem dos testes psicofísicos foi randomizada entre participantes e entre sessões. Ao todo, 15 voluntários foram testados nessa etapa.

Figura 10 – Resumo esquemático das sessões de ETCC onde foram realizados testes de campo visual.

3.4.4 Modelo animal

Cada sessão experimental consistia em 30 minutos de PVE antes da ETCC, 20 minutos de ETCC sem registros eletrofisiológicos e 60 minutos de PVE pós-ETCC. Baterias de 20 *flashes* a 1Hz eram apresentadas a cada 2 minutos durante toda a sessão. Três coelhos albinos foram testados nesta etapa.

Figura 11 – Resumo esquemático das sessões de ETCC com modelo animal.

3.5 Análise dos dados

Avaliação da visão de cores: Para as análises dos resultados do Trivector utilizamos três ANOVAs para medidas repetidas com dois fatores intra-sujeitos: ETCC (anódica, catódica e placebo) e Tempo (durante a ETCC e 15 minutos após ETCC). Análises dos outros testes de visão de cores utilizaram ANOVAs para medidas repetidas com apenas um fator intra-sujeitos (ETCC). Sempre que apropriado foram realizadas análises *post-hoc* com o teste Fisher LSD. O tamanho do efeito foi estimado com o Eta parcial ao quadrado (η_p^2) para todas as ANOVAs.

Avaliação da sensibilidade ao contraste acromático psicofísica: Para análise dos dados do Pedestal- Δ -Pedestal realizamos uma ANOVA para medidas repetidas para a etapa de incremento e outra para a etapa de decremento. As ANOVAS possuíam dois fatores intra-sujeito: ETCC (Anódica x Catódica x Placebo) e Via (Magnocelular x Parvocelular). As análises dos resultados do teste psicofísico de sensibilidade ao contraste de grades senoidais foram feitas com uma ANOVA para medidas repetidas com dois fatores intra-sujeitos: ETCC (Anódica x Catódica x Placebo) e Frequência espacial (0,5cpg x 4,0cpg x 16,0cpg).

Potencial visual evocado de Varredura: Como cada condição de PVEv foi medida antes e após ETCC, subtraímos os resultados pré-ETCC dos resultados pós-ETCC para todos os dados analisados (limiares, amplitudes e fases). Para cada resposta de PVEv de cada sujeito, limiares de contraste ou Vernier foram estimados a partir de uma regressão linear dos pontos com alta amplitude de resposta até o ponto de amplitude zero. Consideramos como limiar o valor de contraste ou de alinhamento de Vernier em que a reta cruza a amplitude zero. Para os limiares de contraste medidos com o PVEv realizamos uma ANOVA para medidas repetidas com dois fatores intra-sujeitos: ETCC (Anódica x Catódica x Placebo) e frequência espacial (0,5cpg x 4,0cpg). Para os limiares de Vernier medidos com o PVEv realizamos uma ANOVA para medidas repetidas com o fator intra-sujeitos ETCC (Anódica x Catódica x Placebo). Para analisar as amplitudes das respostas a níveis supralimiais de estímulo do PVEv de contraste, realizamos uma ANOVA para medidas repetidas com dois fatores intra-sujeitos: ETCC (Anódica x Catódica x Placebo) e frequência espacial (0,5cpg x

4,0cpg x 16,0cpg). Utilizamos uma ANOVA para medidas repetidas com o fator intra-sujeitos ETCC (Anódica x Catódica x Placebo) para analisar as amplitudes das respostas a níveis supralimiáres de estímulos de Vernier do PVEv.

Campimetria: Para o protocolo 10-2, os resultados foram divididos em 5 anéis concêntricos (2°, 4°, 6°, 8° e 10°) e a sensibilidade média em cada anel foi calculada. O mesmo procedimento foi utilizado para o protocolo 60-4, porém com 4 vários anéis concêntricos (30°, 40°, 50° e 60°). Para observar o quanto o desempenho nos testes de campimetria mudou durante a ETCC, dividimos a sensibilidade média em cada anel durante a ETCC pela sensibilidade pré-ETCC. Estes resultados foram submetidos a uma ANOVA para medidas repetidas com 2 fatores principais: tDCS e Anel. Assim, os resultados nos protocolos 10-2 e 60-4 foram analisados juntos.

Para o protocolo 10-2, o Campímetro Humphrey oferece dois índices de variabilidade: *Mean Deviation* (MD) e *Pattern Standard Deviation* (PSD). Para analisar os efeitos da ETCC sobre a variabilidade do campo visual, o valor destes índices medidos durante a ETCC foi dividido pelo valor pré ETCC em cada sessão. Uma ANOVA para medidas repetidas com o fator ETCC foi realizada com os resultados do MD e outra com o PSD.

Sempre que apropriado foram realizadas análises *post-hoc* com o teste LSD de Fisher. O tamanho do efeito foi estimado com o Eta parcial ao quadrado (η_p^2) para todas as ANOVAs.

Experimento com modelo animal: Médias de cada conjunto de 20 *flashes* foram realizadas para cada sessão. Para cada conjunto de flashes, análises da latência e amplitude normalizadas pela linha de base (média da amplitude nos

50ms que antecedem a apresentação do estímulo) foram realizadas para os dois componentes principais do PVE: o maior pico positivo (P1, surge em torno de 25ms após o estímulo) e o maior pico negativo (N1, em torno de 55ms). Realizamos uma análise preliminar de latência e amplitude com ANOVAS para medidas repetidas com dois fatores intra-sujeito: ETCC (anódica x catódica) e tempo (pré-ETCC x 0 a 30 minutos pós-ETCC x 30 a 60 minutos pós-ETCC).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da visão de cores

4.1.1 Limiares de contraste cromático para grades senoidais

Os participantes não reportaram efeitos adversos durante ou após as sessões de ETCC. Não houve efeito significativo da ETCC sobre a limiares de contraste cromático [$F(2, 28)=1,04$, $p=0,36$, $\eta_p^2=0,08$]. Esse resultado sugere que apenas 8% da variação nos limiares de contraste cromático pode ser atribuída à ETCC. Em média os limiares de contraste cromático foram 1,01 ($\pm 0,35$), 1,05 ($\pm 0,33$) e 1,13 ($\pm 0,32$) para a ETCC anódica, catódica ou placebo, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – Resultados para o teste de sensibilidade ao contraste cromático. Nenhuma das comparações alcançou o critério de significância estabelecido (95%). As barras representam as médias e as linhas verticais os erros padrão.

4.1.2 Cambridge Colour Test

A ANOVA não encontrou efeito significativo da ETCC sobre a área média da elipse [$F(2, 28)=1,15$, $p=0,32$, $\eta_p^2=0,07$] ou a razão entre os eixos da elipse [$F(2, 28)=1,43$, $p=0,25$, $\eta_p^2=0,09$] do CCT. A área média da elipse foi de 186,68 ($\pm 35,72$), 175,92 ($\pm 26,88$) e 189,27 ($\pm 36,50$) unidades $u'v' \cdot 10^4$ para ETCC anódica, catódica e placebo, respectivamente (Figura 13). A razão entre os eixos da elipse foi em média 1,48 ($\pm 0,23$), 1,41 ($\pm 0,27$) e 1,54 ($\pm 0,32$) para ETCC anódica, catódica e placebo, respectivamente (Figura 14).

Figura 13 – Área média das elipses de MacAdam medidas com o CCT. Nenhuma das comparações alcançou o critério de significância estabelecido (95%). As barras representam as médias e as linhas verticais os erros padrão.

Figura 14 – Razão média entre os eixos das elipses de MacAdam medidas com o CCT. Nenhuma das comparações alcançou o critério de significância estabelecido (95%). As barras representam as médias e as linhas verticais os erros padrão.

Não houve efeito significativo da estimulação sobre os limiares protan [F(2, 28)=0,66, $p=0,52$, $\eta_p^2=0,04$]. Também não houve interação significativa entre ETCC e Tempo [F(2, 28)=0,73, $p=0,48$, $\eta_p^2=0,04$]. Em média os limiares protan foram 28,20 ($\pm 4,54$), 28,80 ($\pm 3,43$) 26,87 ($\pm 4,64$) unidades $u'v' \cdot 10^4$ para ETCC anódica, catódica e placebo, respectivamente (Figura 15).

Figura 15 – Limiares protan medidos durante e após ETCC. Nenhuma das comparações alcançou o critério de significância estabelecido (95%). As barras representam as médias e as linhas verticais os erros padrão.

Para os limiares deutan a ANOVA encontrou um efeito significativo do fator ETCC [F(2, 28)=1,12, $p=0,33$, $\eta_p^2=0,07$] e uma interação significativa entre ETCC e Tempo [F(2, 28)=5,13, $p=0,01$, $\eta_p^2=0,26$]. O teste *post-hoc* Fisher LSD encontrou diferenças significativas nas comparações ETCC catódica vs. placebo ($p=0,02$) e catódica vs. anódica ($p=0,03$), resultados que sugerem que a ETCC catódica diminui a sensibilidade no eixo deutan (Figura 16). Não houve diferença

significativa na comparação anódica vs. placebo ($p=0,44$, Figura 4A). A comparação catódica vs. pós-catódica foi significativamente diferente ($p<0,001$), sugerindo que a sensibilidade deutan voltou à linha de base após 15 minutos (Figura 16). Os limiares deutan foram em média 27,47 ($\pm 4,69$), 31,60 ($\pm 5,28$) e 27,87 ($\pm 4,31$) unidades $u'v' \times 10^4$ para ETCC anódica, catódica e placebo, respectivamente.

Figura 16 – Limiares deutan medidos durante e após ETCC. As barras representam as médias e as linhas verticais os erros padrão. As comparações significativas são marcadas com as linhas verticais pontilhadas e asteriscos (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Para os limiares tritan a ANOVA encontrou um efeito significativo do fator ETCC [$F(2, 28)=5,76$, $p<0,01$, $\eta_p^2=0,29$] e uma interação significativa entre ETCC e Tempo [$F(2,28)=7,93$, $p<0,01$, $\eta_p^2=0,36$]. O teste *post-hoc* Fisher LSD

encontrou diferenças significativas nas comparações anódica vs. placebo ($p<0,001$), anódica vs. catódica ($p<0,01$), catódica vs. placebo ($p=0,04$) e anódica vs. pós anódica ($p<0,001$). Em média os limiares foram de 32,33 ($\pm 10,75$), 39,33 ($\pm 10,61$) e 46,20 ($\pm 13,92$) unidades $u'v' \times 10^4$ para anódica, catódica e placebo, respectivamente (Figura 17). Os resultados sugerem uma melhora reversível da discriminação tritan pela ETCC anódica e catódica.

Figura 17 – Limiares tritan medidos durante e após ETCC. As barras representam as médias e as linhas verticais os erros padrão. As comparações significativas são marcadas com linhas verticais pontilhadas e asteriscos (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

4.2 Avaliação da sensibilidade ao contraste acromática

4.2.1 Sensibilidade ao contraste de grades senoidais (eletrofisiologia)

Análises preliminares dos resultados do PVEv demonstraram um padrão de resposta semelhante registrados com os eletrodos O1, Oz e O2. Assim, por questões práticas decidimos aplicar as análises estatísticas apenas nos registros do eletrodo Oz.

As análises dos limiares de contraste do PVEv não demonstraram efeito significativo da ETCC [$F_{(2,28)}=0,53$; $p=0,58$; $\eta_p^2=0,03$] ou interação significativa entre ETCC e frequência espacial [$F_{(2,28)}=0,29$; $p=0,74$; $\eta_p^2=0,02$]. Neste caso foi possível avaliar apenas os limiares para 0,5 e 4,0 cpg. A sensibilidade para a frequência de 16cpg é significativamente mais baixa (vide resultados da sensibilidade ao contraste psicofísica, Figura 22) e a razão sinal ruído muitas vezes é baixa, com crescimento não-monotônico de amplitude ao longo da varredura. Por estes motivos, 9 dos 17 participantes apresentaram uma ou mais condições onde o limiar para 16cpg não pôde ser satisfatoriamente estimado com o PVEv. Com uma amostra reduzida em mais de 50% não consideramos adequado analisar os limiares de contraste para esta frequência.

Figura 18: Diferença entre limiares de contraste pré e pós ETCC medidos com o PVEv. As barras verticais representam os desvios padrão das médias.

Ao analisar a amplitude das respostas a níveis supralimiais de contraste não houve um efeito principal significativo da ETCC [$F_{(2,10)}=1,12$; $p=0,34$; $\eta_p^2=0,18$] embora tenha sido encontrada uma interação significativa entre ETCC e frequência espacial [$F_{(4,20)}=9,43$; $p<0,001$; $\eta_p^2=0,65$]. O teste pós-hoc LSD de Fischer encontrou diferenças significativas entre ETCC anódica e placebo para 0,5cpg ($p<0,01$) e ETCC anódica, catódica e placebo para 4cpg ($p<0,05$). ETCC não diferiu significativamente de placebo para 16cpg (todos os $p>0,15$), embora ETCC anódica e catódica tenham diferido entre si significativamente para esta frequência ($p<0,05$). Para uma melhor visualização dos efeitos da ETCC, ver a diferença de amplitude entre as condições pré e pós ETCC (Figura 20).

Figura 19: Amplitudes para respostas de contraste medidas com o PVEv. As barras verticais representam os desvios padrão das médias.

Figura 20: Diferença de amplitude (pós ETCC menos pré ETCC) entre respostas pré e pós ETCC para níveis supralimiares de contraste medidos com o PVEv. As barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Para a fase das respostas a níveis supralimiáres de contraste houve um efeito quase significativo de ETCC [$F(2,10)=3,7$; $p=0,06$; $\eta_p^2=0,42$] e uma interação significativa entre ETCC e frequência espacial [$F(4,20)=3,7$; $p<0,01$; $\eta_p^2=0,53$]. O teste pós-hoc LSD de Fisher encontrou efeitos significativos da ETCC anódica e catódica para 16cpg ($p<0,01$) e apenas para a ETCC catódica em 0,5cpg ($p<0,05$). A ETCC catódica diminuiu a fase para 16cpg e aumentou para 0,5cpg (Figura 21). A ETCC anódica diminuiu a fase para níveis baixos de contraste e aumentou para níveis altos de contraste (Figura 21). A mudança máxima de fase encontrada aqui é correspondente a uma mudança de latência aparente de aproximadamente 4ms.

Figura 21: Diferença de fase pós ETCC (pós ETCC menos pré ETCC) para níveis supralimiais de contraste medidos com o PVEv. As barras verticais representam o desvio padrão das médias.

4.2.2 Sensibilidade ao contraste de grades senoidais (psicofísica)

Figura 22: Resultados para o teste de sensibilidade ao contraste para grades senoidais. As barras verticais representam os erros padrão das médias.

No teste psicofísico de sensibilidade ao contraste para grades senoidais não houve efeito significativo da ETCC [$F_{(2,32)}=0,57$; $p=0,56$; $\eta_p^2=0,03$] ou interação significativa entre ETCC e frequência espacial [$F_{(2,64)}=0,48$; $p=0,74$; $\eta_p^2=0,03$] (Figura 22).

4.2.3 Pedestal- Δ -Pedestal (psicofísica)

Para a etapa de incremento do teste Pedestal- Δ -Pedestal a ANOVA não encontrou um efeito significativo da ETCC [$F_{(6,11)}=0,51$; $p=0,78$; $\eta_p^2=0,21$] ou interação entre ETCC e via [$F_{(6,11)}=1,07$; $p=0,43$, $\eta_p^2=0,27$]. Já para a etapa de decremento do teste Pedestal- Δ -Pedestal, a ANOVA encontrou um efeito significativo da ETCC [$F_{(6,11)}=3,12$; $p<0,05$, $\eta_p^2=0,63$] e uma interação significativa entre ETCC e via [$F_{(6,11)}=4,9$; $p<0,05$, $\eta_p^2=0,72$]. O teste pós-hoc LSD de Fisher demonstrou que a ETCC anódica modulou significativamente apenas os limiares dos estímulos processados pela via magnocelular (Δ -Pedestal entre 0 e 0,054; $p<0,01$). ETCC não teve efeito sobre as respostas processadas pela via parvocelular (Δ -Pedestal entre 0,18 e 0,32; todos os $p>0,39$). Para uma melhor visualização dos efeitos da ETCC, a Figura 24 apresenta apenas os limiares para o segmento magnocelular do teste PdP para decremento de luminância.

Figura 23: Limiares de contraste medidos com o teste Pedestal- Δ -Pedestal. As barras verticais representam os erros padrão das médias.

Figura 24: Limiares para níveis de contraste preferencialmente processados pela via magnocelular no teste Pedestal- Δ -Pedestal para decremento de luminância.

4.3 Acuidade Visual de Vernier (eletrofisiologia)

Análises preliminares dos resultados do PVEv demonstraram um padrão de resposta semelhante registrados com os eletrodos O1, Oz e O2. Assim, por questões práticas decidimos aplicar as análises estatísticas apenas nos registros do eletrodo Oz. Não houve um efeitos significativo de ETCC para os limiares de Vernier medidos com o PVEv [$F_{(2,28)}=0,34$; $p=0,70$; $\eta_p^2=0,02$].

Figura 25: Diferença entre limiares de Vernier pré e pós ETCC medidos com o PVEv. As barras verticais representam os erros padrão das médias.

Houve um efeito significativo da ETCC sobre a amplitude das respostas supralimiais para estímulos de Vernier [$F_{(2,10)}=13,66$; $p<0,01$; $\eta_p^2=0,73$]. O teste pós-hoc LSD de Fisher demonstrou que ETCC anódica e catódica foram significativamente diferentes de placebo (respectivamente $p<0,001$ e $p<0,05$). Não houve efeito significativo da ETCC sobre a fase no segmento supralimiar das respostas para Vernier [$F_{(2,10)}=0,70$; $p=0,51$; $\eta_p^2=0,12$].

Figura 26: Diferença de amplitude entre respostas pré e pós ETCC para níveis supralimiaries de desalinhamento de Vernier medidos com o PVEv.

Figura 27: Diferença de fase entre respostas pré e pós ETCC para níveis supralimiais de desalinhamento de Vernier medidos com o PVEv.

4.4 Campo visual

Não foi encontrado um efeito principal da ETCC sobre a sensibilidade medida com a campimetria [$F_{(2,28)}=1,5$; $p=0,24$; $\eta_p^2=0,09$]. Por outro lado, houve uma interação significativa entre ETCC e Anel de excentricidade [$F_{(16,224)}=2,26$; $p<0,01$; $\eta_p^2=0,13$]. O teste pós-hoc LSD de Fisher demonstrou que o efeito da estimulação anódica foi significativamente diferente da catódica e placebo no anel de excentricidade de 60° ($p<0,01$). A ETCC não apresentou um efeito significativo em nenhuma outra comparação (Figura 28). Ainda, para tentar replicar os resultado de Kraft et al. (2010), comparamos apenas o protocolo 10-2

e as condições durante ETCC entre si. Não houve um efeito significativo da ETCC [$F_{(2,28)}=1,15$; $p=0,32$; $\eta_p^2=0,07$] ou interação entre ETCC e anel [$F_{(8,112)}=0,43$; $p=0,90$; $\eta_p^2=0,02$].

Figura 28: Efeitos da ETCC por anel de excentricidade (em graus de ângulo visual). As barras verticais representam o desvio padrão da média. Comparações estatisticamente significativas marcadas com um asterisco ($p<0,01$).

Não foi encontrado um efeitos significativo da ETCC para o índice de variabilidade MD [$F_{(2,28)}=1,3$; $p=0,28$; $\eta_p^2=0,08$]. Para o índice PSD, foi encontrado um efeito significativo da ETCC [$F_{(2,28)}=3,3$; $p=0,04$; $\eta_p^2=0,19$]. O teste pós-hoc LSD de Fisher demonstrou uma diferença significativa entre ETCC anódica, catódica e placebo ($p<0,05$; Figura 29).

Figura 29: Efeitos da ETCC sobre os índices MD e PSD na campimetria. As barras verticais representam o desvio padrão da média. Comparações estatisticamente significativas marcadas com um asterisco ($p < 0,01$).

4.5 Modelo animal

Para a amplitude do componente P1 a ANOVA mostrou um efeito significativo dos fatores ETCC [$F(1,44)=159,2$; $p < 0,0001$] e Tempo [$F(2,88)=90,74$; $p < 0,0001$], além de uma interação significativa entre ETCC e Tempo [$F(2,88)=154,2$; $p < 0,0001$]. O teste pós hoc Tukey apontou um efeito significativo apenas para a ETCC catódica, tanto para o primeiro como para o segundo intervalo de tempo pós-ETCC ($p < 0,0001$). Para a amplitude do componente N1 a ANOVA apontou um efeito significativo de ETCC [$F(1,44)=11,8$; $p = 0,001$] e Tempo [$F(2,88)=5,57$; $p = 0,005$]. Não houve interação significativa

entre ETCC e Tempo [$F(2,88)=0,73$; $p=0,48$]. O teste pós hoc Tukey não apontou diferenças entre pré e pós ETCC (todos os $p>0,18$).

Figura 30. Resultados médios do animal 2 na sessão de ETCC catódica. A linha em preto representa a resposta pré-ETCC, a azul escura representa uma média dos primeiros 30 minutos pós-ETCC e a azul clara uma média das respostas entre 30 e 60 minutos pós-ETCC.

Figura 31. Resultados médios do animal 2 na sessão de ETCC anódica. A linha em preto representa a resposta pré-ETCC, a vermelho escura representa uma média dos primeiros 30 minutos pós-ETCC e a vermelho clara uma média das respostas entre 30 e 60 minutos pós-ETCC.

Tabela 1. Resultados médios de cada animal normalizados pela condição pré-ETCC.

RAZÃO MÉDIA (PÓS / PRÉ-ETCC)		P1 AMPLITUDE	
		ANÓDICA	CATÓDICA
ANIMAL 1		1,23	4,05
ANIMAL 2		1	2,17
ANIMAL 3		0,86	1,72
		N1 AMPLITUDE	
		ANÓDICA	CATÓDICA
ANIMAL 1		0,91	1,03
ANIMAL 2		1,03	0,88
ANIMAL 3		1,08	1,36
		P1 LATÊNCIA	
		ANÓDICA	CATÓDICA
ANIMAL 1		1,08	1,65
ANIMAL 2		1	1,29
ANIMAL 3		1,03	1,08
		N1 LATÊNCIA	
		ANÓDICA	CATÓDICA
ANIMAL 1		0,93	1,37
ANIMAL 2		1,08	1,16
ANIMAL 3		0,99	1,03

Para a latência do componente P1 a ANOVA mostrou um efeito significativo dos fatores ETCC [$F(1,44)=62,9$; $p<0,0001$] e Tempo [$F(2,88)=74,9$; $p<0,0001$], além de uma interação significativa entre ETCC e Tempo [$F(2,88)=60,67$; $p<0,0001$]. O teste pós hoc Tukey apontou um efeito significativo apenas para a ETCC catódica, tanto para o primeiro como para o segundo intervalo de tempo pós-ETCC ($p<0,0001$). Para a latência do componente N1 a ANOVA mostrou um efeito significativo dos fatores ETCC [$F(1,44)=20,1$; $p<0,0001$] e Tempo [$F(2,88)=30,6$; $p<0,0001$], além de uma interação significativa entre ETCC e Tempo [$F(2,88)=23,8$; $p<0,0001$]. O teste pós hoc Tukey apontou um efeito significativo apenas para a ETCC catódica, tanto para o primeiro como para o segundo intervalo de tempo pós-ETCC ($p<0,0001$).

Figura 32. Gráfico de dispersão para amplitude do componente P1 do animal 3. Cada ponto representa a média de um conjunto de 20 flashes a 1Hz apresentado a cada 2 minuto. A inclinação (*slope*) das retas que descrevem o curso dos efeitos da ETCC também é apresentada.

Figura 33. Gráfico de dispersão para amplitude do componente N1 do animal 3. Cada ponto representa a média de um conjunto de 20 flashes a 1Hz apresentado a cada 2 minuto. A inclinação (*slope*) das retas que descrevem o curso dos efeitos da ETCC também é apresentada.

5 DISCUSSÃO

5.1 Visão de cores

Os principais resultados encontrados foram: (i) ETCC anódica melhorou a discriminação para o azul (eixo tritan) sem afetar a discriminação verde-vermelho (protan-deutan) medida com o CCT e grades senoidais cromáticas; (ii) ETCC catódica teve um efeito distinto sobre a discriminação deutan e tritan, inibindo a

primeira e melhorando a última; (iii) tanto a ETCC anódica quanto a catódica melhoraram a discriminação tritan. Os principais pontos de discussão serão: (i) a possível existência de um efeito de teto (*ceiling effect*) limitando a efetividade da ETCC anódica sobre a discriminação verde-vermelho e (ii) a possibilidade de os resultados mostrarem algum nível de segregação das vias P e K em V1.

Para discutirmos adequadamente os efeitos da ETCC sobre a visão de cores, uma breve revisão da organização das vias retino-corticais envolvidas no processamento cromático se faz necessária. A visão de cores humana é tricromática e se inicia com um processo de comparação da ativação de cones com picos de absorção para comprimentos de onda curtos (cones S), médios (cones M) e longos (cones L), células com sensibilidade máxima para as porções azul, verde e vermelho do espectro visível, respectivamente. Sinais das células ganglionares que combinam sinais dos cones M e L são enviados para a via retino-cortical Parvocellular (P) enquanto que sinais das células ganglionares que combinam sinais dos cones S com uma combinação dos cones L e M são enviados para a via Koniocellular (K). As vias P e K são filogeneticamente distintas e sabe-se que até certo ponto possuem diferenças anatômicas e funcionais significativas (ver Figura 34 para um exemplo no nível da retina). Há bastante informação sobre a organização das projeções P e K entre o núcleo geniculado lateral (NGL) do tálamo e V1 em primatas: os sinais da via P se projetam para a camada $4C\beta$ (com projeções colaterais para a camada 4A e 6) enquanto que os sinais da via K se projetam para as camadas mais superficiais 1, 2, 3 e 4A. Enquanto essa organização laminar das projeções P e K em V1 está bem descrita, métodos contemporâneos não foram capazes de estabelecer um

Figura 34: Esquema de conexões na retina humana. Os fotorreceptores se conectam a células bipolares e ganglionares, dando origem às vias Parvo (células ganglionares *Midget*), Magno (células ganglionares *Parasol*) e Konicelular (células ganglionares biestratificadas). Fonte: Lee (2011).

Alguns resultados encontrados na literatura já sugeriam que a visão de cores pode ser modulada pela montagem de ETCC utilizada. Destacamos aqui o fato de que existem células em V1 moduladas tanto por sinais de cor como de luminância (Horwitz, Chichilnisky & Albright, 2005), há sobreposição do processamento cromático e de formas no córtex (Johnson, Hawken & Shapley, 2001; Sincich & Horton, 2005) e que existe um efeito significativo da ETCC com montagem Oz-Cz sobre o processamento de luminância (Antal et al. 2004a, 2004b, 2004c; Lang et al., 2007; Kraft et al., 2010). Além disso, as pesquisas nos últimos 25 anos vêm sugerindo que V1 é um estágio de grande relevância no processamento cromático e que esta área possui uma relevância bem maior para a visão de cores do que lhe foi atribuída em trabalhos clássicos que discutiam a organização modular do processamento cromático (Shapley e Hawken, 2011).

O posicionamento dos eletrodos sobre os pontos Oz e Cz teve como principal objetivo modular a atividade da área V1, sendo esta a área que se espera encontrar sob o ponto Oz. Posicionar o eletrodo de retorno sobre o ponto Cz é particularmente adequado para o nosso estudo, já que Cz é tradicionalmente utilizado como eletrodo de referência em estudos com Potencial Visual Evocado (por exemplo: Norcia et al., 1989 and Gawne, Osbourne & Risner, 2011) e pulsos de Estimulação Magnética Transcraniana (EMT) sobre Cz não produziram respostas BOLD nas áreas visuais de V1 a V4 (Ruff et al., 2006). Além disso, existem evidências de que respostas para estímulos simples medidas com testes psicofísicos refletem de maneira notável o desempenho das diferentes

vias visuais especializadas originadas na retina (Lee, 2011). Os fatos citados nos últimos parágrafos reforçam que os métodos aqui empregados são adequados para o estudo da organização cortical das vias visuais Parvo e Koniocellular.

5.1.1 Efeitos da ETCC anódica

Os efeitos de maior magnitude encontrados neste experimento foram da ETCC anódica sobre a discriminação tritan. Sessenta por cento dos participantes (9/15) tiveram limiares tritan abaixo de 30×10^4 u'v' durante ETCC anódica. Apenas um participante (6,6% da amostra) teve limiares tritan abaixo de 30×10^4 u'v' durante ETCC placebo. Costa et al. (2006) testaram 36 participantes saudáveis com os mesmo parâmetros utilizados aqui, exceto ETCC. Nenhum participante teve limiares abaixo de 30×10^4 u'v' mesmo após repetidas sessões de teste. Isso mostra que a ETCC anódica reduziu os limiares tritan a níveis que estão abaixo dos valores normativos. Por outro lado a ETCC anódica não teve efeito sobre os limiares protan, deutan e de contraste verde-vermelho. O fato de que os inputs da via koniocelular em V1 são mais superficiais que os da via parvocellular pode ser uma possível explicação para a existência de um efeito anódico exclusivo sobre o eixo tritan. Por outro lado, a presença de efeitos catódicos sobre a discriminação deutan sugere que as correntes da ETCC alcançaram camadas que recebem tanto aferências P como K indistintamente. Aparentemente não há motivos pelos quais a estimulação catódica alcançaria camadas que a anódica não alcançaria.

O fato de que sujeitos saudáveis na faixa etária dos nossos participantes têm desempenho ótimo na discriminação verde-vermelho e que os limiares protan e deutan normalmente são mais baixos que os tritan (Costa et al. 2006, 2007; Feitosa-Santana et al. 2010) pode ser um determinante da ausência de efeito anódico sobre a discriminação verde-vermelho. Estudos que avaliaram o efeito da ETCC sobre a sensibilidade ao contraste acromático em adultos saudáveis sugeriram que um efeito de teto (*ceiling effect*) pode limitar a efetividade da ETCC anódica, pois, a discriminação visual dos participantes estaria limitada por um “teto” fisiológico de desempenho e não poderia ser otimizada pela ETCC (Antal et al., 2001, 2004a; Antal & Paulus, 2008). Também é válido ressaltar que a via K parece ser mais “frágil” que a via P já que defeitos adquiridos de visão de cores geralmente afetam a discriminação azul-amarelo mais intensamente que a discriminação verde-vermelho, fato que pode ser atribuído a diferenças estruturais e funcionais entre as vias (Pokorny et al., 1979; Gobba & Cavalleri, 2003). O esclarecimento dos mecanismos que estariam por trás do possível *ceiling effect* está além do escopo do presente trabalho e esta é uma hipótese que permanece em aberto. Pesquisas anteriores sugerem que este pode ser um efeito real que limita a ação da ETCC sobre o sistema visual de voluntários saudáveis (Antal et al., 2001, 2003, 2004a; Antal & Paulus, 2008).

5.1.2 Efeitos da ETCC catódica

A ETCC catódica geralmente leva à inibição do desempenho mediado pela área estimulada (como ocorreu aqui no caso da discriminação deutan), mas em

alguns casos (como nos resultados para a discriminação tritan), especialmente envolvendo tarefas de discriminação em contexto de ruído, a estimulação catódica pode melhorar o desempenho na tarefa (Antal et al., 2004c). Antal e Paulus (2008) sugerem que a ETCC catódica pode ter um efeito distinto sobre o processamento do ruído e do alvo. A estimulação catódica diminuiria o nível geral de ativação da área, tendo um efeito mais marcante sobre as células que processam o ruído e estão pouco integradas entre si, pois estas células teriam um padrão de ativação mais difuso que aquelas que processam o alvo. Este processo aumentaria a razão sinal ruído e com isso, melhoraria o desempenho na tarefa. Apesar de esta ser uma hipótese plausível, ela não explica o motivo pelo qual a ETCC catódica teve um efeito contrário sobre a discriminação deutan e tritan. Diferenças entre as vias P e K em vários níveis podem ser determinantes deste efeito contrário e ainda estão por ser estudadas. Apesar de não podermos afirmar com certeza qual o mecanismo por trás do eventual efeito excitatório da ETCC catódica, o presente trabalho acrescenta informação relevante à literatura da ETCC mostrando um raro efeito excitatório de correntes anódicas e catódicas na mesma tarefa.

5.1.3 Efeitos específicos sobre as vias P e K

Para discutirmos melhor a existência de diferenças qualitativas entre os efeitos da ETCC catódica sobre a discriminação tritan e deutan é necessário considerar a existência de diferenças funcionais, biofísicas e de conectividade entre as células P e K envolvidas no processamento cromático em V1. Enquanto

as células P e K do NGL agem de forma bastante linear quando combinando o *input* dos cones, muitos neurônios envolvidos no processamento cromático em V1 respondem de maneira não linear e algumas dessas células são influenciadas por sinais de luminância (Hanazawa, Komatsu & Murakami, 2000; Wachtler, Sejnowski & Albright, 2003; Horwitz, Chichilnisky & Albright, 2005). De Valois et al (2000) sugerem que aproximadamente 50% das células de V1 apresentam algum tipo de não linearidade em suas respostas a estímulos cromáticos. As vias P e K não diferem apenas funcionalmente e anatomicamente mas também em filogênese, com as células da via K sendo significativamente mais antigas (Lee, 2011). Já que existem diferenças claras entre as vias P e K, é possível que existam diferenças morfológicas e no nível biofísico que possam ser determinantes para os efeitos da ETCC. Existem diferenças morfológicas e biofísicas entre as vias P e K no nível dos fotorreceptores, células ganglionares e bipolares na retina, além do NGL. Existem também diferenças morfológicas entre parte das células em V1 que recebem *inputs* Parvo e Magnocellular (Sincich & Horton, 2005) e em princípio diferentes tipos de células podem ser afetados de maneira distinta pela ETCC (Stagg & Nitsche, 2011).

Por outro lado, a existência de diferenças biofísicas e a extensão das diferenças morfológicas entre as células em V1 que recebem aferências P e K ainda não é clara (Hendry & Reid, 2000; Shostak et al., 2002; Casagrande et al., 2007) e não há como saber ao certo se estas diferenças poderiam ajudar a explicar os efeitos distintos da ETCC catódica sobre a discriminação deutan e tritan. De acordo com Shostak et al. (2002), as diferenças morfológicas entre as projeções P e K do NGL a V1 parecem estar limitadas aos tamanhos dos

terminais axônicos e a principal diferença entre as vias parece ser de conectividade. Estas diferenças morfológicas não podem explicar plenamente os efeitos diferenciais da ETCC catódica. É provável que os inputs P e K difiram principalmente em conectividade já que existem diversas etapas de codificação sensorial entre os fotoreceptores e V1 e diferenças no nível biofísico são encontradas mais provavelmente no nível da retina e do NGL (Shostak et al., 2002; Sincich & Horton, 2005).

Está claro que a ETCC não é focal ou específica o suficiente para permitir conclusões definitivas sobre a natureza da modulação reportada aqui. Esta limitação não anula o fato de que os resultados aqui apresentados acrescentam informações relevantes sobre a organização das vias P e K em V1 e sobre os efeitos da ETCC sobre o processamento visual. Os resultados sugerem uma segregação funcional entre as vias P e K em V1 e sugerem que estas vias não se misturam completamente neste nível. Se as células que codificam informação cromática em V1 se organizassem de maneiras arbitrárias, sem respeitar a distinção entre as vias P e K (Sincich & Horton, 2005; Conway et al., 2010), a ETCC sobre V1 deveria afetar a discriminação protan, deutan e tritan de maneira semelhante. Nossos resultados apontam para uma direção diferente. A ausência de efeitos da ETCC anódica sobre a discriminação verde-vermelho pode ser explicada por um *ceilling effect* (que também refletiria diferenças funcionais entre as vias P e K em V1). A diferença qualitativa do efeito da ETCC catódica sobre a discriminação tritan e deutan pode ser explicada por diferenças morfológicas, biofísicas ou de conectividade e os resultados aqui apresentados sugerem a existência de uma segregação de vias em algum desses níveis. O presente

trabalho mostra que a ETCC pode afetar o processamento sensorial com especificidade de vias e é uma ferramenta adequada para explorar a organização cortical de funções sensoriais.

5.1.4 Duração dos efeitos encontrados

Os efeitos da ETCC voltaram para a linha de base após 15 minutos do fim da estimulação, resultado que está de acordo com a noção de que a duração dos efeitos da ETCC sobre a função sensorial é mais limitada do que sobre o desempenho motor (Antal & Paulus, 2008). Além disso, apenas uma sessão de ETCC para cada direção de corrente foi realizada para cada participante. A literatura sugere que múltiplas sessões são necessárias para alcançar efeitos estáveis e duradouros da ETCC (Zaghi et al., 2010; Brunoni et al., 2011). Trabalhos futuros investigando os efeitos da ETCC sobre a percepção de cores devem tentar estabelecer os parâmetros necessários para alcançar efeitos mais duradouros. Por outro lado, induzir efeitos duradouros sobre a visão de cores de voluntários saudáveis é controverso. Ao mesmo tempo, os nossos resultados abrem uma avenida para novas investigações. Estudos futuros podem abordar os efeitos da ETCC em pacientes com defeitos de visão de cores, tanto em termos de efeitos agudos como de efeitos duradouros.

5.1.5 Conclusão parcial

Nossos resultados mostraram que ETCC pode modular a visão de cores de forma robusta e com especificidade de vias, modulando a discriminação de cores para níveis que estão além dos resultados normativos de adultos saudáveis. Isso sugere que a ETCC pode vir a gerar resultados positivos se usada para a reabilitação da visão de cores. Os efeitos distintos da ETCC sobre a discriminação protan, deutan e tritan ilustram que a ETCC é uma técnica eficiente para o estudo do processamento visual. A existência de diferenças qualitativas no efeito da ETCC sobre a discriminação deutan e tritan sugere a existência de algum nível de segregação das vias P e K em V1, resultado que acrescenta informações relevantes ao debate sobre a integração de sinais P e K no córtex visual. Pesquisas futuras devem utilizar ETCC sobre outras áreas visuais envolvidas no processamento de cores. Pesquisas que combinem tarefas de discriminação visual e ETCC de áreas visuais devem passar a considerar os parâmetros cromáticos dos estímulos como possíveis fatores de confusão. Os resultados apresentados aqui reforçam a adequação dos métodos utilizados e a relevância da investigação proposta.

5.2 Sensibilidade ao contraste acromático

Os principais resultados encontrados sobre esta função visual foram: (i) efeito da ETCC apenas sobre estímulos processados preferencialmente pela via magnocelular no teste Pedestal- Δ -Pedestal; (ii) efeito diferencial da ETCC sobre diferentes frequências espaciais para amplitude e fase em resposta a níveis supralimiáres de estímulo no PVEv; (iii) ausência de efeitos da ETCC sobre os

limiares de contraste medidos com o PVEv; (iv) ausência de efeitos significativos da ETCC sobre a sensibilidade ao contraste de grades senoidais medida com métodos psicofísicos.

Para uma discussão plena destes resultados, uma breve revisão da organização das vias retino-corticais que processam luminância se faz necessária. A distinção entre as vias Parvocellular (P) e Magnocellular (M) ocorre muito claramente no nível da retina. Ali, diferentes fotorreceptores convergem nas células ganglionares tipo *Midget* para formar a via P e nas células ganglionares tipo *Parasol* para formar a via M (ver Figura 34). Ambos os tipos de células possuem campos receptivos circularmente concêntricos com opondência funcional entre o centro e a periferia. Neste contexto, há dois grupos de células no que diz respeito à organização do campo receptivo: células de centro ON e células de centro OFF. As células ON são excitadas quando estimuladas por luz no centro de seu campo receptivo e inibidas quando estimuladas na periferia. O oposto é verdade para as células de centro OFF. Destas células se originam vias que sinalizam incrementos (via ON) e decrementos (via OFF) de luminância e estas se mantêm segregadas no núcleo geniculado lateral do tálamo e se integram no córtex visual primário em células de opondência dupla. Embora a integração de vias ON e OFF no nível de V1 seja bem descrita, é importante ressaltar que limiares para incrementos e decrementos de luminância tendem a ser diferentes e que a polaridade de contraste pode afetar diferentes ilusões visuais. Isto implica que existem diferenças funcionais entre as vias ON e OFF (para uma revisão sobre vias ON e OFF ver: Westheimer, 2007).

As projeções das vias M e P também se mantêm segregadas no nível do Núcleo Geniculado Lateral, com a via M projetada para as camadas 1 e 2 e a via P projetada para camadas 3-6. Então, a via M se projeta principalmente para as camadas 4C α e 4b, e a via P para 4C β , 2 e 3 no cortex visual primário. As vias M e P possuem não só diferenças estruturais como também funcionais. A via M possui alto ganho de contraste e processa preferencialmente frequências espaciais baixas. Por outro lado, a via P possui baixo ganho de contraste e processa preferencialmente frequências espaciais altas (Figura 35). As células na via M tendem a apresentar uma resposta transiente e de rápida adaptação, enquanto que na via P as células apresentam respostas sustentada e de adaptação lenta. As células nas duas vias também diferem no que diz respeito à linearidade da somação espacial e temporal de seus inputs (capacidade de integrar diferentes aferências). Geralmente as aferências são integradas linearmente, embora um grande número de células na via M realizem uma somação não-linear de seus inputs. Embora o nível de segregação funcional das vias M e P em V1 seja um tema de debate, é sabido que diferentes células nesta área estão afinadas para diferentes frequências espaciais e diferentes níveis de contraste (DeValois et al. 1982; Alisson et al. 2000; Lennie & Movshon, 2005). Para uma revisão sobre vias visuais retino-corticais ver Kaplan (2004) Lee (2011) e Calaway (2005).

Figure 35: Ganho de contraste de luminância para células M e P. Respostas medidas no Núcleo Geniculado Lateral (Fonte: Kaplan e Shapley, 1986).

5.2.1 Efeitos da ETCC sobre a via M

Houve um efeito da ETCC anódica exclusivamente sobre os limiares para decremento de luminância no teste do pedestal. Os efeitos foram significativos apenas sobre os níveis de contraste preferencialmente processados pela via magnocelular (ver Figura 24). Estes resultados estão de acordo com os efeitos via-específicos observados na ETCC da visão de cores, embora aqui os efeitos da estimulação anódica tenham sido inibitórios. Embora saibamos que as vias M e P se projetam para diferentes camadas em V1 (Sincich & Horton, 2005) e que a densidade de corrente muda enquanto trafega entre os eletrodos (Miranda et al. 2006), não é possível explicar os efeitos exclusivos sobre a via M apenas por uma diferença de camadas. A distância microscópica entre as camadas e o tamanho dos eletrodos se juntam contra esta hipótese. É mais provável que este efeito possa ser explicado por diferenças funcionais entre as vias P e M.

Como dito anteriormente, há diferenças de dinâmica de adaptação, ganho de contraste e linearidade do processamento entre as duas vias. Os efeitos da ETCC anódica e catódica também diferem entre si no que diz respeito aos sistemas de neurotransmissores envolvidos (ver Seção 1.1). Assim, é provável que o processamento na via M seja mais sensível ao efeito da ETCC e que uma destas diferenças funcionais e bioquímicas seja responsável por este fenômeno. Uma melhor compreensão desses efeitos é possível quando levarmos em consideração os diferentes testes realizados e será apresentada nas sessões a seguir.

O fato de que os efeitos em testes psicofísicos surgiram apenas no teste para decremento de luminância são de difícil interpretação. Um fato notável é que a sensibilidade para decrementos de luminância tende a ser mais baixa que para incrementos de luminância (Westheimer, 2007). Assim, a estimulação anódica afetou apenas as repostas nos pontos de sensibilidade mais baixa medidos com o teste do Pedestal. Algo semelhante também ocorreu nos testes de visão de cores. A estimulação anódica afetou apenas os limiares Tritan, eixo onde a sensibilidade tende a ser mais baixa (ver Figura 17). Este resultado ilustra a necessidade da escolha cuidadosa dos parâmetros dos testes e estímulos usados para medir efeitos da ETCC. Os resultados aqui apresentados seriam radicalmente distintos se apenas o decremento ou apenas o incremento de luminância fosse testado no teste do pedestal.

5.2.2 Efeitos opostos da ETCC sobre diferentes frequências espaciais

Os efeitos da ETCC sobre a amplitude e fase das respostas a níveis supralimiares de contraste apresentaram uma complexidade semelhante à observada na visão de cores. A estimulação catódica aumentou a amplitude da resposta para 0,5cpg e diminuiu para 4,0cpg. O efeito oposto foi encontrado para a estimulação anódica. No caso da fase, a estimulação catódica aumentou o atraso de fase para 0,5cpg e diminuiu para 16cpg. Estes efeitos opostos podem ser explicados pela combinação de três fatores: diferenças funcionais nas vias retino-corticais e diferentes grupos de células em V1, diferenças estruturais entre estes diferentes grupos de células e um possível efeito diferencial da ETCC para diferentes níveis de ativação da área estimulada.

Está bem descrito que uma corrente elétrica pode ter efeitos opostos sobre a polarização de diferentes neurônios se seus axônios estiverem orientados de maneira oposta em relação ao fluxo da corrente (Kabakov et al. 2012; Bikson & Rahman, 2013). A orientação dos dendritos pode influenciar a magnitude deste efeito, mas não sua polaridade (Kabakov et al., 2012). Embora a segregação entre vias seja clara até as primeiras sinapses em V1, como as vias M e P interagem nesse ponto é motivo de debate na neurociência contemporânea. Também não está claro como células com diferente afinação para frequências espaciais se organizam do ponto de vista anatômico em V1. Apesar disso, se considerarmos a baixa focalidade da ETCC e a complexidade estrutural do córtex com seus sulcos e convoluções, é plausível a hipótese de que em alguns pontos, a corrente da ETCC atingirá diferentes grupos de células em direções opostas.

Propomos que este fenômeno determina ao menos parte dos efeitos opostos observados aqui. Neste ponto, ainda não é possível discutir plenamente se diferenças funcionais podem ser responsáveis por estes efeitos e uma discussão mais aprofundada será apresentada a seguir (ver Seções 5.2.3 e 5.6).

5.2.3 Efeitos da ETCC sobre a fase do PVE

O fato de que a ETCC teve um efeito sobre a fase do PVE merece destaque. A estimulação catódica aumentou o atraso de fase para 0,5 e diminuiu o atraso para 16cpg. Estas mudanças corresponderam a uma alteração de latência aparente de aproximadamente 4ms. Esta é uma demonstração robusta de que a ETCC pode afetar a dinâmica temporal do processamento de luminância no córtex. É ainda mais uma demonstração de que a ETCC pode afetar de maneira oposta diferentes grupos de células no córtex visual.

Alterações de fase refletem alterações de latência, que neste caso (por não haver mudanças estruturais que justifiquem um atraso de latência) parecem sugerir alterações no processo de somação temporal do sistema visual. Somação temporal é o processo pelo qual potenciais sinápticos consecutivos são integrados e transformados em potenciais pós-sinápticos (Kandel e Spiegelman, 2001). Como dito anteriormente, diferentes vias visuais são formadas por células com diferentes dinâmicas de resposta. É sabido ainda que o processamento de frequências espaciais baixas tem latência mais curta que para frequências espaciais altas, fenômeno que reflete a diferente dinâmica temporal das vias

retinocorticais M e P (Mitov e Totev, 2005). Assim, os diferentes efeitos da estimulação catódica sobre a fase de resposta para 0,5 e 16cpg parecem ser determinados pela diferente dinâmica temporal do processamento mediado por estes dois grupos de células.

A existência de efeitos da ETCC sobre a fase das respostas do PVE e o fato de que estes efeitos foram opostos para diferentes grupos de células sugere uma importante repercussão funcional da ETCC sobre o sistema visual. É possível que a ETCC afete a somação espacial e/ou temporal das células estimuladas. Até o momento, os trabalhos que avaliaram os efeitos da ETCC sobre a sensibilidade ao contraste com PVE não reportaram alterações de latência (Antal et al., 2004a; Accornero et al., 2007). Por outro lado, estes autores utilizaram apenas 4,0 cpg como estímulo e aqui não foram constatadas alterações de latência para esta frequência também. Este resultado chama a atenção para a necessidade de avaliar os efeitos da ETCC com testes que sejam sensíveis à atividade de diferentes grupos de células envolvidas na área / função estudada.

O aumento de fase (equivalente a atraso de latência) para a frequência de 0,5cpg também foi acompanhado por um aumento de amplitude (ver Figuras 20 e 21). Sugerimos aqui que esta lentificação da resposta reflete a lentificação da somação temporal das células e que este processo mais lento de somação pode ter levado a um aumento de amplitude de resposta.

Os efeitos da ETCC sobre a fase das respostas chamam a atenção também para a necessidade do desenvolvimento de novos estudos que avaliem como a ETCC pode afetar a somação temporal nas células estimuladas. Também

chama atenção para uma possível interpretação de efeitos da ETCC sobre o tempo de reação em termos de mudanças de somação temporal. A alteração da latência do PVE por ETCC catódica no modelo animal apresentado aqui (Seção 5.5) também reforça a relevância desses achados. Assim, estes resultados abrem uma avenida para novos estudos e um outro nível de análise dos efeitos da ETCC.

5.2.4 Efeitos da ETCC dependentes de contraste

Há uma quantidade significativa de demonstrações com testes comportamentais de como as vias M e P diferem em termos de adaptação (por exemplo: Pokorny e Smith 1997, Smith et al. 2001). Alguns autores também sugerem que a resposta para diferentes níveis de contraste é mediada em grande parte por vias retinocorticais diferentes (por exemplo: Souza et al. 2007; Skotun, 2014). Aqui, os únicos efeitos da ETCC sobre limiares de contraste de luminância foram observados para os baixos níveis de contraste no teste do pedestal. No caso do PVE, a maior parte dos efeitos observados foi sobre níveis baixos e intermediários de contraste (ver Figuras 20 e 21). Assim, parece haver uma dependência de contraste nos efeitos da ETCC sobre o sistema visual, e este fenômeno parece ser indicativo de um efeito específico da ETCC sobre diferentes vias no sistema visual.

É possível ainda que efeitos diferentes em diferentes níveis de contraste reflitam uma dependência dos efeitos da ETCC pelo nível de ativação da área estimulada. Bikson e Rahman (2013) sugerem que a seletividade da ETCC pode

dependem de diferentes fatores, mas que um dos mais importantes é o estado de ativação da área estimulada no momento da estimulação. Há evidências que demonstram que no nível celular, estimulação por corrente contínua aumenta a plasticidade em uma via apenas se as células forem estimuladas em sua frequência ótima (Fritsch et al., 2010). Há também casos em que os efeitos da ETCC sobre o desempenho em uma tarefa vão depender da dificuldade da tarefa, e o desempenho em tarefas fáceis não será modulado (Por exemplo, Jones e Berryhill, 2012; Sandrini et al. 2012). Ainda, Antal et al (2004a) encontraram efeitos significativos da ETCC apenas para o nível intermediário de contraste medido com o PVE. Os argumentos acima podem ajudar a compreender porque a ETCC pode não ter afetado os limiares de contraste para grades e porque os efeitos parecem menos robustos em altos níveis de contraste.

Assim, nossos resultados sugerem que é possível que a ETCC tenha menos efeitos sobre o desempenho visual para estímulos em altos níveis de contraste. Isto é proposto pelos resultados do teste do Pedestal e em alguns resultados do PVEv (como para a latência em 16cpG). Como pode ser observado na literatura da área e nos resultados brutos para o PVEv, níveis altos de contraste levam a uma amplitude de resposta maior, e muitas vezes há uma saturação desta resposta (Figura 19). Assim, é possível que haja mais uma vez um efeito de teto limitando a modulação da resposta para níveis altos de contraste.

5.2.5 Relação com resultados da literatura

Os resultados apresentados aqui replicam parcialmente estudos anteriores. Um aumento da amplitude do componente P100 do PVE por ETCC catódica foi observado em Accornero et al. (2007) e Antal et al. (2004a). Ambos os autores avaliaram apenas a frequência de 4cpG e utilizaram PVE transiente, medindo apenas poucos níveis de contraste. Aqui, o efeito da estimulação catódica sobre 4cpG foi inibitório. É possível ainda que o efeito de aumento de amplitude do componente P100 por ETCC catódica reflita na verdade um processo inibitório. Zemon et al. (1980) propuseram que o componente positivo tardio do PVE é mediado por GABA.

Efeitos da ETCC dependentes de contraste também foram observados por Antal et al. (2004a). Estes autores constataram efeitos significativos da ETCC apenas para as respostas em 50% de contraste. Por outro lado, Antal et al. mediram apenas respostas para 50% e 100% de contraste. Os resultados encontrados por estes autores reforçam que em níveis muito altos de contrastes os efeitos da ETCC podem ser limitados por um efeito de teto. Aqui, medimos limiares de contraste e repostas a vários níveis supralimiais de contraste com métodos psicofísicos e eletrofisiológicos na mesma amostra. Nossos resultados reforçam os achados anteriores nesse sentido.

A ausência de efeitos da ETCC sobre os limiares de contraste medidos com a psicofísica merecem destaque. Antal et al. (2001) encontraram um pequeno efeito da estimulação catódica sobre os limiares para 4 cpG que não foi constatado aqui por psicofísica ou eletrofisiologia. O método psicofísico do ajuste

empregado por Antal et al. pode ter sido responsável por este efeito. Existe a noção de que há uma replicabilidade mais baixa de resultados do método psicofísico do ajuste e um maior efeito do critério de resposta quando comparado ao método da escolha forçada utilizado aqui (Higgins et al. 1988). Assim, é possível que o efeito encontrado com o método do ajuste reflita na verdade um efeito da ETCC sobre o critério de resposta dos participantes (Laming et al. 2013, Turner et al. 1994). Este é mais um exemplo de que iniciativas de replicação devem ser estimuladas na pesquisa em ETCC e que a escolha dos métodos de avaliação dos efeitos da ETCC é um passo crítico do delineamento destas pesquisa e deve ser sempre enfatizado.

5.2.6 Conclusões parciais

A existência de efeitos da ETCC sobre a amplitude e fase de resposta a níveis supralimiais de estímulo e a ausência de efeitos da ETCC sobre limiares medidos com o PVEv sugerem que em alguns casos, medir limiares pode não ser a abordagem mais sensível para avaliar os efeitos da ETCC. Aqui, a ausência de alterações para os limiares de contraste para grades senoidais pôde ser observada com métodos eletrofisiológicos e psicofísicos, fato que sugere que este seja um efeito robusto. Por outro lado, trabalhos reportam alterações induzidas por ETCC nos limiares em diferentes domínios sensoriais e tarefas (por exemplo: Costa et al. 2012; Antal et al. 2001; Ladeira et al., 2011). Assim, sugerimos aqui que avaliar os efeitos da ETCC sobre níveis limiares e

supralimiars de estímulo nos mesmos pacientes e dentro do mesmo protocolo de pesquisa pode revelar efeitos relevantes.

Ainda, os efeitos opostos da ETCC sobre diferentes grupos de células foram observados aqui tanto para a amplitude como para fase das respostas. Se levamos em consideração também os efeitos via-específicos da ETCC sobre a visão de cores, estes resultados sugerem que a ETCC pode revelar diferenças estruturais e funcionais de grupos de células na área estimulada de maneira robusta. Sugere também que a estimulação pode ter um efeito sobre a somação temporal das respostas na área estimulada, apontando a necessidade de novas pesquisas neste tema. Este tópico será discutido em mais detalhes na Seção 5.6.

5.3 Acuidade de Vernier

Os principais efeitos encontrados sobre a acuidade de Vernier foram (i) ausência de efeitos da ETCC sobre os limiars de Vernier medidos com o PVEv; (ii) efeito significativo da ETCC para níveis supralimiars de estímulo e (iii) tanto a ETCC anódica quanto catódica diminuíram a amplitude de resposta para estímulos de Vernier.

A acuidade visual de Vernier é um tipo de hiperacuidade quase completamente determinada no nível cortical, sofrendo menos limitações de fatores óticos ou estruturais da retina que as acuidades para optotipos ou grades (Norcia et al., 1999). Por este motivo, julgamos que esta seria a modalidade de acuidade visual mais apropriada para avaliar os efeitos da ETCC sobre a acuidade visual, havendo a possibilidade de realizar uma modulação excitatória e

inibitória sem a limitação de fatores estruturais. Por outro lado, o que encontramos foi um efeito inibitório significativo tanto da ETCC anódica quanto catódica (Figura 26).

É possível que este efeito inibitório de ambas as correntes de ETCC sobre a resposta a Vernier reflita o ajuste fino do processamento cortical desta acuidade visual. Apesar de os limiares não terem sido afetados significativamente, o que parece ser refletido pelos nossos resultados é que qualquer nível de modulação não-invasiva de V1 produz um efeito inibitório sobre a acuidade visual de Vernier. Novas pesquisas precisam ser realizadas para compreender melhor como a ETCC afeta a acuidade visual. Para tal, métodos psicofísicos também precisarão ser empregados.

5.4 Campimetria

Os principais resultados encontrados nesta etapa foram: (i) a ETCC não teve efeito significativo sobre a sensibilidade na visão central, (ii) ETCC anódica levou a um aumento significativo de sensibilidade no anel de excentricidade mais externo medido aqui e (iii) a ETCC afetou o índice PSD de variabilidade do campo visual.

Para uma discussão plena destes resultados é importante uma breve revisão da organização retinotópica do sistema visual. Na retina, há uma clara distinção entre seu centro e sua periferia no que diz respeito à densidade de fotorreceptores. A densidade de cones diminui drasticamente em direção à periferia, e no ponto mais central da fóvea (a fovéola) não existem bastonetes (Provis et al. 2013). Esta diferença entre centro e periferia do campo visual

também pode ser observada em V1, onde uma pequena porção do campo visual central é representada em uma grande porção do córtex visual (ver Figura 36). É importante observar também que estas diferenças anatômicas e fisiológicas têm implicações comportamentais bem descritas. A acuidade visual e discriminação de cores diminuem muito na periferia do campo visual. Por outro lado, a sensibilidade a oscilações de contraste no domínio temporal aumenta na periferia.

Figura 36: Esquema da representação do campo visual em V1. A pequena área da fovea é representada em uma grande área no córtex, enquanto que a periferia do campo visual (área mais extensa em termos de graus de ângulo visual) possui menor representação cortical. Fonte: Wurtz e Kandel (2000).

5.4.1 Efeitos da estimulação anódica

Notavelmente houve apenas um efeito significativo da estimulação anódica sobre a sensibilidade no anel de maior excentricidade medido aqui (60° , Figura 28). É importante ressaltar também que esta é a área de menor sensibilidade medida aqui. Este é também um resultado notável já que os pontos de maior excentricidade do campo visual são processados em áreas mais distantes da superfície de V1, enquanto que o campo visual central (onde não houve efeito) é processada em áreas mais superficiais de V1 e assim, estariam mais próximas dos eletrodos de ETCC e receberiam a maior densidade de corrente (Miranda et al. 2006). Kraft et al. (2010) chegaram a sugerir que por este motivo, a ETCC não seria capaz de induzir mudanças na sensibilidade da periferia do campo visual. Os resultados apresentados aqui demonstram o contrário.

É possível que a ausência de efeitos no campo visual central (área de maior sensibilidade) tenha sido determinada por um efeito de teto, assim como discutido nos resultados de visão de cores e contraste. A ausência de efeitos no campo visual central também não replica resultados anteriores por Kraft et al. (2010). Uma discussão das diferenças entre estes resultados será apresentada na Seção 5.4.3.

A presença de efeitos da estimulação anódica apenas nas áreas de menor sensibilidade medidas aqui está de acordo com tendências observadas nos resultados para visão de cores (efeitos encontrados apenas no eixo tritan) e sensibilidade ao contraste no teste do pedestal (efeitos encontrados apenas para baixos níveis de contraste no protocolo de decremento de luminância). Um

discussão das semelhanças e possíveis explicações para estes efeitos será apresentada na Seção 5.6.

5.4.2 Efeitos sobre o PSD e aprendizagem perceptual

Os índices MD e PSD são calculados pelo campímetro Humphrey a partir de um banco de normas ajustadas para idade do participante (Wani, Mir & Nasti, 2005). O valor de MD é um indicativo do quanto o formato da ilha de visão do participante desvia do modelo de ilha de visão normal. Este escore é mais sensível a variações difusas de sensibilidade, enquanto que é pouco afetado por variações localizadas no campo visual. Já o valor de PSD é pouco afetado por variação difusa, sendo um bom indicativo de alterações localizadas. Tal índice é calculado a partir da diferença entre a sensibilidade do participante e a sensibilidade média normal para cada ponto testado (Papp et al., 2001).

Houve um aumento do PSD em relação à linha de base na condição em que os participantes receberam ETCC placebo. Este efeito de variabilidade pode ser considerado normal, já que efeitos de aprendizagem no campímetro Humphrey são bem descritos e é esperado que duas avaliações consecutivas tenham resultados um pouco diferentes (Heijl et al. 1989). Inclusive, este foi um dos motivos pelos quais realizamos uma avaliação como linha de base em cada sessão de ETCC. Ao contrário do que vimos na condição placebo, o PSD não foi alterado significativamente entre as linhas de base e as condições com ETCC anódica ou catódica (ver Figura 29). Propomos aqui que este efeito pode refletir

uma influência da ETCC sobre V1 na aprendizagem perceptual, de acordo com as hipótese levantadas por Peters et al. (2013).

Peters et al. (2013) aplicaram uma tarefa de detecção de contraste em um grupo de voluntários saudáveis por dois dias consecutivos. Houve uma melhora no desempenho entre o primeiro e segundo dia nas condições em que os participantes receberam ETCC placebo. Por outro lado, os participante que receberam ETCC anódica sobre V1 não apresentaram esta melhora. A ETCC catódica não apresentou resultados. Os autores sugerem que a ETCC anódica bloqueou o processo de aprendizagem perceptual que ocorre entre os dois dias de teste. Aqui, um efeito semelhante pode ter ocorrido, porém em um período de tempo muito menor. É importante ressaltar também que este possível efeito sobre a aprendizagem perceptual foi demonstrado em uma tarefa realizada durante a estimulação. No caso de Peters et al. este efeito foi demonstrado um dia após a estimulação. Usando o campímetro Humphrey e o mesmo protocolo aqui testado, Kraft et al. (2010) também encontraram resultados sugestivos de um bloqueio da aprendizagem perceptual por ETCC tanto anódica quanto catódica. Os resultados nas condições pré-ETCC tenderam a melhorar com o passar dos dias de testagem e esse efeito não foi observado para as condições pós-ETCC. Um efeito semelhante também foi observado por Lang et al. (2003) em uma tarefa de aprendizagem motora.

A tendência a uma diminuição de sensibilidade em relação a linha de base durante a estimulação anódica também merece destaque aqui (Figuras 28 e 37). Embora não tenha alcançado significância estatística, este efeito pode ser observado em todos os anéis de excentricidade no protocolo 10-20. Como dito

anteriormente, a tendência normal do desempenho no campímetro Humphrey é de melhora no reteste. A piora observada durante a estimulação anódica é mais um indicativo de que o processo de aprendizagem normal foi afetado pela estimulação. É importante ressaltar que este efeito de piora é revertido no campo visual periférico, onde o efeito foi gradualmente maior para os anéis mais excêntricos medidos (Figura 28). Ao avaliar efeitos de aprendizagem e reteste na campimetria, Heijl et al. (1989) constataram que o efeito de aprendizagem é mais forte na periferia que no centro do campo visual. A tendência a um desempenho diferente na periferia e no centro do campo visual durante a estimulação anódica pode sugerir que os efeitos da ETCC sobre a aprendizagem perceptual podem ser influenciados pela magnitude da demanda de aprendizagem da tarefa. Efeitos diferenciais da ETCC para tarefas similares mas com diferentes níveis de dificuldade já foram apresentados anteriormente para diferentes funções (Pope e Miall, 2012; Jones e Berryhill, 2012; Sandrini et al. 2012).

O efeito da estimulação anódica sobre o PSD descrito aqui reforça a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre um possível efeito da ETCC sobre processos de aprendizagem perceptual. Até o momento, o enfoque da área vem sendo principalmente sobre processos de percepção do ponto de vista da detectabilidade de estímulos ou tempo de reação, com raras discussões sobre possíveis efeitos em mecanismos de aprendizagem perceptual.

5.4.3 Falha em replicar resultados anteriores

Kraft et al. (2010) avaliaram os efeitos da ETCC sobre o desempenho no protocolo 10-2 do campímetro Humphrey. Estes autores encontraram que a estimulação anódica levou a um aumento significativo da sensibilidade no campo visual, afetando apenas os dois graus centrais medidos com o protocolo 10-20 (Figura 37A). Aqui, não foram encontrados efeitos da ETCC sobre a sensibilidade no protocolo 10-2, havendo inclusive uma tendência a um efeito inibitório da estimulação (Figura 37 B). É possível que diferenças metodológicas entre os dois trabalhos possam explicar a ausência de replicação dos resultados anteriores. Por outro lado, a ausência de replicação dos resultados de Kraft et al. chama atenção para a necessidade de mais estudos buscando replicação dos resultados da ETCC.

Figura 37. (A) Resultados da campimetria em diferentes condições de ETCC (Retirado de Kraft et al. 2010). (B) Resultados do presente trabalho plotados como em Kraft et al. (2010). As barras verticais representam os erros padrão das médias.

Por compreender que o desempenho no campímetro Humphrey tende a alterar significativamente entre teste e reteste, um teste sem estimulação para cada protocolo aqui avaliado foi realizado antes da aplicação da ETCC em todas as sessões. As análises estatísticas foram feitas com o valor de mudança entre pré ETCC e ETCC. Kraft et al (2010) analisaram principalmente os resultados pós ETCC. Esta é uma importante diferença metodológica entre os dois trabalhos. Por outro lado, ao compararmos apenas os resultados ETCC entre si (anódica x catódica x placebo sem considerar a linha de base) também não encontramos efeitos significativos. Assim, esta diferença metodológica entre os dois trabalhos não é suficiente para explicar os diferentes resultados.

As principais diferenças metodológicas entre Kraft et al. (2010) e o trabalho aqui apresentado são: (i) Kraft et al. aplicaram a ETCC em um período de repouso antes da tarefa (ETCC “*offline*”) enquanto que aplicamos a ETCC durante a tarefa (ETCC “*online*”); (ii) Kraft et al. aplicou a ETCC em O1 ou O2 de maneira contrabalanceada entre os participantes enquanto que aplicamos a ETCC em Oz para todos os participantes; (iii) Kraft et al. tinham ressonância magnéticas dos participantes para guiar diferenças individuais enquanto que aqui utilizamos apenas o sistema 10-20; (iv) Kraft et al. testaram os dois olhos e não especificam que olho utilizaram na análise de dados enquanto que testamos apenas o olho dominante; (v) o eletrodo de referência usado por Kraft et al. tinha 7x10cm.

O fato de que a campimetria foi realizada com ETCC “*offline*” em Kraft et al. pode ser o maior determinante dos resultados aqui apresentados. Há

trabalhos que sugerem que a ETCC “*offline*” pode produzir resultados diferentes da ETCC “*online*” (Reis e Fritsch, 2011). Escolhemos trabalhar com a ETCC “*online*” pelo fato de que a duração dos efeitos de uma única sessão de ETCC sobre funções sensoriais tende a ser muito curta (Antal et al 2004; Accornero et al. 2007). Aqui, os efeitos robustos da ETCC “*online*” sobre a visão de cores desapareceram em um reteste 15 minutos após o fim da estimulação. Como nosso objetivo foi avaliar como a ETCC afeta diferentes excentricidades no campo visual, escolhemos a abordagem que julgamos que produziria efeitos mais robustos.

Outro ponto de grande distinção entre os trabalhos foi a montagem de eletrodos. Enquanto que aqui posicionamos o eletrodo de ETCC sobre Oz, utilizando o mesmo ponto de estimulação que se mostrou efetivo na reabilitação do campo visual de populações clínicas (Plow et al. 2011, 2012a,b), Kraft et al. (2010) testou os pontos O1 e O2 de maneira contrabalanceada na amostra. Assim, não é possível saber se os resultados reportados refletem a modulação de O1 ou O2. O fluxo de corrente para uma montagem O1-Cz e para Oz-Cz são bastante distintos, e isso pode ter determinado a diferença entre os dois trabalhos.

A não replicação dos resultados de Kraft et al. (2010) chama a atenção para o fato de que diferenças em parâmetros de ETCC podem levar a resultados muito diferentes. Assim, o desenvolvimento de mais estudos buscando a replicação de trabalhos anteriores e a otimização dos parâmetros de ETCC é crítico para o amadurecimento desta área de pesquisa.

5.4.4 Conclusão preliminar

O presente trabalho demonstrou que a ETCC do córtex visual primário tende a afetar diferencialmente o campo visual central e periférico. Por outro lado, efeitos significativos só foram observados nos pontos de maior excentricidade medidos aqui. Ainda, a ETCC parece ter afetado o processo de aprendizagem perceptual normal observado no reteste do campímetro Humphrey. Este resultado acrescenta importantes informações para a literatura de ETCC reforçando outros achados que sugerem que a estimulação de V1 pode levar a um bloqueio da aprendizagem perceptual.

Constatamos também que o efeito excitatório da ETCC anódica sobre a sensibilidade do campo visual central encontrado por Kraft et al. (2010) não foi replicado com nossos parâmetros e procedimentos. Encontramos não um efeito excitatório mas sim uma tendência a um efeito inibitório (porém não significativo). Estes resultados sugerem que mais pesquisas precisam ser realizadas para compreender que parâmetros são mais eficazes para modular a sensibilidade do campo visual com ETCC, reforçando ainda a necessidade de mais iniciativas de replicação por pesquisadores desta área.

5.5 Modelo animal

O desenvolvimento do modelo animal aqui apresentado representa a primeira etapa de uma colaboração em andamento entre a Universidade de São Paulo e a Universidade de Pablo de Olavide. Em termos gerais, os principais

achados foram: (i) ETCC anódica não afetou o PVE; (ii) ETCC catódica aumentou a amplitude de P1 e a latência de P1 e N1; (iii) um efeito significativo da ETCC foi induzido em todos os animais testados utilizando procedimentos e uma montagem de eletrodos compatível com registros invasivos da atividade cortical (iv) os efeitos encontrados se mantiveram por ao menos uma hora após o fim da ETCC e (v) os resultados encontrados são similares aos apresentados na literatura existente da ETCC do sistema visual humano.

É notável que a estimulação anódica não produziu efeitos significativos no PVE. Frequentemente a presença de efeitos da ETCC catódica na ausência de efeitos de ETCC anódica são justificados pelo fato de que diferentes grupos de neurotransmissores podem estar envolvidos na mediação dos efeitos da estimulação anódica e catódica (Stagg e Nitsche, 2011) e que um *Ceilling Effect* pode estar limitando a neuromodulação excitatória induzida pela ETCC anódica (Antal e Paulus, 2008). Alguns trabalhos recentes reportaram ausência de efeitos da ETCC anódica sobre o processamento visual e recorreram a estas hipóteses em sua discussão. Sensibilidade ao contraste acromático (Antal et al., 2001) e limiares de discriminação verde-vermelho (Seção 4.1, Costa et al., 2012) avaliados com métodos psicofísicos foram modulados apenas por ETCC catódica.

Os efeitos da ETCC catódica apresentados aqui também encontram respaldo na literatura recente. Apenas a ETCC catódica induziu efeitos significativos sobre o córtex somatosensorial de coelhos despertos em um estudo com parâmetros e procedimentos semelhantes aos apresentados aqui (Márquez-

Ruiz et al. 2012). Em humanos, apenas a ETCC catódica levou a um aumento da amplitude do componente positivo do PVE (Antal et al. 2004b).

Estes efeitos podem ser explicados pelo trabalho de Zemon et al. (1980). Zemon et al. sugerem que o componente positivo do PVE reflete processos inibitórios. Os autores observaram uma diminuição da amplitude do principal componente positivo do PVE após a aplicação de bicuculina (um bloqueador GABA) no sistema visual de gatos. Assim, um aumento na amplitude do componente positivo do PVE por estimulação catódica pode refletir um efeito inibitório da ETCC.

É importante ressaltar também que a estimulação catódica afetou as latências do PVE neste experimento. Junto com as alterações de fase induzidas no PVEv humano (Seção 5.2.3), estes resultados parecem sugerir um efeito da ETCC sobre a somação temporal na área estimulada.

A duração dos efeitos encontrados aqui também é notável. Os efeitos da ETCC se mantiveram por ao menos uma hora após o fim da estimulação. Desta forma, é possível realizar uma série de medidas e procedimentos após o fim da ETCC, fato que abre uma avenida para novos estudos dos mecanismos neurais subjacentes. Em geral, o tempo de duração dos efeitos de uma única sessão de ETCC sobre o córtex visual é de poucos minutos (Antal et al. 2004; Seção 5.1.4)

Outros estudos com modelos animais apresentam efeitos significativos de ambas as direções de corrente de ETCC (Cambiaghi et al. 2011; Creutzfeld 1962; Landau 1964), porém, os animais testados estavam sob o efeito de anestesia. É bem descrito que anestésicos podem afetar os potenciais sensoriais evocados e

os efeitos da ETCC (Schulte & Hudetz, 2006; Dyer & Rigdon 1987; Márquez-Ruiz et al. 2012). Ainda, o uso de animais anestesiados como modelo dos efeitos da ETCC em humanos pode não ser apropriado na medida que os pacientes geralmente não estão sob efeito de anestesia ao receber ETCC.

Além da questão da anestesia, as diferenças de método entre os estudos dos efeitos da ETCC sobre o sistema visual em modelos animais reforçam a adequação e relevância do modelo proposto aqui. Os estudos mais antigos são de difícil replicação devido a fatores como complexidade dos procedimentos e falta de informação paramétrica fundamental (por exemplo: Creutzfeld 1962; Morell e Naitoh 1962; Szeligo 1976).

Diferentes montagens de eletrodo também podem resultar em diferentes efeitos da ETCC. No estudo de Cambiaghi et al. (2011), a ETCC é aplicada através de tubos plásticos epicranianos preenchidos com solução salina, enquanto o eletrodo de retorno foi posicionado no tórax. Assim, as diferenças entre os resultados do presente estudo e de Cambiaghi et al. (2011) também podem ter sido determinadas pela montagem de eletrodos e diferentes fluxos de corrente.

Além disso, Cambiaghi et al. (2011) utilizaram camundongos em seus experimentos. Os camundongos possuem um crânio muito pequeno, fato que pode dificultar a montagem adequada de eletrodos de ETCC, já que eletrodos muito próximos entre si podem levar a um vazamento de corrente significativo antes que a corrente atinja o córtex. Por seu tamanho, o crânio do coelho possibilita uma diversidade de montagens de eletrodos maior. O uso de coelhos como modelo possui outras vantagens: (i) grande tolerância a contenção,

tornando fácil a realização de estudos onde é necessário que o animal esteja desperto e imóvel (Wyrwicz et al. 2000), (ii) as orelhas grandes são convenientes para montagens de ETCC envolvendo eletrodos de retorno extra-cefálicos e (iii) o coelho é um modelo popular em neurociência visual.

5.6 Discussão Geral

No presente trabalho encontramos que a ETCC afeta o processamento visual básico com num padrão complexo e pouco intuitivo de efeitos. A complexidade destes efeitos parece refletir a complexidade funcional e estrutural do sistema nervoso central e reforçam a relevância da pesquisa proposta aqui. A existência de efeitos opostos sobre grupos específicos de células na área estimulada e um efeito da ETCC sobre a latência de resposta são resultados inéditos na literatura de ETCC e serão discutidos de maneira mais aprofundada nos tópicos a seguir.

5.6.1 Efeitos da ETCC em diferentes grupos de células na área estimulada

Em termos gerais, dois dos resultados merecem maior destaque: os efeitos via-específicos da estimulação e efeitos opostos em diferentes grupos de células. A existência de efeitos distintos da ETCC sobre diferentes faixas de frequência espacial e níveis de contraste processados preferencialmente pela via magnocelular sugerem que diferentes grupos de células e vias no córtex visual podem ser afetados de maneira distinta (e até oposta) pela estimulação. Os

efeitos opostos da ETCC catódica sobre os limiares tritan e deutan reforçam esta interpretação. Estes resultados sugerem que embora a ETCC possa ser uma técnica com baixa focalidade no domínio espacial, seus efeitos podem ser bastante focais no domínio funcional. Assim, os resultados aqui apresentados sugerem que estudos futuros podem utilizar testes sensíveis à atividade de diferentes vias e grupos de células presentes na área estimulada como uma forma de compreender melhor seus efeitos e otimizar os protocolos de estimulação.

A demonstração de efeitos opostos da ETCC apresentada aqui é bastante robusta, tendo sido observada tanto em testes de visão de cores como de contraste acromático. Por outro lado a interpretação destes efeitos tem um caráter significativamente especulativo. Esta limitação é em grande parte determinada pela quantidade ainda limitada de informação sobre os efeitos e mecanismos de ação da ETCC. Propomos que estes efeitos podem ser explicados principalmente por três fatores: diferenças estruturais nas vias retino-corticais e diferentes grupos de células em V1, diferenças funcionais entre estes diferentes grupos de células e um possível efeito diferencial da ETCC para diferentes níveis de ativação da área estimulada.

Como dito anteriormente, aspectos estruturais da área estimulada podem ser determinantes para efeitos da ETCC. Está bem descrito que a orientação dos axônios em relação ao fluxo de corrente da estimulação pode levar a efeitos opostos da mesma corrente em diferentes grupos de células (Kabakov et al. 2012). Como o córtex é formado por um tecido com diversos sulcos e circunvoluções e o fluxo de corrente da ETCC é pouco focal, diferentes células

serão atingidas pela corrente em diferentes direções. Este fenômeno pode determinar parte dos efeitos opostos da ETCC sobre diferentes grupos de células e a presença de efeitos excitatórios da ETCC catódica e inibitórios da ETCC anódica. Por outro lado, a falta de informação sobre como alguns grupos de células no córtex visual se organizam do ponto de vista estrutural e a variabilidade individual da anatomia do córtex e sua relação com pontos de referência no sistema 10-20 limitam significativamente esta interpretação. Assim, propomos que diferenças funcionais entre diferentes vias e grupos de células também têm um papel neste fenômeno.

Em geral, os testes utilizados aqui para avaliar os efeitos da ETCC são sensíveis a atividade de diferentes vias e grupos de células no sistema visual. O teste do Pedestal é sensível a atividade das vias de luminância ON e OFF e vias retinocorticais magno e parvocelular. Os testes de sensibilidade ao contraste para grades refletem o estado funcional de células com diferentes afinações para frequências espaciais. Os testes de visão de cores são sensíveis à atividade das vias parvo e koniocelular. Como já apresentado nas sessões de discussão específicas, estas vias e grupos de células tendem a diferir entre si na seletividade a estímulos e em seus padrões de resposta. Por este motivo, é possível que o efeito distinto da ETCC nas diferentes medidas tenham um determinante fisiológico.

Dentre as vias subjacentes ao desempenho nos testes medidos aqui, magnocelular e parvocelular apresentam as diferenças fisiológicas melhor descritas (Kaplan, 2004). A tendência a não-linearidade de resposta e o padrão de resposta transiente das células na via magnocelular (Marrocco et al. 1982;

Callaway, 2005) pode ter determinado o fato de que parte dos efeitos via-específicos apresentados aqui tenha surgido sobre a sensibilidade mediada por esta via. Estes foram o efeito inibitório da ETCC anódica sobre as respostas da via magnocelular no teste do pedestal e sobre a amplitude para 0,5cpg no PVEv. Por outro lado, muitos dos efeitos opostos e via específicos apresentados surgiram também sobre a função das outras vias retinocorticais (efeitos opostos da catódica sobre visão de cores, efeitos excitatórios da catódica sobre a fase do PVEv em 16cpg). Assim, as peculiaridades funcionais da via magnocelular também não são suficientes para explicar estes resultados.

Bikson e Rahman (2013) apresentam uma hipótese sobre especificidade de efeitos da ETCC que pode ser relevante na interpretação desses resultados. Para estes autores, a ETCC pode levar a um viés de entrada (*input bias*) na área estimulada. A ETCC induziria um viés sobre uma área que processe duas ou mais funções (ou que opere em dois ou mais estados) de forma a processar preferencialmente uma destas ao custo de um prejuízo às outras (Bikson e Rahman, 2013). Assim, uma limitação fisiológica e um viés de processamento induzido por ETCC poderia levar aos efeitos seletivos da ETCC em apenas uma função, como por exemplo: efeitos apenas na via de luminância OFF, efeito excitatório apenas para discriminação no eixo tritan, efeito apenas sobre a via magnocelular. Este viés poderia explicar também os efeitos opostos da ETCC apresentados aqui. O aumento de atividade em grupo de células poderia custar um prejuízo a outro.

Ao discutir como diferentes áreas do cérebro estão envolvidos na aprendizagem de símbolos, Luculano e Kadosh (2013) apresentam um dos

poucos exemplos de efeitos opostos da ETCC e chamam a atenção para os possíveis “custos” da modulação cognitiva. Estes autores mediram os efeitos da ETCC do córtex parietal posterior ou dorsolateral pré-frontal sobre a aprendizagem de um novo sistema numérico (conjunto de novos símbolos para representar algarismos de 1 a 9) e a automaticidade de respostas a estes símbolos. Luculano e Kadosh encontraram uma dissociação dupla entre os efeitos da ETCC, com efeitos opostos sobre a aprendizagem e automaticidade em cada área estimulada. Estes resultados reforçam a noção de que o aumento de desempenho pode ocorrer às custas da inibição de outro processo na área estimulada. Até o momento, os nossos resultados e o trabalho de Luculano e Kadosh são as ilustrações mais contundentes de que a ETCC pode induzir um viés de entrada e ter resultados funcionais opostos.

Por que apenas estes trabalhos relataram efeitos opostos da ETCC? Um dos motivos está na quantidade e especificidade das medidas realizadas para avaliar os efeitos da ETCC. Em muito poucos casos são realizadas medidas sensíveis à atividade de diferentes grupos de células na área estimulada. O sistema visual representa um modelo excelente neste aspecto. É possível que em outro nível de análise estes efeitos não tivessem sido observados. Poderíamos não ter constatado estes efeitos opostos se, por exemplo, ao invés de medir os efeitos sobre a atividade de células com diferentes afinações para frequência espacial com grades senoidais tivéssemos medido os efeitos da ETCC na discriminação de textura ou outros estímulos complexos. Ainda, como ressaltado por Luculano e Kadosh (2013), as pesquisas geralmente avaliam apenas o

desempenho na tarefa que se busca modular. Estes trabalhos reforçam a necessidade de medir as implicações da ETCC sobre outras tarefas.

É importante ressaltar também que aqui, resultados opostos sobre diferentes vias ou grupos de células foram observados apenas para ETCC catódica. Está bem descrito que os mecanismos de ação da estimulação anódica e catódica são diferentes e envolvem diferentes grupos de neurotransmissores (Stagg e Nitsche, 2011). Por outro lado, os mecanismos de ação da ETCC sobre o córtex visual ainda foram pouco estudados, particularmente no nível molecular. Futuras pesquisas destes mecanismos de ação devem levar em consideração esta tendência da estimulação catódica a induzir efeitos opostos em diferentes grupos de células.

5.6.2 Efeitos sobre a latência de resposta

A ETCC afetou as latências de resposta no PVE tanto em humanos como no modelo animal. A mudança de fase no PVEv correspondeu a uma mudança de latência aparente de aproximadamente 4ms. Houve ainda efeitos opostos da ETCC catódica sobre a fase do PVEv (Figura 21). Notavelmente, a maior parte dos efeitos em latência e fase foram induzidos pela ETCC catódica. Apenas a ETCC catódica afetou a latência para o PVE no modelo animal, apenas a ETCC catódica afetou a fase para 0,5cpg e os maiores efeitos sobre a fase do PVEv foram desta direção de corrente. Estes resultados reforçam a existência de diferenças entre os mecanismos de ação para ETCC catódica e anódica no

processamento visual e chamam a atenção para a necessidade de novas pesquisas abordando este fenômeno em maior profundidade.

5.6.3 Efeitos dependentes de contraste e sensibilidade

Em geral, houve uma tendência a efeitos mais significativos da ETCC sobre níveis específicos de contraste. Não houve um efeito sobre o limiar de contraste e houve uma tendência a um menor efeito nos níveis mais altos de contraste (em consonância com os resultados de Antal et al. 2004a e Accornero et al 2007). Como dito na Seção 5.2.4, estes efeitos podem ser explicados por uma dependência dos efeitos da ETCC sobre o estado de ativação da área estimulada.

Ainda, pudemos observar uma tendência a efeitos mais notáveis da estimulação anódica sobre as funções onde a sensibilidade geralmente é mais baixa. Isto foi observado na modulação exclusiva dos limiares tritan, da resposta para decremento de luminância, da fase para 16cpg no PVEv e no ponto mais periférico do campo visual medido aqui. Esta tendência a efeitos onde a sensibilidade é mais baixa parece reforçar a hipótese de que um efeito teto pode limitar os efeitos da estimulação anódica nestes voluntários saudáveis.

5.6.4 Implicações clínicas

Embora tenhamos avaliado apenas voluntários saudáveis, nossos resultados têm uma série de implicações relevantes para a aplicação clínica da

ETCC e estas não se limitam ao sistema visual. Dentre as implicações clínicas específicas para o sistema visual temos os efeitos da estimulação anódica sobre a visão no eixo tritan e um aumento de sensibilidade no campo visual periférico. Estes resultados sugerem que a ETCC pode ser utilizada para a reabilitação da visão de cores e do campo visual. Ainda, os possíveis efeitos da estimulação sobre a aprendizagem perceptual reforçam a necessidade de mais estudos investigando aplicações clínicas desses efeitos.

Além disso, os efeitos via específicos e opostos para diferentes grupos de células chama a atenção para um aspecto até hoje negligenciado na pesquisa clínica em ETCC. Se a estimulação pode ter efeitos excitatórios sobre uma função e inibitórios sobre outra mediada pela mesma área, é possível que repetidas sessões levem a uma plasticidade mal adaptativa para a função inibida? O trabalho de Iuculano e Kadosh (2013) mostrando um efeito oposto da ETCC sobre diferentes aspectos do processo de aprendizagem de uma tarefa reforça a relevância dessa pergunta. Mais pesquisas são necessárias para esclarecer esta questão. Em protocolos clínicos, a avaliação dos efeitos da ETCC com testes que apresentem sensibilidade específica para grupos de células diferentes na área estimulada é raro. Nossos resultados sugerem que esta é uma abordagem necessária e deve ser aplicada em pesquisas futuras.

A não replicação de resultados apresentados por Antal et al. (2001) e Kraft et al. (2010) chama mais uma vez a atenção para a necessidade de mais iniciativas de replicação nesta área de pesquisa. Para que a ETCC venha a se tornar uma alternativa terapêutica aplicada fora do contexto da pesquisa científica, é necessário que os resultados se mostrem robustos em diferentes

centros de pesquisa. Para tal, a escolha cuidadosa de parâmetros dos testes usados para avaliar seus efeitos e uma descrição precisa dos métodos utilizados também se faz necessária.

Por fim, é importante ressaltar que os efeitos aqui apresentados podem não ser os mesmos em populações clínicas. Como dito anteriormente, a ausência de efeitos em algumas funções pode ter sido limitada por efeitos teto (por exemplo: sensibilidade verde-vermelho, limiares de contraste acromático e visão central). Assim, populações clínicas poderiam ter apresentado efeitos excitatórios da ETCC nas mesmas condições testadas aqui. Existem também evidências sugerindo que o efeito da ETCC pode ser diferente em populações clínicas (Stagg et al. 2011), particularmente em casos de lesão (Stagg e Johansen-Berg, 2013). Efeitos específicos sugerindo uma maior susceptibilidade à ETCC do sistema visual em grupos clínicos foram apresentados por Olma et al. (2013) para percepção de movimento, Halko et al (2011) e Plow et al. (2012) para o campo visual e Spiegel et al. (2013) para sensibilidade ao contraste. Assim, a ausência de alguns efeitos no presente trabalho deve ser considerada com cautela ao conceber possíveis protocolos clínicos da ETCC sobre funções visuais.

5.6.5 Limitações do estudo

Como mencionado anteriormente, uma das principais limitações do presente estudo é determinada pela limitada quantidade de informação sobre os mecanismos de ação da ETCC. Desta forma uma parte da discussão dos

resultados apresentados possui um caráter ainda especulativo. Apesar disso, o presente trabalho indica novos problemas e perguntas para o estudo de como a ETCC funciona. Outra limitação já discutida é a de que apenas voluntários saudáveis foram testados aqui e os efeitos podem não ser os mesmos em populações clínicas (Seção 5.6.4).

Ainda, a maioria dos testes usados aqui foi realizada durante a aplicação da ETCC. Já foi demonstrado que a ETCC pode ter efeitos diferentes quando é aplicada durante ou antes da tarefa e que este fenômeno também pode diferir entre diferentes tarefas (Zaghi et al. 2009). No trabalho de Pirulli et al (2013) a ETCC induziu um maior facilitação perceptual quando aplicada antes da tarefa. Giacobbe et al. (2013) demonstraram que a ETCC aplicada antes da tarefa foi eficaz em aumentar o desempenho motor de pacientes com derrame enquanto que a ETCC aplicada durante a tarefa não teve efeito. Por outro lado, Stagg et al. (2011) demonstraram que ETCC aplicada durante uma tarefa de aprendizagem motora teve efeitos mais robustos que a ETCC aplicada antes da tarefa.

Aqui, decidimos por priorizar protocolos com ETCC “online” por dois motivos: a duração limitada dos efeitos de apenas uma sessão de ETCC sobre o sistema visual (Antal et al. 2004a) e a noção de que a ETCC pode afetar preferencialmente grupos de células que estejam ativadas durante a estimulação e que esta abordagem pode aumentar os efeitos e focalidade da estimulação (Bikson e Rahman, 2013). Ranieri et al. (2012) demonstraram em um estudo *in-vitro* que a estimulação por corrente contínua modula preferencialmente as células que não estão em repouso. Ainda, como revisado por Stagg e Nitsche (2011), a indução de LTP por estimulação com corrente contínua é mais eficaz

quando as vias estimuladas já estão ativadas por uma tarefa. Neste contexto, argumentamos que embora a estimulação *offline* possa ter um efeito mais significativo em alguns casos, a abordagem utilizada aqui foi a mais apropriada e compatível com protocolos clínicos. A ausência de efeitos sobre a visão de cores 15 minutos após o fim da estimulação reforça esta abordagem.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que a ETCC é uma técnica eficaz na modulação de funções visuais básicas. Nossos resultados mostraram que ETCC pode modular a visão de cores de forma robusta e com especificidade de vias, levando a discriminação de cores para níveis que estão além dos resultados normativos de adultos saudáveis. Isso sugere que a ETCC pode vir a gerar resultados positivos se usada para a reabilitação da visão de cores. Por outro lado, os efeitos sobre a visão de contraste acromático e acuidade visual tenderam a ser inibitórios em grande medida.

Os efeitos distintos da ETCC sobre a discriminação protan, deutan e tritan ilustram que a ETCC é uma técnica eficiente para o estudo do processamento visual. A existência de diferenças qualitativas no efeito da ETCC sobre a discriminação deutan e tritan sugere a existência de algum nível de segregação das vias P e K em V1, resultado que acrescenta informações relevantes ao debate sobre a integração de sinais P e K no córtex visual. Pesquisas futuras devem utilizar ETCC sobre outras áreas visuais envolvidas no processamento de cores. Pesquisas que combinem tarefas de discriminação visual e ETCC de áreas

visuais devem passar a considerar os parâmetros cromáticos dos estímulos como possíveis fatores de confusão.

Efeitos significativos da ETCC foram observados sobre a latência de resposta em humanos e animais. Estes efeitos surgiram principalmente para a estimulação catódica, sugerindo a necessidade de mais investigações sobre os mecanismos de ação da ETCC catódica. Ainda, a existência de efeitos sobre a latência de resposta sugere que alguns efeitos da ETCC sobre tempo de reação podem se discutidos em termos de modulação de latência.

Os efeitos distintos da ETCC sobre o processamento visual mediado por diferentes vias e grupos de células na área estimulada acrescentam informações relevantes sobre os efeitos da técnica. Estes resultados sugerem que embora a técnica tenha uma baixa focalidade no domínio espacial, seus efeitos podem ter uma alta focalidade no domínio funcional. Além disso, esses efeitos podem ser opostos para diferentes grupos de células envolvidos na função medida pela área estimulada. Este resultado sugere que em pesquisas futuras, uma maior atenção deve ser dada aos efeitos da ETCC sobre grupos de células específicos. Os resultados aqui encontrados também reforçam a adequação do método aplicado e o uso do sistema visual como um modelo para compreender os efeitos da ETCC. Embora o trabalho recente de Iuculano e Kadosh (2013) tenha reportado efeitos opostos da ETCC em diferentes aspectos do desempenho em uma tarefa de aprendizagem, nosso estudo é o primeiro a apresentar efeitos opostos da ETCC na função de diferentes grupos de células da área estimulada em humanos.

Este trabalho foi bem sucedido em induzir e registrar efeitos da ETCC sobre o córtex visual de coelhos despertos e utilizou procedimentos compatíveis

com métodos eletrofisiológicos invasivos. Este é o primeiro trabalho a apresentar os efeitos da ETCC sobre o córtex visual de um modelo animal desperto e possibilita o desenvolvimento de futuras investigações no nível celular e molecular dos mecanismos de ação da ETCC sobre o córtex visual.

Em resumo, o presente trabalho apresenta um grande número de achados inéditos e relevantes para a literatura de neuromodulação não-invasiva. Os resultados apresentados aqui abrem uma avenida para novos estudos sobre os mecanismos de ação da ETCC, a especificidade de seus efeitos e possíveis aplicações terapêuticas sobre a reabilitação visual.

REFERÊNCIAS

Alexander, K.R.; Fishman, G.A.; Barnes, C.S.; Grover, S. (2001) On-response deficit in the electroretinogram of the cone system in X-linked retinoschisis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42, 453-462.

Antal, A., Nitsche, M.A., and Paulus, W. (2001). External modulation of visual perception in humans. *NeuroReport* 12, 3553-3555.

Antal, A., Kincses, T.Z., Nitsche, M.A., and Paulus, W. (2003a). Manipulation of phosphene thresholds by transcranial direct current stimulation in man. *Experimental Brain Research* 150, 375-378.

Antal, A., Kincses, T.Z., Nitsche, M.A., & Paulus, W. (2003b). Modulation of moving phosphene thresholds by transcranial direct current stimulation of V1 in human. *Neuropsychologia* 41, 1802-1807.

Antal, A., Kincses, T.Z., Nitsche, M.A., Bartfai, O., and Paulus, W. (2004a). Excitability changes induced in the human primary visual cortex by transcranial direct current stimulation: Direct electrophysiological evidence. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45, 702-707.

Antal, A., Nitsche, M.A., Kincses, T.Z., Kruse, W., Hoffmann, K., and Paulus, W. (2004b). Facilitation of visuo-motor learning by transcranial direct current stimulation of the motor and extra-striate visual areas in humans. *European Journal of Neuroscience* 19, 2888-2892.

Antal, A., Nitsche, M.A., Kruse, W., Kincses, T.Z., Hoffman, K.P., and Paulus, W. (2004c). Direct current stimulation over V5 enhances visuo-motor coordination by improving motion perception in humans. *Journal of Cognitive Neuroscience* 16, 521-527

Antal A, Varga ET, Nitsche MA, Chadaide Z, Paulus W, Kovacs G, Vidnyanszky Z, (2004d). Direct current stimulation over MT+/V5 modulates motion aftereffect in humans. *NeuroReport*, 15, 2491-2494.

Antal, A., and Paulus, W. (2008). Transcranial direct current stimulation and visual perception. *Perception* 37, 367-374.

Antal, A.; Nitsche, M.A. & Paulus, W. (2011). Electrical stimulation and visual network plasticity. *Restorative neurology and neuroscience* ,29, 365-374.

Accornero, N., Votti, P., La Riccia, M., and Gregori, B. (2007). Visual Evoked potentials modulation during direct current cortical polarization. *Experimental Brain Research* 178(2), 261-266.

Baseler, H.A.; Sutter, E.E.; Klein, S.A. & Carney, T. (1994). The topography of visual evoked response properties across the visual field. *Electroencephalography and clinical electrophysiology*, 90, 64-81.

Bikson M & Rahman A (2013) Origins of specificity during tDCS: anatomical, activity-selective, and input-bias mechanisms. *Front Hum Neurosci* 7, 1-9.

Bindman, L.; Lippold, O.C.J. & Redfearn, J.W.T. (1964). Long-lasting changes in the level of electric activity of the cerebral cortex produced by polarizing currents. *Nature*, 196, 584-585.

Boggio, P.S. (2006). Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre memória operacional e controle motor. *Tese de Doutorado*. Programa de pós-graduação em Psicologia (Área de Concentração: Neurociências e Comportamento). Universidade de São Paulo, 126 p.

Boggio, P.S.; Khoury, L.P.; Martins, D.C.S.; Martins, O.E.M.S.; Macedo, E.C. & Fregni, F. (2009). Temporal cortex direct current stimulation enhances performance on a visual recognition memory task in Alzheimer disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 80, 444-447.

Boggio, P.S.; Rigonatti, S.P.; Ribeiro, R.B.; Myczkowski, M.L.; Nitsche, M.A.; Pascual-Leone, A. & Fregni, F. (2008). A randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 11, 249-254.

Boggio, P.S.; Bermphol, F.; Vergara, A.; Muniz, A.L.R.; Nahas, F.; Leme, P.B.; Rigonatti, S. & Fregni, F. (2007). Go-no-go task performance improvement after anodal transcranial DC stimulation of the left dorsolateral prefrontal cortex in major depression. *Journal of Affective Disorders*, 101, 91-98.

Bolognini, N., Olgiati, E., Rossetti, A., and Maravita, A. (2010a). Enhancing multisensory spatial orienting by brain polarization of the parietal cortex. *European Journal of Neuroscience* 31, 1800-1806.

Bolognini, N., Fregni, F., Casati, C., Olgiati, E., and Vallar, G., (2010b). Brain polarization of parietal cortex augments training-induced of visual exploratory and attentional skills. *Brain Research* 1349,76-89.

Bolognini, N., Rossetti, A., Casati, C., Mancini, F., and Vallar, G. (2011). Neuromodulation of multisensory perception: a tDCS study of the sound-induced flash illusion. *Neuropsychologia* 49, 231-237.

Briggs, F., and Ursey, W.M. (2009). Parallel processing in the corticogeniculate pathway of the Macaque Monkey. *Neuron* 62, 135-146.

Brunoni, A., Nitsche, M., Bolognini, N., Bikson, M., Wagner, T., Merabet, L., Edwards, D., Valero-Cabre, A., Rotenberg, A., Pascual-Leone, A., Ferrucci, R., Priori, A., Boggio, P.S. and Fregni, F. (2011). Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): Challenges and future directions. *Brain Research*.

Brunoni AR et al. (2012a) Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. *Brain Stimul* 5 (3),175-195.

Brunoni AR, Valiengo L, Baccaro A, Zanão TA, de Oliveira JF, Goulart A, Boggio PS, Lotufo PA, Benseñor IM, Fregni F. (2013) The Sertraline vs Electrical Current Therapy for Treating Depression Clinical Study: Results From a Factorial, Randomized, Controlled Trial. *JAMA Psychiatry* 6, 1-9.

Brunelin J, Mondino M, Gassab L, Haesebaert F, Gaha L, Suaud-Chagny MF, Saoud M, Mechri A, Poulet E. (2012). Examining transcranial direct-current stimulation (tDCS) as a treatment for hallucinations in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 169, 719-724.

Callaway, E., (1998). Local circuits in primary visual cortex of the macaque monkey. *Annual Review of Neuroscience* 21, 47-74.

Callaway, E., (2005). Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system. *Journal of Physiology* 566, 13-19.

Casagrande, V., Yazar, F., Jones, K., and Ding (2007). The Morphology of the

Koniocellular Axon Pathway in the Macaque Monkey. *Cerebral Cortex* 17, 2334-2345.

Conway, B.R., Chatterjee, S., Field, G.D., Horwitz, G.D., Johnson, E.N., Koida, K. and Mancuso, K. (2010). Advances in color science: from retina to behavior. *Journal of Neuroscience* 30, 14955-14963.

Costa, M. F., Ventura, D. F., Perazzolo, F., Murakoshi, M. T., Silveira, L. C. L. (2006). Absence of binocular summation, eye dominance and learning effects in color discrimination. *Visual Neuroscience* 23 461 - 469.

Costa, M. F., Oliveira, A. G. F., Feitosa-Santana, C., Zatz, M., Ventura, D. F. (2007). Red-Green Color Vision Impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *American Journal of Human Genetics* 80, 1064 - 1075.

Creutzfeld, O.D.; Fromm, G.H. & Kapp, H. (1962). Influence of transcranial DC-currentson cortical neuron activity. *Experimental Neurology* , 5, 436-452.

Dawson, W.W.; Trick, G.L. & Litzkow, C.A. (1979). Improved electrode for electroretinography. *IOVS*, 18, 988–991.

De Valois, R.L., Cottaris, N.P., Elfar, S., Mahon, L.E., and Wilson, J.A., (2000). Some transformations of color information from lateral geniculate nucleus to striate cortex. *PNAS* 9, 4997-5002.

Dyer RS, Rigdon GC (1987). Urethane affects the rat visual system at subanesthetic doses. *Physiol Behav* 41, 327–330.

Feitosa-Santana, C., Paramei, G.V., Nishi, M., Gualtieri, M., Costa, M.F., Ventura, D.F., (2010). Color vision impairment in type 2 diabetes assessed by the D-15d test and the Cambridge Colour Test. *Ophthalmic & Physiological Optics*. 30, 717-723.

Fregni, F.; Boggio, P. S.; Mansur, C. G.; Wagner, T.; Ferreira, M. J. L.; Lima, M. C. et al. (2005). Transcranial direct current stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *NeuroReport*, 16, 1551-1555.

Fecteau, S.; Knoch, D.; Fregni, F.; Sultani, N.; Boggio, P. & Pascual-Leone, A. (2007). Diminishing Risk-Taking Behavior by Modulating Activity in the Prefrontal Cortex: A Direct Current Stimulation Study. *The Journal of Neuroscience*, 27, 2500-2505.

Gawne, T., Osbourne, T., and Risner, M. (2011). Robust sensory gating in the cortical visual evoked potential using two spatially separated stimuli. *Clinical Neurophysiology* 122, 588-593.

Gandiga, P.C.; Hummel, F.C. & Cohen, L.G. (2006). Transcranial DC stimulation

(tDCS): a tool for double-blind sham-controlled clinical studies in brain stimulation. *Clin Neurophysiol*, 117(4), 845-850.

García-Peréz, M.A. (1998). Forced-choice staircases with fixed step sizes: asymptotic and small-sample properties. *Vision Research*, 38, 1861-1881.

Gegenfurtner, K., and Kiper, D. (2003). Color Vision. *Annual Review of Neuroscience* 26, 181-206.

Gobba, F., Cavalleri, A., (2003). Color vision impairment in workers exposed to neurotoxic chemicals. *Neurotoxicology* 24, 693-702.

Gormann, A.L. (1966). Differential patterns of activation of the pyramidal system elicited by surface anodal and cathodal cortical stimulation. *Journal of neurophysiology* , 29, 547-564.

Hanazawa, A., Komatsu, H., and Murakami, I. (2000). Neural selectivity for hue and saturation of colour in the primary visual cortex of the monkey. *European Journal of Neuroscience* 12, 1753–1763.

Halko, M., Datta, A., Plow, E., Scaturro, J., Bikson, M., Merabet, L.B. (2011). Neuroplastic changes following rehabilitative training correlate with regional electrical field induced with tDCS. *Neuroimage* 57, 885-891.

Higgins KE, Jaffe MJ, Caruso RC, & Demonasterio FM. (1998). Spatial Contrast Sensitivity: effects of age, test-retest and psychophysical method. *Journal of the Optical Society of America A* 5, 2173-2180.

Hendry, S., and Reid, R. (2000). The koniocellular pathway in primate vision. *Annual Review of Neuroscience* 23, 127-153.

Hou C, Norcia AM, Madan A, Tith S, Agarwal R, Good WV (2011). Visual cortical function in very low birth weight infants without retinal or cerebral pathology. *IOVS* 52, 9091-9098.

Horwitz, G.D., Chichilnisky, E.J., and Albright, T.D. (2005). Blue-yellow signals are enhanced by spatiotemporal luminance contrast in macaque V1. *Journal Neurophysiology* 93, 2263–2278.

Hood, D.C.; Odel, J.G. & Winn, B.J. (2003). The multifocal visual evoked potencial. *Journal of Neuro-Ophtalmology*, 23, 279-288.

Hood, D.C.; Zhang, X.; Hong, J.E. & Chen, C.S. (2002). Quantifying the benefits of additional channels of multifocal VEP recording. *Documenta Ophtalmologica*, 104, 303-302.

Hood, D.C. & Greenstein, V.C. (2003). Multifocal VEP and ganglion cell damage: applications and limitations for the study of glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22, 201-251.

Iuculano T, Kadosh RC (2013) The Mental Cost of Cognitive Enhancement. *J Neurosci* 33, 4482-4486.

Jasper, H. H. (1958). Report of the committee on methods of clinical examination in electroencephalography. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 10, 370-375.

Johnson, E.N., Hawken, M.J., and Shapley, R. (2001). The spatial transformation of color in the primary visual cortex of the macaque monkey. *Nature Neuroscience* 4, 409–16.

Jones KT, Berryhill ME (2012). Parietal contributions to visual working memory depend on task difficulty. *Front Psychiatry*. 10.

Ko, M., Han, S., Park, S., Seo, J., Kim, Y. (2008). Improvement of visual scanning after DC brain polarization of parietal cortex in stroke patients with spatial neglect. *Neuroscience Letters* 448, 171-174.

Kraft, A., Roehmel, J., Olma, M., Schmidt, S., Irlbacher, K., Brandt, S. (2010). Transcranial direct current stimulation affects visual perception measured by threshold perimetry. *Experimental Brain Research* 207, 283-290.

Kanai, R., Chaieb, L., Antal, A., Walsh, V., & Paulus, W. (2008). Frequency-dependent electrical stimulation of the visual cortex. *Current Biology*, 18, 1839-1843.

Kanai, R.; Muggleton, N. & Walsh, V. (2012). Transcranial Direct Current Stimulation of the Frontal Eye Fields during Pro- and Antisaccade Tasks. *Frontiers in Psychiatry*, 3:45.

Kabakov AY, Muller PA, Pascual-Leone A, Jensen FE, Rotenberg A (2012) Contribution of axonal orientation to pathway-dependent modulation of excitatory transmission by direct current stimulation in isolated rat hippocampus. *J Neurophysiol* 107, 1881-1889.

Kremers, J., Lee, B.B., Pokorny, J., Smith, V. (1993). Responses of macaque ganglion cells and human observers to compound periodic waveforms. *Vision Research*, 33, 1997-2011.

Laming, D. (2013). Contrast discrimination by the methods of adjustment and two-alternative forced choice. *Atten Percep Psychophys* 75, 1774-1778

Ladeira, A., Fregni, F., Campanhã, C., Valasek, C.A., De Ridder, D., Brunoni,

A.R., Boggio, P.S. (2011). Polarity-dependent transcranial direct current stimulation effects on central auditory processing. *PLOS One* 6, Epub.

Lynne, L. (2007). Interest surging in electroconvulsive and other brain stimulation therapies, *JAMA*, 298(10), 1147-1149.

Lang, N., Siebner, H., Chadaide, Z., Boros, K., Nitsche, M.A., Rothwell, J.C., Paulus, W., and Antal, A. (2007). Bidirectional Modulation of Primary Visual Cortex Excitability: A Combined tDCS and rTMS Study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48, 5782-5787.

Lee, B.B. (2011). Visual pathways and psychophysical channels in the primate. *Journal of Physiology* 589, 41-47.

Lennie P & Movshon JA (2005) Coding of color and form in the geniculostriate visual pathway (invited review) *J. Opt. Soc. Am. A* 22 (10).

Marshall, L., Molle, M., Hallschmid, M., Born, J. (2004). Transcranial direct current stimulation during sleep improves declarative memory. *Journal of Neuroscience* 24, 9985–92.

Márquez-Ruiz J, Leal-Campanario R, Sánchez-Campusano R, Molaei-Ardekani B, Wendling F, Miranda PC, Ruffini G, Gruart A, Delgado-García JM. (2012). Transcranial direct-current stimulation modulates synaptic mechanisms involved in associative learning in behaving rabbits. *PNAS* 109, 6710-6715.

Marmor, M.F.; Fulton, A.B.; Holder, G.E.; Miyake, Y.; Brigell, M. & Bach, M. (2009). Standard for clinical electroretinography (2008 update). *Documenta Ophthalmol*, 118, 69–77

Mancuso, K., Hauswirth, W.W., Li, Q., Connor, T.B., Kuchenbecker, J.A., Mauck, M.C., Neitz, J., and Neitz, M. (2009). Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates. *Nature* 461, 784 –787.

McCreery, D.B.; Agnew, W.F.; Yuen, T.G. & Bullara, L. (1990). Charge density and charge per phase as cofactors in neural injury induced by electrical stimulation. *IEEE Translational Biomedicine Eng.*, 37, 996-1001.

Mullen, K. T. (1985). The contrast sensitivity of human color vision to red-green and blue-yellow chromatic gratings. *Journal of Physiology* 359, 381-409.

Nitsche, M.A. & Paulus, W. (2000). Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *Journal of Physiology*, 527, 633-639.

Nitsche, M.A.; Liebetanz, D.; Antal, A.; Lang, N.; Tergau, F. & Paulus, W. (2003a). Modulation of cortical excitability by weak direct current stimulation-technical,

safety and functional aspects. *Supplement of Clinical Neurophysiology*, 56, 255-276.

Nitsche, M.A., Fricke, K., Henschke, U., Schlitterlau, A., Liebetanz, D., Lang, N., Henning, S., Tergau, F., and Paulus, W. (2003b). Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *Journal of Physiology* 533, 293-301.

Nitsche, M.A.; Niehaus, L.; Hoffmann, K.T.; Hengst, S.; Liebetanz, D.; Paulus, W. & Meyer, B.U. (2004). MRI study of human brain exposed to weak direct current stimulation of the frontal cortex. *Clinical Neurophysiology*, 115, 2419-2423.

Nitsche, M. A., Cohen, L. G., Wassermann, E. M., Priori, A., Lang, N., Antal, A. E et al., (2008). Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimulation*, 1, 206-223.

Nitsche, M. A., Cohen, L. G., Wassermann, E. M., Priori, A., Lang, N., Antal, A. et al., (2008). Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimulation* 1, 206-223.

Norcia, A., Tyler, C., Hamer, R., and Wesemann, W. (1989). Measurement of the spatial contrast sensitivity with the swept contrast VEP. *Vision Research* 29, 627-637.

Norcia, A. & Tyler, C. (1985). Spatial frequency sweep VEP: visual acuity during the first year of life. *Vision Research* 25, 1399-1408.

Norcia AM, Wesemann W, Manny RE (1999). **Electrophysiological correlates of vernier and relative motion mechanisms in human visual cortex.** *Vis Neurosci.* 16, 1123-31.

Paulus, W. (2010). On the difficulties of separating retinal and cortical origins of phosphenes when using transcranial alternating current stimulation. *Clinical Neurophysiology*, 121, 987-991.

Peterzell, D.H.; Norcia, A.M. (1997). Spatial frequency masking with the sweep-VEP. *Vision Research*, 37, 2349-2359.

Pope, P.; Miall, C. (2013) Task-specific facilitation of cognition by cathodal Transcranial direct current stimulation of the cerebellum. *Brain Stimulation*, 5, 84-94.

Plow EB, Obretenova SN, Fregni F, Pascual-Leone A, Merabet LB. (2012a). Comparison of visual field training for hemianopia with active versus sham transcranial direct cortical stimulation. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 26, 616-626.

Plow EB, Obretenova SN, Halko MA, Kenkel S, Jackson ML, Pascual-Leone A, Merabet LB (2011) Combining visual rehabilitative training and noninvasive brain stimulation to enhance visual function in patients with hemianopia: a comparative case study. *PM&R* 3 825-833.

Plow EB, Obretenova SN, Jackson ML, Merabet LB. (2012b) Temporal profile of functional visual rehabilitative outcomes modulated by transcranial direct current stimulation. *Neuromodulation* 15, 367-373.

Priori, A. (2003). Brain polarization in humans: A reappraisal of an old tool for prolonged non-invasive modulation of brain excitability. *Clinical Neurophysiology*, 114, 589-595.

Poreisz, C.; Boros, K.; Antal, A. & Paulus, W. (2007). Safety aspects of transcranial Direct Current Stimulation concerning healthy subjects and patients. *Brain Research Bulletin*, 72, 208-214.

Pokorny, J., Smith, V., Verriest, G., Pinckers, A., (1979). *Congenital and Acquired Color Vision Defects*. New York: Grune and Stratton.

Pokorny J, Smith VC (1997) Psychophysical signatures associated with magnocellular and parvocellular pathway contrast gain. *J. Opt. Soc. Am. A* 14(9), 2477-2487.

Purpura, D.P. & McMurtry, J.G. (1965). Intracellular activities and evoked potentials changes during polarization of motor cortex. *Journal of Neurophysiology*, 28, 166-185.

Repérant, J.; Ward, R.; Miceli, D.; Rio, J.P.; Médina, M.; Kenigfest, N. & Vesselkind, N. (2006). The centrifugal visual system of vertebrates: A comparative analysis of its functional anatomical organization. *Brain research reviews*, 52, 1-57

Reffin, J., Astell, S., and Mollon, J.D. (1991). "Trials on a computer controlled colour vision test that preserves the advantages of pseudoisochromatic plates" in: *Colour Vision deficiencies X*, ed. Drum, B. and Serra, A. (Kluwer Press) 67-76.

Regan, B.C., Reffin, J.P., and Mollon, J.D. (1994). Luminance noise and the rapid determination of discrimination ellipses in colour deficiency. *Vision Research* 34, 1279-1299.

Ruff, C.C., Blankenburg, F., Bjoertomt, O., Bestmann, S., Freeman, E., Haynes, J.D., Rees, G., Josephs, O., Deichmann, R., and Driver, J. (2006). Concurrent

TMS/fMRI and psychophysics reveal frontal influences on human retinotopic visual cortex. *Current Biology* 16, 1479-1488.

Sackeim, H.A.; Prudic, J.; Devanand, D.P.; Kiersky, J.E.; Moody, B.J.; Coleman, E.A. & Setembrionno, J. (1993). Effects of stimulus intensity and electrode placement on the efficacy and cognitive effects of electroconvulsive therapy. *New England journal of medicine*, 25, 839-846.

Sandrini M, Fertonani A, Cohen LG, Miniussi C (2012). Double dissociation of working memory load effects induced by bilateral parietal modulation. *Neuropsychologia* 50:396-402.

Souza, G.S., Gomes, B.D., Saito, C.A., da Silva Filho, M., Silveira, L.C. (2007). Spatial luminance contrast sensitivity measured with transient VEP: comparison with psychophysics and evidence of multiple mechanisms. *IOVS*, 48(7):3396-404.

Schutter, D. J. L. G. & Hortensius, R. (2010). Retinal origin of phosphenes to transcranial alternating current stimulation. *Clinical Neurophysiology*, 121, 1080-1084.

Schulte ML, Hudetz AG (2006). Functional hyperemic response in the rat visual cortex under halothane anesthesia. *Neuroscience Letters* 394, 63-68.

Spiegel D, Byblow W, Hess RF & Thompson B (2013). Anodal Transcranial Direct Current Stimulation Transiently Improves Contrast Sensitivity and Normalizes Visual Cortex Activation in Individuals With Amblyopia. *Neurorehabil Neural Repair* 27, 760-769.

Sekhar, G.C.; Naduvilath, T.J.; Lakkai, M.; Jayakumar, A.J.; Pandi, T. Mandal, A.K. & Honavar, S.G. (2000). Sensitivity of swedish interactive threshold algorithm compared with standard gfull threshold algorithm in Humphrey visual field testing. *Ophthalmology*, 107, 1302 – 1308.

Sutter, E.E. (1991). The fast m-transform: a fast computation of cross correlations with binary m-sequences. *Soc Ind, Appl Math*, 20, 686-694.

Shapley, R., and Hawken, M. (2011). Color in the cortex: single- and double-opponent cells. *Vision Research* 51, 710-717.

Shostak, Y., Ding, Y., Mavity-Hudson, J., Casagrande, V., (2002). Cortical Synaptic Arrangements of the Third Visual Pathway in Three Primate Species: *Macaca mulatta*, *Saimiri sciureus*, and *Aotus trivirgatus*. *Journal of Neuroscience* 22, 2885-2893.

Sincich, L.C., and Horton, J.C. (2005). The circuitry of V1 and V2: integration of color, form, and motion. *Annual Review of Neuroscience* 28, 303–326.

- Stagg, C.J. & Nitsche, M.A. (2011). Physiological basys of transcranial direct current stimulation. *The neurocientist*, 17, 37-53.
- Ukueberuwa, D. & Wassermann, E. (2010). Direct current brain polarization: A simple, noninvasive technique for human neuromodulation. *Neuromodulation*, 13, 168-173.
- Varga, E., Kaya, E., Antal, A., Zimmer, M., Harza, I., Paulus, W., and Kovacs, G. (2007). Cathodal transcranial direct current stimulation over the parietal cortex modifies facial gender adaptation. *Clinical Neuroscience* 60, 474-479.
- Ventura, D. F., Silveira, L. C. L., Rodrigues, A. R., Gualtieri, M., Souza, J. M., Bonci, D. M. O., Costa, M. F. (2003). "Preliminary norms for the Cambridge Colour Test", in *Normal and Defective Colour Vision*, ed. Oxford University Press, 327-334.
- Wachtler, T., Sejnowski, T.J., and Albright, T.D. (2003). Representation of color stimuli in awake macaque primary visual cortex. *Neuron* 37, 681– 691.
- Wani, J.S.; Mir, M.S. & Nasti, A.R. (2005). Automated Perimetry: Interpreting the data. *Jk-Practitioner*, 2005, 12, 219-223.
- Xu, X., Ichida, J., Allison, J., Boyd, J., Bonds, A., and Casagrande, V., (2001). A comparison of koniocellular, magnocellular and parvocellular receptive field properties in the lateral geniculate nucleus of the owl monkey. *Journal of Physiology* 531, 203-218.
- Yuen, T.G.H.; Agnew, W.F.; Bullara, J.A.; Jacques, S. & McCreery,D.B. (1981). Histological evaluation of neural damage from electrical stimulation: Considerations for the selection of parameters for clinical applications. *Neurosurgery*, 9, 292-301.
- Zaghi, S.; Acar, M.; Hultgren, B.; Boggio, P.S. & Fregni, F. (2009). Noninvasive brain stimulation with low-intensity electrical currents: Putative mechanisms of action for direct and alternating current stimulation. *The neurocientist*.
- Zheng X, Alsop DC, Schlaug G. (2011). Effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on human regional cerebral blood flow. *Neuroimage* 58, 26-33
- Zemon V, Kaplan E, Ratliff F (1980) Bicuculline enhances a negative component and diminishes a positive component of the visual evoked cortical potential in the cat. *PNAS* , 77, 7476-7478.