

LAÍS BORALLI RAZZA

**Efeitos da combinação de técnicas de estimulação
transcraniana não-invasivas sobre o córtex pré-frontal: um
estudo fatorial, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. André Russowsky
Brunoni

SÃO PAULO

2021

LAÍS BORALLI RAZZA

**Efeitos da combinação de técnicas de estimulação
transcraniana não-invasivas sobre o córtex pré-frontal: um
estudo fatorial, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. André Russowsky
Brunoni

SÃO PAULO

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Razza, Lais Boralli

Efeitos da combinação de técnicas de estimulação transcraniana não-invasivas sobre o córtex pré-frontal : um estudo fatorial, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado / Lais Boralli Razza. -- São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Psiquiatria.

Orientador: André Russowsky Brunoni.

Descritores: 1.Estimulação cerebral 2.Estimulação transcraniana por corrente contínua 3.Córtex pré-frontal 4.Cognição 5.Neuroimagem 6.Intervenções combinadas

USP/FM/DBD-416/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedico esta tese a todas as pessoas que reconhecem a real importância do
conhecimento científico.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho científico só foi possível devido ao envolvimento direto e indireto de diversas pessoas. Agradeço-às imensamente por terem tornado esta pesquisa possível:

Ao Professor André R. Brunoni, meu orientador, por me despertar o interesse pelo campo da pesquisa científica, por ser meu guia e mestre ao longo dos anos que trabalhamos juntos, por me apoiar e por sempre ter acreditado em mim. Gratidão eterna.

Ao Professor Carlos A. Buchpiguel por ter confiado na minha capacidade de conduzir esta pesquisa científica e por disponibilizar a infraestrutura para que este trabalho pudesse acontecer.

Aos meus colegas do Serviço Interdisciplinar de Neuromodulação, pela amizade, conselhos e aprendizados que jamais me esquecerei.

À Sandra Falcon, pelos cuidados e organização impecável com a coleta dos dados desta pesquisa.

Às secretárias, enfermeiras e biomédicas da Divisão de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do HCFMUSP, que se dedicaram para que este projeto tivesse todas as condições necessárias para a sua realização.

Ao Dr. Fábio Duran, pela dedicação com as análises de neuroimagem deste projeto.

Aos voluntários da pesquisa, por terem reconhecido este trabalho, o qual sem eles não teria sido possível de acontecer.

À Yolanda Maria, pelo apoio incondicional.

À minha irmã, Lara, pela paciência ao longo desta jornada.

Aos meus pais, Calixto e Dulce, por tudo. Sem eles nada seria possível.

À Claudia, minha companheira de vida, por me incentivar, apoiar e acreditar em mim em todos os momentos, até quando eu mesmo duvidei.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto de pesquisa (2018/10861-7) e pela bolsa de Doutorado que me foi concedida (2019/07256-7). Também agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa recebida no começo desta jornada. Sem o incentivo financeiro destas instituições públicas, esta pesquisa não poderia ter sido realizada.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	<i>Accuracy</i> (Acurácia)
BA	<i>Brodman Area</i> (Área de Brodmann)
BDI	<i>Beck Inventory Depression</i> (Inventário de Depressão de Beck)
BOLD	<i>Blood oxygen level dependent signal</i> (Sinal dependente do nível de oxigenação sanguínea)
CPF	Córtex pré-frontal
CPF _{DL}	Córtex pré-frontal dorsolateral
cTBS	<i>Continuous Theta-Burst Stimulation</i> (Estimulação Theta-Burst Contínua)
ECD	Dicloridrato de etilenocisteína dietiléster
ECT	Eletroconvulsoterapia
EEG	Eletroencefalograma
EMT	Estimulação Magnética Transcraniana
EMTr	Estimulação Magnética Transcraniana Repetitiva
ETCC	Estimulação Elétrica por Corrente Contínua
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
GABA	<i>Gamma-AminoButyric Acid</i> (Ácido gama-aminobutírico)
HAMD	<i>Hamilton Depression Rating Scale</i> (Escala de Depressão de Hamilton)
Hz	Hertz
iTBS	<i>Intermittent Theta-Burst Stimulation</i> (Estimulação Theta-Burst Intermitente)
MNI	<i>Montreal Neurological Institute</i>
NMDA	<i>N-methyl-d- aspartate</i>
LM	Limiar motor
LM _r	Limiar motor de repouso

LTD	<i>Long-term Depression</i> (Depressão de longa-duração)
LTP	<i>Long-term Potentiation</i> (Potenciação de longa-duração)
mA	Miliamperes
PANAS	<i>Positive and Negative Affect Schedule</i> (Escala de Afeto Positivo Afeto Negativo)
PEM	Potencial Evocado Motor
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografia Computadorizada por Emissão de Póstron)
ROI	<i>Regions of Interest</i> (Regiões de Interesse)
RM	Ressonância Magnética
RT	<i>Reaction Time</i> (Tempo de reação)
TBS	<i>Theta-Burst Stimulation</i> (Estimulação Theta-Burst)
SPECT:	<i>Single-photon emission computerized tomography</i> (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único)
^{99m} Tc	Bicisato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Técnicas de Neuromodulação	3
Figura 2. Cartaz promovendo o uso da eletroterapia. Extraído de Brunoni et al 2016 [10]......	5
Figura 3. Alterações na atividade neural do córtex de gato. Extraído de Purpura and McMurtry, 1965 [12]......	6
Figura 4. Dispositivo de ETCC e seus componentes.	12
Figura 5. Diferentes métodos de estimulação elétrica transcraniana.	13
Figura 6. Efeitos da ETCC anódica e catódica aplicadas sobre o córtex motor de sujeitos saudáveis. Extraída de Nitsche e Paulus, 2000 [17].	18
Figura 7. Dispositivo de EMT e seus componentes.....	24
Figura 8. Modelo de funcionamento da EMTr.....	30
Figura 9. Alteração dos potenciais evocados motores após aplicação de protocolos de TBS. Adaptado de Huang et al 2005 [25].	33
Figura 10. Incidência de efeitos adversos reportados durante estudos com iTBS. Adaptado de Oberman et al 2011 [126]......	48
Figura 11. Desenho fatorial deste estudo.	51
Figura 12. Sequência da aquisição dos dados deste projeto. Adaptado de Razza et al 2021 [133]......	53
Figura 13. Sub-regiões do córtex pré-frontal dorsolateral. Extraído de Bulubas et al 2019 [105]......	68
Figura 14 . Ativação em região orbitofrontal esquerda com aplicação de protocolo de ETCC.	72
Figura 15. Ativação em região orbitofrontal direita com aplicação de protocolo de ETCC.	72
Figura 16. Ativação em região esquerda do córtex cingulado anterior com aplicação de protocolo de Intervenções Combinadas.	73
Figura 17. Ativação em região direita do córtex cingulado posterior com aplicação de protocolo de Intervenções Combinadas.	73
Figura 18. Ativação em ínsula esquerda.	74
Figura 19. Diferença de desempenho em tempo de reação ao longo das sessões.	76
Figura 20. Média de (A) tempo de reação e (B) acurácia entre os protocolos.	77
Figura 21. Ativação em córtex temporal esquerdo	78
Figura 22. Performance no teste de memória operacional com análises fatoriais. A) Mudança de escore residual para acurácia; B) Mudança de escore residual para tempo	

de reação; C) Influência do fator iTBS sobre tempo de reação; D) Influência do fator ETCC sobre o tempo de reação. 79

Figura 23. Esforços metodológicos que influenciam na variabilidade de resposta de estudos com estimulações não-invasivas. Extraído de Polanía et al. [156] 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros das técnicas de EMTr.	27
Tabela 2. Estudos que combinaram a ETCC sobre o córtex pré-frontal dorsolateral em combinação com outras terapias.	42
Tabela 3. Incidência de efeitos adversos em estudos com ETCC. Adaptado de Sudbrack-Oliveira et al. 2021 [121].	45
Tabela 4. Dados demográficos e clínicos globais dos participantes incluídos.	70
Tabela 5. Média dos escores de medidas de linha de base por sessão.	71
Tabela 6. Resultados das análises de variância de uma via com os dados de todas as sessões.	75
Tabela 7. Resultados das análises fatoriais com os dados de todas as sessões.	75
Tabela 8. Resultados da análise de variância de uma via com dados da sessão um.	77
Tabela 9. Incidência de efeitos colaterais por protocolo aplicado.	81

RESUMO

Razza LB. *Efeitos da combinação de técnicas de estimulação transcraniana não-invasivas sobre o córtex pré-frontal: um estudo fatorial, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado [tese].* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: As técnicas de estimulação cerebral não invasivas têm sido cada vez mais usadas para estimular o córtex pré-frontal (CPF), com achados mistos nos campos da neurociência cognitiva e afetiva. Por sua vez, protocolos inovadores sugerem que a combinação de técnicas de neuromodulação pode otimizar as mudanças na atividade cerebral. No entanto, ainda não há conhecimento científico suficiente sobre a combinação de diferentes intervenções de estimulação transcraniana não-invasiva sobre o CPF. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da aplicação de protocolos isolados e combinados de estimulação elétrica por corrente contínua (ETCC) e estimulação theta-burst intermitente (iTBS) sobre a porção dorsolateral do CPF (CPFDL) esquerdo de voluntários saudáveis por meio de técnica de neuroimagem e testes cognitivos. As regiões cerebrais de interesse nos achados de neuroimagem foram o córtex pré-frontal e suas sub-regiões, córtex cingulado, ínsula e córtex temporal. **Método:** Estudo fatorial, randomizado, duplo-cego, controlado. Os participantes receberam quatro protocolos distintos de estimulação (ETCC isolada, iTBS isolada, Intervenções Combinadas e Placebo), uma vez por semana, sobre o CPFDL localizado por neuronavegação estrutural. A ETCC foi aplicada com uma corrente de 2mA por 20 minutos e a iTBS com 1620 pulsos, por 9 minutos. Em todos os protocolos, a ETCC foi concomitantemente aplicada com iTBS durante os 9 minutos finais. Um radiofármaco (dímero de etilcisteinato marcado tecnécio-99m) foi administrado logo após o início do protocolo de iTBS. Uma escala de efeitos adversos e o teste de memória operacional (*n-back*) foram aplicados após o final da sessão de neuroestimulação, enquanto a Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) foi realizada com até 45 minutos do final da sessão de neuromodulação. **Resultados:** Ao todo, 25 sujeitos foram incluídos (idade média =28.6 anos (desvio padrão (DP) = 7), sendo que 23 receberam todas as sessões de estimulação e 2 deles apenas a primeira, somando um total de 94 sessões realizadas. Comparados ao protocolo placebo, os achados de neuroimagem mostraram que as intervenções combinadas alteraram significativamente regiões mais profundas como o córtex cingulado anterior esquerdo ($p= 0.03$) e posterior direito ($p=0.02$), enquanto o protocolo de ETCC modulou o córtex orbitofrontal direito ($p=0.02$) e esquerdo ($p=0.04$). A comparação direta entre protocolos ativos mostrou a ETCC aumentando a ativação em orbitofrontal direito em comparação com a iTBS ($p=0.02$). Em comparação com a ETCC, iTBS ($p=0.03$) e as intervenções combinadas ($p=0.03$) aumentaram a ativação em ínsula esquerda, enquanto iTBS ativou córtex frontal medial superior ($p=0.006$). O protocolo de intervenções combinadas teve ativação superior ao iTBS em córtex temporal esquerdo ($p=0.04$). Os achados de cognição, por sua vez, foram conduzidos apenas com o *subset* da primeira sessão e apresentaram resultados significativos para tempo de reação entre os protocolos ($p=0.02$), mas análises de múltiplas comparações não foram conduzidas pela pequena amostra. Entretanto,

análises fatoriais mostraram o fator iTBS, mas não o fator ETCC, significativamente influenciando o tempo de reação. Finalmente, os protocolos ativos foram similarmente toleráveis. **Conclusão:** Os achados deste estudo encorajam futuros estudos: 1) na aplicação do protocolo combinado em estudos fase-II com população psiquiátrica; 2) investigação mais ampla dos efeitos do protocolo iTBS sobre a performance cognitiva; 3) condução de estudos explorando a variabilidade da resposta da ETCC.

Descritores: Estimulação cerebral; Estimulação transcraniana por corrente contínua; Córtex pré-frontal; Cognição; Neuroimagem; Intervenções combinadas.

ABSTRACT

Razza LB. *Effects of combined transcranial stimulation interventions of the prefrontal cortex: a factorial, randomized, double-blind, sham-controlled trial* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Background: Non-invasive brain stimulation (NIBS) approaches have been increasingly used to target the prefrontal cortex (PFC), with mixed results in the fields of cognitive and behavioral neuroscience. Recent studies suggest that the combination of distinct NIBS techniques may maximize required changes in brain activity. However, there is insufficient scientific knowledge regarding the combination of different NIBS targeting the PFC. **Aim:** To evaluate the application of standalone and combined protocols of transcranial direct current stimulation (tDCS) and intermittent theta-burst stimulation (iTBS) over the left dorsolateral PFC (DLPFC) of healthy volunteers through neuroimaging and cognitive measures. The brain regions of interest for the neuroimaging outcome were the PFC and its sub-regions, the cingulate cortex, insula and the temporal cortex. **Methods:** A factorial, randomized, double-blind, sham-controlled design was conducted. Participants received four different stimulation protocols (tDCS, iTBS, Combined Interventions and Placebo), once a week, over the DLPFC located by structural neuronavigation. TDCS was applied with a current of 2mA for 20 minutes and iTBS with 1620 pulses for 9 minutes. TDCS was applied alone for eleven minutes and concomitantly applied with iTBS for the remaining nine minutes. A radiopharmaceutical (99mTc-ethyl cysteinyl dimer - 99mTc-ECD) was administered immediately after the start of the iTBS protocol. An adverse effects scale and the working memory test (n-back) were applied right after the end of the neurostimulation session, while the Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) was performed within 45 minutes after the end of the neurostimulation session. **Results:** Twenty-five adults with a mean age of 28.6 years (standard deviation (SD) = 7) were included. Of those, 23 underwent 4 NIBS sessions while 2 of them underwent only the first session, with a total of 94 sessions being performed. The neuroimaging findings showed that the combined intervention significantly modulated deeper regions of the PFC, such as the left anterior ($p=0.03$) and the right posterior cingulate cortex ($p=0.02$), while the tDCS protocol increased the blood flow of the orbitofrontal right ($p=0.02$) and left cortex ($p=0.04$) in comparison with the placebo protocol. The comparison among active protocols showed that tDCS increased the activation in the right orbitofrontal cortex only over iTBS ($p=0.02$). In comparison to the tDCS protocol, iTBS increased blood flow in the superior medial frontal cortex ($p=0.006$) and both iTBS and combined interventions increase activation in the left insula ($p=0.03$). Finally, combined interventions were superior to the iTBS in the left temporal cortex ($p=0.04$). The cognition findings were conducted only with the subset of the first session and showed significant reaction time among protocols ($p=0.02$). Due to the small sample size, multiple comparisons analysis was not conducted. However, factorial analysis showed iTBS main effects, but not the tDCS main effects, significantly influencing the reaction time. Finally, all active protocols were similarly tolerable. **Conclusion:** The findings of this study encourage future studies: 1) for the application of the combined protocol in phase-II studies with a psychiatric

population; 2) broader investigation of the effects of the iTBS protocol on cognitive performance; 3) conducting studies exploring the variability of tDCS response.

Descriptors: Brain stimulation; Transcranial current direct stimulation; Prefrontal cortex; Cognition; Neuroimaging; Combined interventions.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Estado da arte.....	1
2. HISTÓRICO DA NEUROMODULAÇÃO NÃO-INVASIVA TERAPÊUTICA.....	4
2.1 Início do uso da eletricidade como tratamento	4
2.2 A Estimulação Elétrica por Corrente Contínua (ETCC) Moderna	7
2.3 A Estimulação Magnética Transcraniana (EMT) Moderna	8
3. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA POR CORRENTE CONTÍNUA.....	11
3.1 Aspectos técnicos e parâmetros	11
3.2 Mecanismos de ação	16
3.2.1 Neuroimagem	21
4. ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA TRANSCRANIANA REPETITIVA.....	24
4.1 Aspectos Técnicos e Parâmetros	24
4.2 Mecanismos de ação da EMTr	29
4.2.1 Estimulação <i>Theta-Burst</i> (TBS).....	32
5. EFEITOS DA ETCC SOBRE O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	35
5.1 Efeitos clínicos da ETCC sobre o córtex pré-frontal	35
5.2 ETCC como terapia combinada sobre o córtex pré-frontal.....	38
6. COMBINAÇÃO DA ETCC E EMTr	43
7. PERFIL DE SEGURANÇA E TOLERABILIDADE DAS TÉCNICAS.....	45
8. SPECT	49
9. OBJETIVOS.....	51
10. MATERIAS E MÉTODOS.....	53
10.1 Desenho do Estudo.....	53
10.2 Estratégia de Recrutamento	54
10.3 Sujeitos	55
10.4 Aleatorização e Alocação.....	56
10.5 Procedimentos	56
10.5.1 Protocolo de ETCC.....	58
10.5.2 Protocolo do iTBS.....	59

10.5.3	Cegamento	59
10.5.4	Teste de memória operacional <i>n-back</i>	60
10.5.5	Questionário de Efeitos Adversos	62
10.5.6	SPECT	63
10.5.7	Ressonância Magnética	64
10.6	Cálculo Amostral	64
10.7	Análises Estatísticas	65
10.7.1	Regiões do Córtex Pré-Frontal	67
11.	RESULTADOS	69
11.1	Participantes	69
11.2	Objetivo primário: Neuroimagem	71
11.2.1	Comparação com o protocolo placebo	72
11.2.2	Comparação entre protocolos ativos	74
11.3	Objetivo Secundário: Memória Operacional	75
11.4	Análises Secundárias	78
11.4.1	Neuroimagem: Análise Fatorial	78
11.4.2	Memória Operacional: Análise Fatorial	78
11.5	Segurança e tolerabilidade	80
12.	DISCUSSÃO	82
12.1	Achados de Neuroimagem	82
12.2	Achados de Cognição	86
12.3	Segurança e tolerabilidade	89
12.4	Pontos fortes e limitações do estudo	89
12.5	Variabilidade Metodológica e Reprodutibilidade	90
13.	CONCLUSÃO	93
14.	REFERÊNCIAS	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estado da arte

As estimulações cerebrais não-invasivas são modalidades de intervenção não farmacológicas emergentes no campo da psiquiatria e da neurociência afetiva. Estas técnicas apresentam um excelente perfil de segurança e tolerabilidade e não requerem cirurgia, como técnicas invasivas de neuromodulação (Figura 1). A verificação de seus efeitos sobre o córtex pré-frontal (CPF) vem sendo progressivamente investigados, uma vez que esta região está diretamente envolvida em processos psicológicos complexos, incluindo domínios cognitivos e afetivos. A porção dorsolateral do CPF (CPF_{DL}), por sua vez, tem sido o principal alvo para a aplicação das técnicas em ensaios clínicos por ser considerada um centro chave de acesso à regiões subcorticais, límbicas e da rede frontoparietal (do inglês, *FPN*), que está diretamente implicada na regulação de uma infinidade de processos cognitivos, como tomada de decisão, memória de trabalho e controle cognitivo, além de apresentar funcionalidade cerebral desequilibrada em transtornos de humor, como a depressão. Nesse sentido, o racional para a estimulação do CPF_{DL} está implicado não apenas na modulação de regiões corticais, mas também na modulação de regiões mais profundas, que podem contribuir diretamente para o tratamento de diversos transtornos neuropsiquiátricos.

Atualmente, existem diversos métodos de estimulação cerebral não-invasiva baseados em abordagens distintas (Figura 1). Um destes métodos é a estimulação elétrica por corrente contínua (ETCC), técnica que gera correntes elétricas de baixa intensidade, capazes de modular a atividade cerebral. Embora promissora no campo da neurociência, principalmente para o tratamento da depressão, seus achados sobre o CPF são heterogêneos. Na verdade, como a técnica modula a atividade espontânea das células por meio de alterações subliminares dos potenciais de membrana em

repouso, novos estudos pressupõem que a ETCC pode induzir efeitos mais robustos como terapia adjuvante, ou complementar, a outras intervenções terapêuticas.

Estudos recentes combinando a ETCC sobre o CPFDL com abordagens neuropsicológicas, como treinos cognitivos e psicoterapias, vêm apresentando resultados animadores, mostrando que a combinação da ETCC com outras técnicas terapêuticas pode, de fato, resultar em modulação robusta do CPF e neurocircuitarias associadas. Interessantemente, a associação de ETCC com outras técnicas não invasivas de neuromodulação, como a estimulação magnética transcraniana repetitiva (EMTr), foi vagamente investigada sobre o CPF.

Por outro lado, alguns estudos já avaliaram os efeitos da aplicação simultânea ou combinada das técnicas sobre o córtex motor de sujeitos saudáveis. No geral, os estudos concluíram que a combinação das técnicas gerou efeitos mais robustos (na maioria das vezes medidos via eletromiografia) quando comparadas às estimulações como monoterapia, sendo considerada segura e bem tolerável. Entretanto, estudos fundamentais investigando os mecanismos da aplicação dual de técnicas de neuromodulação não-invasiva sobre o CPF ainda estão faltando.

Esta tese, portanto, discorre sobre um ensaio aleatorizado, controlado, fatorial e duplo cego que avaliou a aplicação isolada e combinada da ETCC) e da estimulação theta-burst intermitente (do inglês, iTBS) - uma modalidade de EMTr -, em sujeitos jovens adultos saudáveis, utilizando medidas de neuroimagem e teste cognitivo de memória operacional. Apesar de um único estudo prévio ter avaliado a combinação da ETCC e da iTBS sobre o CPFDL de sujeitos saudáveis por meio de medidas de estresse, nenhum estudo investigou os efeitos das duas técnicas concomitantemente aplicadas sobre o por meio de métodos de neuroimagem e testes cognitivos.

Portanto, para a melhor organização do leitor sobre os objetivos e hipóteses deste trabalho, inicio esta tese apresentando os aspectos históricos das duas técnicas

de neuromodulação envolvidas neste projeto, seus aspectos técnicos e mecanismos de ação. Após, comentarei sobre o uso clínico das técnicas e suas limitações, com especial atenção para os achados com a ETCC. Discorrerei sobre o racional para o uso combinado das técnicas sobre o CPFDL e, por fim, comento sobre os perfis de tolerabilidade e segurança das duas técnicas.

Após estes tópicos, a metodologia do estudo será apresentada. Também serão considerados aspectos como cálculo amostral, alocação e aleatorização dos participantes, cegamento dos participantes e do pessoal envolvido na pesquisa e condução da aplicação do teste cognitivo e aquisição de neuroimagem. Aspectos sobre as análises estatísticas também serão comentados.

Por fim, apresentarei os tópicos que versam sobre os resultados deste projeto, a discussão dos mesmos e a conclusão da tese, com enfoque nas implicações básicas e clínicas que os achados deste estudo trarão para a literatura do campo.

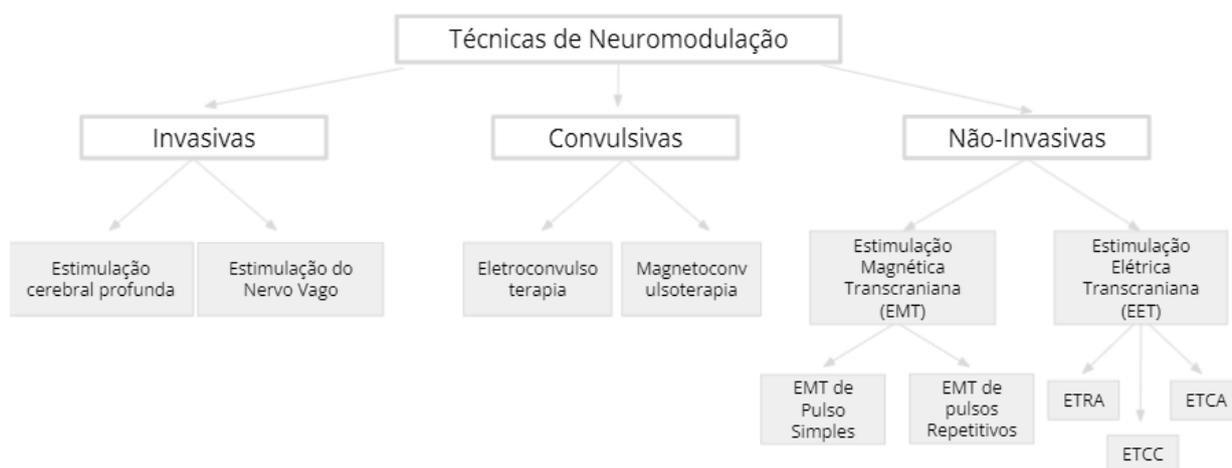


Figura 1. Técnicas de Neuromodulação

2. HISTÓRICO DA NEUROMODULAÇÃO NÃO-INVASIVA TERAPÊUTICA

2.1 Início do uso da eletricidade como tratamento

A aplicação de correntes elétricas no escalpo com fins terapêuticos antecede em quase 2 mil anos o desenvolvimento de qualquer dispositivo capaz de gerar e fornecer estimulação elétrica controlada aos tecidos biológicos, quando o médico romano Scribonius Largus descreveu em sua obra *Compositiones*, escrita por volta de 47 dC, o uso do ‘peixe-torpedo’ aplicado sobre o escalpo de pacientes com o objetivo de tratar dores de cabeça e outras doenças [1,2]. O ‘peixe-torpedo’ é capaz de liberar uma corrente elétrica com o objetivo de paralisar as suas presas e seus efeitos terapêuticos em humanos eram apreciados entre os médicos antigos [3]. No entanto, dispositivos capazes de gerar e descarregar correntes elétricas transitórias (ex. máquinas de fricção) foram desenvolvidos apenas mais tarde na Europa, por volta do século XVII. O uso de eletricidade como tratamento foi amplamente promovido entre 1750 e 1950 por ser uma técnica mais barata do que os tratamentos da época, como sangria, ópio, entre outras [4]. A terapia elétrica, na época, era utilizada de forma incipiente para inúmeras condições clínicas (desde epilepsia a dor dentária) e muitas vezes com resultados variáveis e questionáveis [5]

O uso da eletricidade como forma terapêutica se mistura ao mesmo período da descoberta da eletricidade propriamente dita. No século XVIII, o médico e professor italiano Luigi Galvani, publicou um dos seus experimentos mais famosos em que demonstrou a ocorrência de contração muscular ao colocar dois metais em contato com o nervo interno da coxa de uma rã [6]. Neste experimento, Galvani acreditou, erroneamente, na existência de uma eletricidade animal inerente. Posteriormente, coube ao professor, químico e físico, Alessandro Volta, retificar os postulados de Galvani, demonstrando que, na verdade, não existia uma ‘eletricidade animal’, mas, sim, que o organismo do animal havia sido um mero condutor de corrente elétrica [7]. Com

base nos estudos de Galvani, Volta acabou inventando a bateria elétrica, ou pilha voltaica, que consistia em discos metálicos alternados e sucessivos de cobre e zinco, e foi a primeira fonte artificial de corrente contínua [8]. Ele entrou para a história da eletricidade com este feito.

Seguindo os trabalhos dos dois cientistas, Giovanni Aldini, sobrinho e discípulo de Luigi Galvani, utilizou a pilha voltaica para fornecer estimulação elétrica transcraniana a pacientes com transtornos neuropsiquiátricos em experimentos pouco éticos [9], mas que acabaram contribuindo para o campo. O interesse pela eletroterapia desapareceu em grande parte do século XIX e XX, possivelmente pela falta de efeitos consistentes, crescente interesse por outras formas de terapia (ex. fármacos) e o preconceito com a intervenção. Na verdade, no fim do século XIX, a estimulação elétrica foi muito utilizada com indicações terapêuticas pouco precisas, por charlatões e curandeiros (Figura 2), levantando questionamentos sobre os resultados da intervenção.

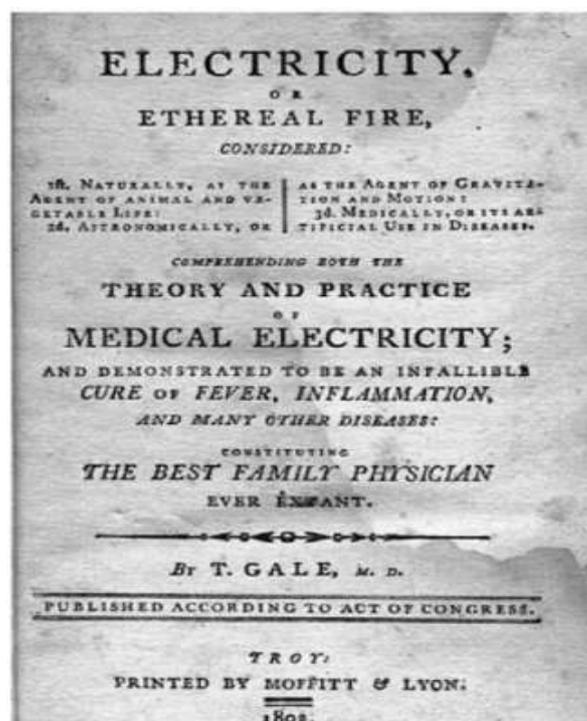


Figura 2. Cartaz promovendo o uso da eletroterapia. Extraído de Brunoni et al 2016 [10].

Por volta de 1930, a invenção da Eletroconvulsoterapia (ECT) apresentou um grande avanço no tratamento de distúrbios psiquiátricos [11] e o interesse no uso da estimulação elétrica cerebral como tratamento neuropsiquiátrico voltou a crescer, tendo sido conduzido diversos estudos sistematizados em modelos animais e humanos. Por exemplo, Purpura e McMurtry conduziram um estudo aplicando corrente elétrica em modelo animal e observaram que a estimulação elétrica anódica (positiva) aplicada sobre o córtex de gato levava a um aumento da atividade dos neurônios, enquanto a estimulação catódica (negativa) induzia efeitos opostos (Figura 3) [12][13].

Concomitantemente, a estimulação elétrica no cérebro humano era estudada pelo neurocirurgião canadense, Wilder Penfield, que, durante suas cirurgias, acordava seus pacientes e aplicava uma corrente elétrica em pontos de interesse do córtex. Com essa técnica, Penfield foi capaz de mapear representações somatotópicas do corpo humano nos córtex motor e sensorial, mapeamento até hoje amplamente utilizado e conhecido como 'Homúnculos de Penfield' [14].

Entretanto, o interesse pelas técnicas voltou a diminuir na década de 1970, principalmente devido à aplicação inadequada da ECT, ao movimento antipsiquiátrico, e ao aumento da disponibilidade de medicações psiquiátricas naquela época [15].

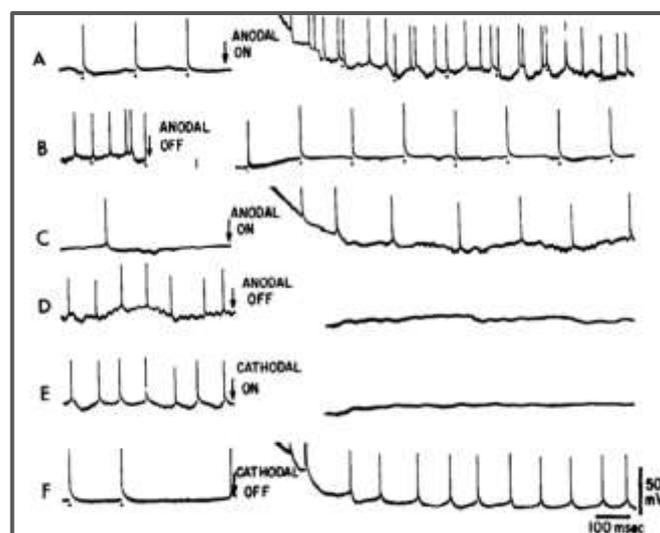


Figura 3. Alterações na atividade neural do córtex de gato. Extraído de Purpura and McMurtry, 1965 [12].

2.2 A Estimulação Elétrica por Corrente Contínua (ETCC) Moderna

A ETCC ressurgiu na virada do século XXI, após estudos seminais realizados por Priori e colegas em 1998 [16] e Nitsche e Paulus em 2000 [17], que mostraram que a excitabilidade do córtex motor de indivíduos saudáveis poderia ser modulada em por meio da aplicação de correntes elétricas de baixa intensidade sobre o couro cabeludo que recobre o giro pré-central - onde o córtex motor primário (M1) está localizado. No primeiro estudo, Priori e colegas realizaram diversos experimentos com um total de 15 sujeitos saudáveis. Os autores aplicaram estimulação anódica alternada com estimulação catódica sobre o córtex motor (7 cm lateralmente ao vertex) com corrente < 0.5 mA, duração de 7 segundos e eletrodos de 25 cm^2 , e avaliaram seus efeitos nos potenciais evocados motores (PEMs) por meio de pulsos magnéticos simples, gerado por um aparelho de EMT. Os achados apontaram para a diminuição de excitabilidade em M1 quando a estimulação anódica era precedida de estimulação catódica, provando que uma corrente de intensidade baixíssima poderia passar o crânio e influenciar a atividade do cérebro.

Posteriormente, Nitsche e Paulus (2000), utilizando o mesmo método com pulsos magnéticos simples, mensuraram as alterações da excitabilidade cortical produzidas por estimulação anódica e catódica com intensidades maiores sobre M1 de sujeitos saudáveis. Os pesquisadores encontraram aumento de excitabilidade cortical após aplicação de estimulação anódica, enquanto a estimulação catódica diminuiu a excitabilidade cortical. Este estudo é considerado pioneiro para o surgimento da ETCC moderna e será melhor detalhado na seção de 'mecanismos de ação da ETCC'.

Entretanto, após a publicação desse artigo, no ano de 2000, observa-se uma expansão da produção científica investigando os efeitos da ETCC para diversas finalidades. Em uma busca sistemática no banco de dados *Web of Science*, foi realizada

uma busca sistemática com as palavras-chave *'transcranial direct current stimulation'*, *'transcranial electric stimulation'* e *'direct current stimulation'*, desde a primeira publicação disponível, até o dia 01 de outubro de 2021. Foram encontrados apenas 16 estudos publicados até 2000, enquanto de 2000 até 2010, um total de 107 estudos foram publicados. Por sua vez, de 2010 até a atual busca, 1334 estudos foram publicados em diversos campos de pesquisa. Isso demonstra que a ETCC moderna vem gradativamente se fortalecendo como uma ferramenta investigativa nas neurociências, em outros campos de pesquisa e com desenvolvimento de novas possibilidades, entre elas, sua combinação com outras ferramentas terapêuticas.

2.3 A Estimulação Magnética Transcraniana (EMT) Moderna

A primeira observação clínica da aplicação de estimulação magnética no cérebro de uma pessoa foi realizada por D'Arsonval em 1896, que descreveu casos de voluntários relatando fosfenas e vertigens quando submetidos a campos eletromagnéticos intensos [18]. Entretanto, o desenvolvimento e aplicação biomédica de um aparelho capaz de produzir campos eletromagnéticos e modificar a atividade cerebral só foi publicado em 1985, por A. Barker e colegas [19]. Neste estudo, os autores utilizaram um aparelho não invasivo que induzia pulsos eletromagnéticos fortes que excitavam o córtex motor dos sujeitos, causando movimentos involuntários em regiões do corpo que correspondiam às regiões do córtex estimuladas.

A EMT, desenvolvida por Barker e colegas (1985), baseia-se no princípio de indução eletromagnética de Faraday, em que uma corrente elétrica com intensidade variável no tempo, quando atravessa um fio condutor de uma bobina, gera um campo magnético perpendicular (ou ortogonal) ao plano dessa corrente [20]. Quando a bobina é posicionada sobre o escalpe, o campo magnético gerado é capaz de atravessar a

pele, crânio e meninges, sem sofrer atenuação, atingindo o córtex cerebral. Como o tecido nervoso é um meio condutor de eletricidade, a variação no tempo do campo magnético gera no córtex cerebral uma corrente elétrica secundária. Esta possui direção perpendicular ao campo magnético (e.x. paralela à orientação da corrente da bobina) e, a depender da intensidade, é capaz de gerar despolarização neuronal, preferencialmente no compartimento axonal, e de elicitar potenciais de ação na população de neurônios localizada logo abaixo da bobina.

Inicialmente, a EMT tinha o propósito de ser uma ferramenta diagnóstica, a fim de estudar a condução motora de pacientes com lesões neurológicas. No início de seu uso como ferramenta diagnóstica eram realizados pulsos únicos e media-se o tempo de condução motora, desde o estímulo aplicado ao córtex, até a resposta periférica [21]. Porém, no início dos anos 90, Pascual-Leone e colegas começaram a investigar os efeitos terapêuticos da EMT em uma modalidade primeiramente chamada de *rapid-rate* EMT, atualmente conhecida como EMT repetitiva (EMTr) [22,23]. Tal técnica é capaz de gerar múltiplos pulsos em diferentes frequências, o que possibilita o emprego de protocolos estimulatórios capazes de induzir modificações duradouras na excitabilidade neuronal do córtex cerebral. Os protocolos da EMTr que apresentam frequência de estímulo igual ou superior a 5 pulsos por segundo (Hz) são classificados como 'excitatórios'. Estes protocolos são conhecidos como EMTr de alta frequência, enquanto protocolos com emprego de protocolos com frequências de pulso mais baixas, da ordem de 1 Hz ou menos, são 'inibitórios' e conhecidos como EMTr de baixa frequência.

Em meados da década de 90, foi publicado o primeiro estudo piloto investigando os efeitos da EMTr para a melhora do quadro depressivo [24]. Após este estudo, quase 40 ensaios clínicos foram conduzidos a fim de investigar a eficácia e segurança da EMTr para o tratamento da depressão, até a técnica ter sido efetivamente aprovada para uso clínico pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 2008.

Mais recentemente, em 2005, Huang e colegas investigaram os efeitos de uma nova modalidade de EMTr sobre o córtex motor de sujeitos saudáveis, conhecida como estimulação por *theta-burst* (do inglês, TBS) [25]. Este protocolo padronizado já havia demonstrado capacidade de induzir plasticidade neuronal em modelos animais. Entretanto, apenas em 2005 os pesquisadores conseguiram mostrar que a TBS intermitente (iTBS) e a TBS contínua (cTBS) eram capazes de, respectivamente, aumentar e diminuir a excitabilidade cortical em humanos. Este estudo foi pioneiro para investigações futuras da TBS como ferramenta de tratamento para transtornos psiquiátricos e ele será melhor descrito na seção de 'mecanismos de ação'. Recentemente, a TBS também teve aprovação pelo FDA para uso clínico em quadros depressivos.

3. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA POR CORRENTE CONTÍNUA

3.1 Aspectos técnicos e parâmetros

Um dispositivo de ETCC é geralmente composto por [26] (Figura 4): 1) um aparelho de ETCC (uma fonte de corrente, controlada com um amperímetro e um potenciômetro) (Figura 4A); 2) baterias descartáveis (ou recarregáveis) ou cabo elétrico de tomada para recarregar o dispositivo; 3) pelo menos dois cabos de condução elétrica (conhecidos como ânodo (cabo vermelho) e cátodo (cabo azul) - montagens com mais de dois eletrodos são mais utilizadas com a técnica de ETCC de alta definição, conhecida como *high-definition tDCS*, que aplica pelo menos 5 eletrodos na cabeça do sujeito); 4) eletrodos de borracha que serão acoplados ao ânodo e ao cátodo e esponjas para encobrir os eletrodos de borracha (alternativamente, os eletrodos de borracha, que não tenham esponja, podem ser revestidos em gel ou creme condutor); e 5) tiaras não condutivas, conhecidas como *headband*, para fixar corretamente o eletrodo sobre as localizações cranianas desejadas [27]. Alguns *headbands* contam com um *clip* (ou pino) para a sua fixação (Figura 4B).

Primeiramente, os eletrodos são colocados no couro cabeludo do sujeito, e o fluxo de corrente elétrica (ou seja, um fluxo de cargas movendo-se através do espaço) é passado entre os eletrodos com o objetivo de modular a atividade cerebral, abaixo ou perto dos eletrodos. O ânodo é o eletrodo por onde a corrente positiva entra no corpo e o cátodo é o eletrodo por onde a corrente positiva sai do corpo [28,29]. A ETCC gera uma corrente elétrica contínua durante toda sessão, diferentemente de outras técnicas de estimulação elétrica, como a estimulação transcraniana por corrente alternada (ETCA) e estimulação transcraniana por ruído aleatório (ETRA), que apresentam flutuações no fluxo de corrente [30] (Figura 5).



Figura 4. Dispositivo de ETCC e seus componentes.

Os parâmetros da ETCC são diversos e suas combinações podem resultar em efeitos fisiológicos distintos. Os parâmetros são: 1) tamanho de eletrodo; 2) intensidade de corrente; 3) densidade de corrente; 4) tempo da sessão; 5) número de sessões e intervalo entre sessões; 6) posição dos eletrodos.

- 1) Nas montagens mais tradicionais, o tamanho dos eletrodos pode variar entre 25cm^2 a 35cm^2 , o que faz a ETCC produzir um campo de corrente pouco focal se comparada à EMT, por exemplo [31].

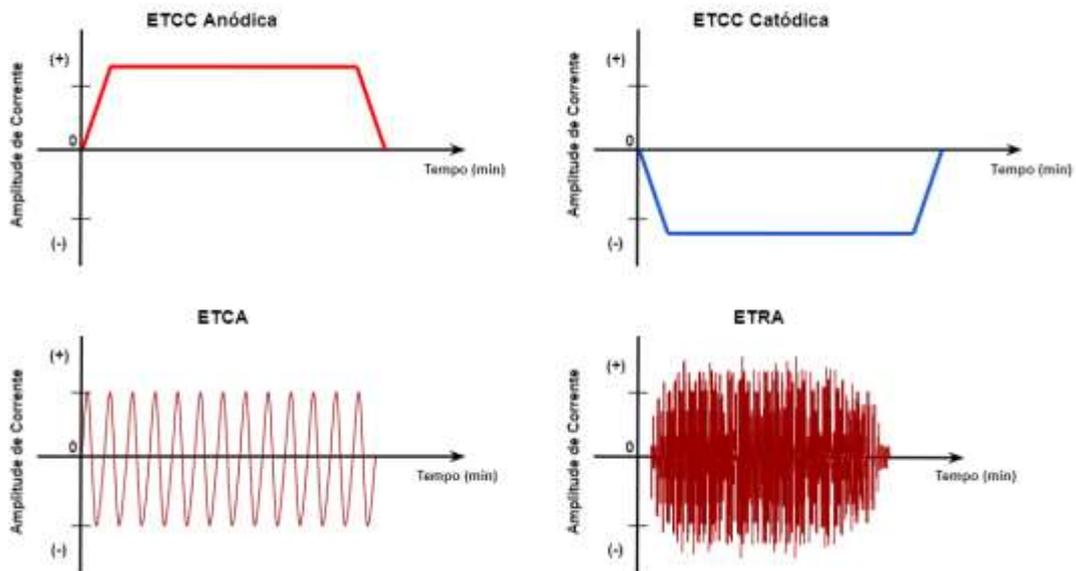


Figura 5. Diferentes métodos de estimulação elétrica transcraniana.

2) A intensidade da corrente na ETCC é medida em *amperes* - que é a quantidade de elétrons que formam uma corrente elétrica por segundo. A ETCC gera correntes baixas, da ordem de alguns *miliamperes (mA)*. Além disso, apenas uma pequena fração da corrente atinge o córtex, uma vez que sua maior parte é desviada através da pele, tecidos, músculos, meninge, líquido cefalorraquidiano e crânio. A resistência que a corrente sofre para ser distribuída pela cabeça é conhecida como 'impedância'. Quando o contato entre os eletrodos e a cabeça é fraco, uma alta impedância é verificada [32]. Alguns aparelhos de ETCC tendem a cortar a corrente quando identificam uma impedância alta. A impedância é medida em *ohms* e ela deve ser mantida abaixo de *5 Kohms* para não ser considerada impeditiva para gerar um bom fluxo de corrente.

3) A densidade de corrente, por sua vez, é calculada dividindo a intensidade da corrente pela área do eletrodo [33]. A unidade no Sistema Internacional de densidade de corrente elétrica é ampere por metro quadrado (m^2), ou A/m^2 (ou mA/cm^2). O cálculo,

desta forma, pode ser feito como segue: 2 mA dividido por 25 cm² que é igual uma densidade de corrente do eletrodo de 0,08 mA / cm².

4) O tempo de sessão é variável, podendo durar da ordem de poucos segundos a horas. Entretanto, a duração de uma sessão de ETCC para o tratamento de condições neuropsiquiátricas comumente varia de 15 a 35 minutos. Esses parâmetros são estabelecidos com base em avaliações empíricas, de estudos realizados previamente [33]. A corrente injetada é constante ao longo da sessão, com exceção das rampas de subida (*ramp-up*) e descida (*ramp-down*), que são aplicadas para evitar desconforto ao sujeito. Além disso, em casos de estimulação simulada (ou *sham*, como são conhecidas as estimulações placebo por neuroestimulação), é aplicada um *ramp-up* de alguns segundos, até atingir a intensidade de corrente desejada, e um *ramp-down* até a corrente chegar a 0 mA, e então, o aparelho é desligado. Em alguns protocolos *sham*, a impedância é monitorada até o final da sessão. Para calcular a carga elétrica dispensada durante o tempo de sessão, aplica-se a fórmula: $Q = i.t$ - sendo Q, a carga em Coulombs (C); *i*, a intensidade em amperes; *t*, tempo em segundos [34,35].

5) O número e intervalo de sessões são variáveis. A maioria dos estudos experimentais com sujeitos saudáveis avaliam o efeito agudo e de longo prazo de apenas uma sessão de estimulação, com parâmetros distintos. Em estudos *cross-over*, ou *within-subject*, as sessões geralmente têm espaçamento de uma semana (7 dias) para evitar efeitos *carry-over*, que acontece quando os resultados de uma estimulação são influenciados pelos efeitos da sessão anterior [36]. Por outro lado, em ensaios clínicos, o objetivo é induzir efeitos neuromodulatórios cumulativos, por meio de sessões diárias ou mais de uma vez ao dia, que é o caso de estudos com pacientes esquizofrênicos, que tendem a receber ETCC duas sessões por dia [37]. Entretanto, ainda não há evidências científicas comprovando quais seriam os intervalos ótimos entre as sessões, bem como o número de sessões necessárias para o tratamento agudo

de uma determinada doença [38].

6) O posicionamento/localização dos eletrodos pode ser feito de formas diversas. O método mais comum para a localização dos alvos terapêuticos na aplicação da ETCC é o Sistema 10-20 do eletroencefalograma (EEG) [39]. Esse sistema permite a localização de regiões específicas do cérebro com base em medidas anatômicas individuais (ex. diâmetro ântero-posterior (medida que vai do nábio ao ínion), diâmetro látero-lateral (utilizando o tragus como ponto de referência) e a circunferência da cabeça). Os alvos mais utilizados na neuropsiquiatria são os pontos F3 e F4, que correspondem aos córtices dorsolateral pré-frontal esquerdo e direito, respectivamente. Uma desvantagem do sistema 10-20 é que ele é um método que leva diversos minutos para ser realizado, principalmente para pessoas com pouca prática. Desta forma, um sistema mais acessível, chamado Beam-F3, foi criado com base em medidas do sistema 10-20, para facilitar a marcação dos pontos F3 e F4. O Beam-F3 é amplamente utilizado em pesquisas clínicas e já foi comprovado empiricamente ter uma excelente acurácia, comparada à sistemas de neuronavegação [40]. Os sistemas de neuronavegação são os métodos mais acurados para a localização de alvos terapêuticos, uma vez que se utilizam de Ressonâncias Magnéticas Estruturais dos sujeitos para guiar a localização do ponto que será estimulado [41]. Embora este seja o 'padrão-ouro' para a localização dos alvos terapêuticos, seu custo é elevado, o que o torna pouco utilizado em pesquisas clínicas com ETCC.

Nem sempre os dois eletrodos são posicionados na cabeça dos sujeitos. Em alguns protocolos, ânodo ou cátodo podem ser aplicados em regiões extracefálicas, como em músculo deltóide, que é um alvo recorrente para algumas condições clínicas. Dessa forma, os posicionamentos que apresentam um ou dois eletrodos no encéfalo são conhecidos como montagens 'monocefálicas' ou 'bicefálicas', respectivamente. Ademais, os eletrodos devem ser posicionados com pelo menos 7 cm de distância entre eles, para evitar um efeito *shunting*. Este efeito acontece quando a corrente passa

superficialmente entre os eletrodos, muitas vezes pelo cabelo, não penetrando até o córtex [31].

Por fim, o número, tamanho e posição dos eletrodos é conhecido como 'montagem dos eletrodos', ou apenas 'montagem'. Enquanto a 'montagem do eletrodo', corrente e duração da sessão de ETCC são os parâmetros mais essenciais para definirem a 'dose' de uma estimulação [28].

3.2 Mecanismos de ação

A ETCC é definida como uma técnica de neuromodulação não-invasiva, aplicada por um dispositivo recarregável ou operado por baterias (de 9 Volts) que produz corrente elétrica de baixa intensidade (< 4 mA), aplicada por meio de pelo menos dois eletrodos. Na forma mais convencional da ETCC, os eletrodos são aplicados no escalpo, com a corrente elétrica penetrando pelo ânodo (polo positivo) e saindo pelo cátodo (polo negativo). A corrente passa pelo cabelo, pele, tecidos subcutâneos, líquido cefalorraquidiano e osso, até atingir o cérebro [42].

Devido à baixa intensidade de corrente aplicada e à resistência das estruturas cranianas, apenas cerca de 25% da intensidade da corrente inicial atinge a massa cinzenta [43], sendo insuficiente para produzir potenciais de ação *per se*. Entretanto, estudos apontam que a ETCC é capaz de modular a atividade cortical da região do encéfalo que fica abaixo dos seus eletrodos, bem como suas redes neurais adjacentes, tendo o ânodo uma atividade facilitatória/excitatória e o cátodo atividades inibitórias [44]. Os mecanismos de ação da ETCC ainda vêm sendo evidenciados por uma série de estudos e alguns deles são apresentados a seguir.

No estudo seminal de Nitsche e Paulus (2000) [17], os pesquisadores mensuraram as alterações de excitabilidade cortical produzida por ETCC após

estimulação anódica e catódica sobre córtex motor de sujeitos saudáveis, utilizando pulsos magnéticos simples de EMT para medir os PEMs da região estimulada. O objetivo do estudo foi justamente avaliar se a aplicação de uma baixa corrente elétrica direta no córtex humano poderia modular a excitabilidade cortical, como um estudo prévio, em modelo animal, havia demonstrado que correntes elétricas eram capazes de modular o potencial de repouso da membrana neuronal, levando à hiper e despolarização de acordo com a polaridade aplicada [12]). Os autores conduziram 4 diferentes experimentos, em que variaram a polaridade dos eletrodos (aplicados no córtex motor primário e região orbital direita), intensidade (0.2 a 1 mA) e tempo de estimulação (1 a 5 min). Entretanto, estes efeitos não foram avaliados para a estimulação catódica.

Os achados apresentaram efeitos agudos polaridade-dependentes em sessões de 5 minutos aplicadas a 1mA, com ânodo aumentando os PEMs após o término da sessão de ETCC e cátodo diminuindo (Figura 6). Os valores de PEM voltaram ao patamar basal após 10 minutos do fim da sessão de estimulação. Ademais, os pesquisadores observaram que estimulação anódica apresentou intensidade-dependente (com maiores intensidades (de 0.2 até 1mA) elevado os valores dos PEMs e duração dos efeitos pós-estimulatórios) e duração-dependente (maior tempo de sessão (de 1min até 5min), maior os PEMs e maior os efeitos pós-estimulatórios). Estes efeitos não foram avaliados para o protocolo de estimulação catódica.

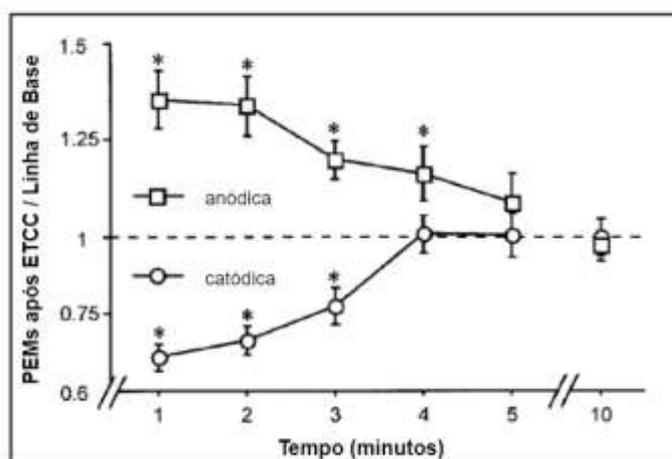


Figura 6. Efeitos da ETCC anódica e catódica aplicadas sobre o córtex motor de sujeitos saudáveis. Extraída de Nitsche e Paulus, 2000 [17].

Posteriormente, os mesmos autores conduziram um estudo em que verificaram os efeitos prolongados da ETCC anódica. Neste estudo, foram aplicadas estimulação anódica com duração de 13 minutos sobre córtex motor de sujeitos saudáveis, e observou-se modulação da excitabilidade cortical por até 90 minutos após término da sessão [45]. Os efeitos pós-estimulatórios da estimulação catódica, no entanto, foram verificados em um estudo subsequente, em que os mesmos pesquisadores avaliaram os efeitos de estimulações prolongadas, de 5, 7 e 9 minutos (a 1mA) sobre córtex motor de sujeitos saudáveis [46]. Semelhantes à estimulação anódica, os achados apontaram para efeitos duração-dependentes, em que os efeitos das sessões de 5 e 7 minutos persistiram por 10 minutos, enquanto as estimulações de 9 minutos geraram efeitos prolongados por até 60 minutos.

Acredita-se que os efeitos pós-estimulatórios de ETCC sejam dependentes da reorganização cortical e dos efeitos neuromodulatórios na plasticidade sináptica, e que os efeitos anódicos se assemelham à potenciação de longo prazo (do inglês, *LTP*), enquanto os efeitos catódicos se assemelham à depressão de longo prazo (do inglês, *LTD*). Respectivamente, a *LTP* e a *LTD* são atividades que resultam no aumento e redução da eficiência das sinapses excitatórias [47].

Estudos mais recentes, entretanto, sugerem que os efeitos plásticos da ETCC são bem mais complexos do que os achados iniciais e podem apresentar efeitos não-lineares dependendo da duração da sessão e intensidade de corrente aplicada. Em 2013, o grupo dos pesquisadores Nitsche e Paulus conduziu um estudo que teve o objetivo de investigar os efeitos de dois períodos de estimulação (de 13 minutos), separados por períodos de tempo diversos, no córtex motor de sujeitos saudáveis. Os pesquisadores observaram que o protocolo de estimulação anódica (1mA) sem intervalo entre as estimulações (13min.0min.13min, com tempo de duração total de 26 minutos), apresentou efeitos inibitórios por até 120 minutos após o término da sessão de ETCC, oposto ao que se esperava. Por outro lado, intervalos de 3 minutos (13.3.13) e 20 minutos (13.20.13) entre as sessões, foram capazes de produzir efeitos excitatórios de até 90 minutos após término da última sessão [48].

Em um outro estudo, conduzido por Batsikadze e colaboradores, mostrou efeitos não-lineares e não intensidade-dependentes da ETCC [49]. Neste estudo, a aplicação tanto de sessão anódica quanto catódica sobre o córtex motor com uma intensidade de 2-mA e 20 minutos de duração, levaram ao aumento da excitabilidade cortical. Por sua vez, um protocolo de ETCC catódica a 1-mA diminuiu a excitabilidade cortical. Ademais, um estudo recente conduzido por Hassanzahraee e colaboradores, mostrou que aumentos graduais na duração da sessão de ETCC anódica estão associados a uma diminuição nos efeitos facilitadores e até mesmo a uma reversão da resposta excitatória em sessões mais longas [50]. Tais efeitos não-lineares podem ser em parte explicados por um aumento progressivo na concentração intracelular de cálcio (Ca^{+2}) induzido pela ETCC, o que pode alterar a direção da neuroplasticidade, transformando LTD em LTP e vice-versa. No entanto, estes efeitos foram observados apenas em córtex motor de sujeitos saudáveis, e ainda é desconhecido até que ponto eles podem ser traduzidos para outras regiões do cérebro ou em situações patológicas, como, por exemplo, nos

diversos transtornos neuropsiquiátricos. Além disso, os efeitos da ETCC podem envolver vários sistemas de neurotransmissores.

Os efeitos da ETCC já foram investigados em combinação com fármacos de diversas classes em estudos diferentes, por meio de mensuração de excitabilidade cortical. Por exemplo, estudos com fármacos antagonistas e agonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA) apontam que o bloqueio do receptor de NMDA abole os efeitos prolongados da ETCC, enquanto os agonistas de NMDA prolongam estes efeitos [51,52]. O canal NMDA é um receptor pós-sináptico inotrópico e voltagem-dependente de glutamato (neurotransmissor excitatório), envolvido em mecanismos de LTP. Dessa forma, pode-se presumir que a ETCC anódica induz plasticidade no sistema glutamatérgico, que é dependente de Ca^{+2} . Na verdade, estudos prévios já haviam demonstrado que a indução de plasticidade da ETCC era dependente de Ca^{+2} [53]. Além da modulação do sistema glutamatérgico, foi mostrado que as estimulações anódica e caótica podem reduzir níveis de ácido gama-aminobutírico (GABA, neurotransmissor inibitório).

Em um estudo recente que investigou estimulação anódica, catódica e bilateral sobre o córtex motor primário de sujeito saudáveis, utilizando ressonância magnética com espectroscopia, foi observado que a estimulação anódica diminuiu a concentração de GABA tanto no córtex motor estimulado quanto em córtex contralateral, enquanto a ETCC catódica diminuiu GABA no córtex contralateral. Diminuição de GABA foi observada apenas sob cátodo no protocolo bilateral (cátodo e ânodo sobre córtex motor primário direto e esquerdo, respectivamente) [54]. Estes dados são similares ao estudo prévio de Stagg et al 2009, que mostrou redução das concentrações de GABA após estimulação catódica do córtex motor. Resumidamente, até o momento, pode-se concluir que os efeitos prolongados da ETCC são dependentes de mecanismos

glutamatérgicos, e que a indução da redução das concentrações de GABA pode influenciar os efeitos da ETCC.

Ademais, neurotransmissores como dopamina e serotonina também parecem influenciar os efeitos da ETCC. Enquanto a dopamina parece produzir efeitos não-lineares na plasticidade induzida pela ETCC - que dependem de dosagem e tipo de receptor ativado - a serotonina tende a facilitar e prolongar os efeitos pós-estimulatórios da estimulação anódica e reverter os efeitos inibitórios da estimulação catódica em excitação [55].

3.2.1 Neuroimagem

Como visto acima, os efeitos da ETCC foram mais avaliados no córtex motor, pois a excitabilidade cortical pode ser facilmente mensurável via eletromiografia. No entanto, a verificação dos efeitos da ETCC sobre o CPF é essencial, visto que essa é uma região do cérebro que está envolvida em processos afetivos e cognitivos mais complexos, como emoções, processos sociais e funções executivas, além de diversos estudos mostrarem que o CPF e suas circuitarias adjacentes apresentam atividade disfuncionais em transtornos do humor, como depressão e ansiedade. Nesse sentido, o CPFDL surge como um alvo de interesse no campo das neuromodulações principalmente por estar associado a outras regiões do encéfalo, como regiões límbicas e subcorticais, podendo induzir modulação também de áreas mais profundas [56]. Embora os efeitos da ETCC sobre o CPF sejam mais complexos de serem avaliados se comparado aos efeitos sobre o córtex motor, eles podem ser investigados por meio de métodos de neuroimagem. Dessa forma, abaixo são apresentados alguns achados dos mecanismos da ETCC sobre o CPF de sujeitos saudáveis.

Estudos recentes utilizam técnicas de neuroimagem baseadas na ressonância magnética (RM) para avaliar os efeitos da ETCC no CPFDL. Em um estudo utilizando RM funcional em repouso, Keeser e colegas (2011) aplicaram ETCC bilateral, durante 20 minutos, a 2mA, sobre o CPFDL (ânodo sobre esquerdo e cátodo sobre direito) de sujeitos saudáveis com o objetivo de investigar os efeitos da técnica na conectividade funcional [57]. Os achados com RM funcional em repouso mostraram que a ETCC sobre CPF modulou padrões de conectividade no cérebro, induzindo mudanças funcionais em regiões próximas aos locais estimulados, mas também em regiões cerebrais distantes. Os efeitos foram verificados em três redes neuronais distintas, como a rede de modo padrão (do inglês, DMN) e a rede frontoparietal direita e esquerda. Além disso, os pesquisadores também encontraram aumento de ativação entre diferentes regiões frontais do cérebro próximas e entre os dois eletrodos.

Também utilizando RM funcional de repouso, Park e colegas [58] aplicaram ETCC de 1mA, durante 20 minutos sobre CPFDL esquerdo (ânodo) e região supraorbital direita (cátodo) de sujeitos saudáveis. Em comparação com *sham*, a aquisição de neuroimagem após a estimulação apresentou conectividade interemisférica, sendo que a conectividade funcional do CPFDL esquerdo aumentou a ativação em regiões frontal, temporal e subcortical do hemisfério direito, enquanto diminuiu em regiões frontais em abaixo do eletrodo do hemisfério esquerdo. Esses achados evidenciam correlatos neurais dos efeitos da ETCC sobre CPF.

Um estudo mais recente, em que os autores aplicaram ânodo sobre CPFDL esquerdo e cátodo extracefálico, mostrou que a estimulação ativa aumentou a conectividade entre a região de Brodmann 9 (região do córtex pré-frontal que corresponde ao CPFDL) e alguns pontos da rede frontoparietal, enquanto a região de Brodmann 46 (região do córtex pré-frontal que corresponde ao CPFDL) apresentou

conectividade diminuída entre outras redes [59]. Este estudo também utilizou RM funcional de repouso.

Em um estudo utilizando ETCC combinada com uma modalidade de RM chamada *Arterial Spin Labelling* (a qual permite a avaliação da perfusão cerebral através do sinal BOLD (do inglês, *blood oxygenation level dependent*) da RM funcional) no CPFDL esquerdo, observou-se um aumento e uma diminuição da perfusão cerebral durante estimulação anódica e catódica (20 min, 1mA), respectivamente, mostrando efeitos polaridade-dependente. Entretanto, observou-se que estas alterações não foram mantidas após o fim das sessões de ETCC [60].

Finalmente, em um estudo mais recente combinando ETCC com espectroscopia, observou-se, durante estimulação anódica do CPFDL esquerdo e catódica a direita (30 min, 1mA), um aumento nos níveis de *N-acetylaspartate (NAA)* no CPFDL esquerdo e um aumento nos níveis de glutamato + glutamato (Glx) no striatum esquerdo. A espectroscopia realizada imediatamente após o término da sessão de ETCC não identificou alterações nos níveis de metabólitos cerebrais. Estes resultados sugerem, portanto, que a ETCC apresenta um efeito excitatório sobre o córtex pré-frontal [61].

De maneira geral, os estudos sugerem que a ETCC sobre CPFDL modula regiões corticais e circuitarias subjacentes ao alvo estimulado, e que seus efeitos podem ser polaridade-dependentes. Por fim, os estudos apontam que esses achados são apenas encontrados imediatamente após o fim da estimulação, sugerindo que os efeitos de poucas sessões ETCC sobre CPFDL são agudos.

4. ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA TRANSCRANIANA REPETITIVA

4.1 Aspectos Técnicos e Parâmetros

Os dispositivos de EMTr geralmente contém [10] (Figura 7): 1) um estimulador magnético, com circuito elétrico (Figura 7A); 2) uma bobina eletromagnética; 3) um braço metálico para apoio da bobina, que permite posicioná-la sobre o escalpo do paciente sem a necessidade de auxílio de uma pessoa, e sem gerar desconforto ao sujeito estimulado; 4) um resfriador de bobina, que evita o superaquecimento das bobinas, principalmente em protocolos mais intensos; 5) um carrinho projetado para posicionar o estimulador, o resfriador e o braço metálico da bobina.

Além dos itens essenciais para a plena funcionalidade de um dispositivo de EMTr, também é essencial que o sujeito seja confortavelmente posicionado em uma cadeira ajustável e reclinável, a fim de evitar qualquer tipo de movimento que desloque a bobina do alvo que foi alocado, uma vez que o movimento da cabeça do indivíduo pode levar à estimulação de regiões indesejadas.



Figura 7. Dispositivo de EMT e seus componentes.

Assim como a ETCC, os protocolos de EMTr também envolvem a combinação de diversos parâmetros, que são: 1) intensidade da estimulação; 2) frequência e número de pulsos; 3) tipo de bobina; 4) posicionamento da bobina; 5) número de sessões e intervalo entre as sessões [62].

1) Diferentemente da ETCC, a intensidade de corrente utilizada na EMTr é aplicada com base em medidas fisiológicas individuais de cada sujeito, conhecida como 'limiar motor de repouso' (LMr). Para estipular o LMr de cada sujeito, primeiramente é determinado o alvo do córtex motor. Este alvo do crânio deve ser a região onde os movimentos involuntários evocados do músculo da mão contralateral (ex. músculo *abductor pollicis brevis*) são mais intensos quando aplicados pulsos únicos de EMT. Para que o LMr seja estabelecido, é preciso que pelo menos 5 de 10 estímulos sob este alvo gerem um PEM (registrado por eletromiografia) de amplitude mínima de 50 μ V. Este ponto é conhecido como *hotspot* [63]. Alternativamente, pode-se utilizar a visualização da contração dos músculos da mão, notando-se presença ou ausência de movimentação. É preciso que 50% das respostas sejam positivas (habitualmente 5 respostas positivas, ou seja, movimentação visual do músculo da mão, em 10 testes) para que o *hotspot* seja estabelecido. Com esses métodos, é possível encontrar a menor intensidade da máquina de EMTr que seja capaz de despolarizar a área motora. Os protocolos da EMTr são geralmente aplicados com diversos valores (em porcentagem) do LMr. Eles podem variar entre 80% do valor total do LMr (ou seja, caso o LMr tenha sido definido com uma intensidade de estímulo de 60% da capacidade da máquina, os estímulos serão aplicados a 48% da intensidade total da máquina), até 120% do total do LMr [44].

2) A frequência dos pulsos eletromagnéticos é um parâmetro essencial para classificar o tipo de protocolo que será aplicado (Tabela 1). Para protocolos de baixa frequência, é comum que os pulsos sejam aplicados na frequência de 1 Hz, o que gera

um total de 60 pulsos por minuto. Para estes protocolos, o número de pulsos pode variar de 600 a 1500 pulsos por sessão, influenciando diretamente no tempo de sessão. Um protocolo de 1500 pulsos tem um tempo de sessão total de 25 minutos.

Em protocolos de alta-frequência, a frequência de pulsos é mais comumente aplicada na ordem de 10 pulsos por segundo (10 Hz), embora protocolos mais intensos, com frequências de 15 a 20 Hz, sejam utilizados. Protocolos de 10 Hz são aplicados em *trains* de 5s (totalizando 50 pulsos por *train*), com intervalos de 20 a 40 segundos entre *trains*. O total de pulsos por sessão varia de 1200 a 3000 pulsos, com sessões podendo durar até 45 minutos [63]. Além disso, os protocolos de baixa e alta-frequência podem ser aplicados sequencialmente em protocolos conhecidos como EMTr bilateral.

Por fim, a TBS apresenta configurações de frequência de pulsos diferentes das modalidades de EMTr convencionais. A TBS consiste no emprego de rajadas de pulsos (séries de pulsos magnéticos) a cada 200 ms, o que equivale a uma frequência de 5 Hz (a frequência 'teta' no EEG vai de 4 a 7 Hz, por isso a denominação *theta burst*). Cada rajada, por sua vez, é composta por um conjunto de 3 pulsos, separados por um intervalo de 20 ms, o que equivale a uma frequência de 50 Hz. A principal diferença entre os protocolos cTBS e iTBS é que a estimulação contínua não exige intervalo entre os *trains*, enquanto os *trains* nos protocolos de iTBS têm intervalos entre 2 a 8 segundos. Geralmente os protocolos TBS são aplicados com até 900 pulsos e duram entre 3 a 10 minutos. A curta duração desses protocolos, comparados aos de EMTr convencionais, tornam a TBS uma ferramenta terapêutica atraente [64].

Tabela 1. Parâmetros das técnicas de EMTr.

Métodos de EMT	Padrão do estímulo	Modo de pulso	Frequência	Tempo por sessão (minutos)
Estimulação Magnética Transcraniana de repetição (EMTr) - pulso simples				
Alta Frequência		Pulso único	$\geq 10\text{Hz}$	20 a 30
Baixa Frequência		Pulso único	$\leq 01\text{Hz}$	15 a 30
Estimulação por Theta-Burst (TBS)				
Intermitente (iTBS)		Burst	50Hz	4 a 10
Contínuo (cTBS)		Burst	50Hz	1 a 3

cTBS: Estimulação Theta-Burst Contínua; EMTr: Estimulação Magnética Transcraniana Repetitiva; Hz: Hertz; iTBS: Estimulação Theta-Burst Intermitente.

3) As formas das bobinas da EMT são diversas e se correlacionam com a intensidade de saída de um pulso eletromagnético, precisão e a profundidade do campo magnético induzido [65]. A bobina que gera campos menos focais e menos profundos é conhecida como ‘bobina circular’, que é geralmente utilizada em estudos de fisiologia. O formato de bobina mais utilizado no campo da pesquisa clínica é a bobina de formato de 8, ou *butterfly coil* (bobina borboleta). Este design de bobina permite a indução de um campo elétrico focal, capaz de atingir regiões com profundidade de até 2 cm. As bobinas conhecidas como ‘duplo-cone’ e ‘H1’, atingem regiões mais profundas (até 5cm), mas apresentam menor focalidade [66]. Devido à física dos campos magnéticos, a precisão e a profundidade são parâmetros inversamente correlacionados: os campos focais têm profundidade limitada, enquanto os estímulos profundos necessariamente envolvem a indução de um grande campo magnético.

4) A localização dos pontos terapêuticos para posicionamento das bobinas da EMTs são os mesmos utilizados para a ETCC, como o sistema 10-20 do EEG e o Beam-F3, mencionados anteriormente. Entretanto, por ser uma técnica mais focal que a ETCC, a neuronavegação é muito mais utilizada para localizar pontos específicos do córtex que serão estimulados com a EMTr. Nesse sentido, estudos apontam que coordenadas estereotáxicas do CPFDL baseadas em mapa do Instituto Neurológico de Montreal / *Montreal Neurological Institute* (do inglês, MNI), podem ser alvos de otimização para o tratamento clínico da depressão utilizando EMTr [67]. Por fim, outro parâmetro importante para aumento da acurácia e replicação dos protocolos de EMT é a angulação/orientação que as bobinas são aplicadas sobre a cabeça. Estudos sugerem que a geração de um campo magnético transversal às fibras axonais têm maior probabilidade de despolarização. Por isso, ao se buscar o potencial evocado motor, as bobinas são posicionadas à 45° da linha média [68].

5) Assim como a ETCC, o número de sessões de EMTr e o intervalo entre elas também pode ser variável entre os protocolos. Entretanto, por ser uma técnica aprovada para tratamento clínico, a recomendação feita pelo CANMAT é que o tratamento do quadro agudo da depressão seja feito em sessões diárias (1x por dia, 5 dias úteis por semana) até um total de 20 sessões para que a remissão dos sintomas possa ser atingida [69]. Para pacientes que não remitem com um curso de 20 sessões, a recomendação é de extensão do tratamento por mais duas semanas (10 sessões, 1x por dia). A aplicação de EMTr para fase de seguimento do tratamento também é recomendável, embora ainda não haja evidências de quais são o número e intervalos ótimos de sessões para que a resposta/remissão do tratamento seja mantida. Como a ETCC, a maioria dos estudos experimentais, com sujeitos saudáveis, também tende a avaliar os efeitos agudos das técnicas. Da mesma maneira, os protocolos com sessões únicas, quando aplicado mais de uma sessão, são espaçados em uma semana, para evitar efeitos *carry-over*.

4.2 Mecanismos de ação da EMTr

A EMT é uma técnica de neuromodulação não-invasiva, utilizada para modular o tecido neural. Diferentemente da ETCC, a EMT gera correntes elétricas mais intensas e focais, que são capazes de induzir despolarização neuronal (ou potenciais de ação) [70]. O funcionamento da EMT baseia-se no princípio de indução eletromagnética de Faraday (comentado anteriormente) que estabelece que quando uma corrente elétrica de alta intensidade passa através de uma bobina, ela gera um campo magnético perpendicular ao plano dessa corrente (Figura 8). No caso da EMT, quando a bobina eletromagnética, composta por enrolamentos de fio de cobre, é acionada, um pulso de corrente, da ordem de milissegundos, sai do capacitor do estimulador até chegar à bobina. Quando a bobina está próxima a um material condutor (neste caso, a superfície craniana), ela é capaz de induzir um campo elétrico [62].

Embora a EMT também consista de uma estimulação elétrica, a intensidade da corrente aplicada pela técnica permite que ela atravesse cabelo, pele, tecidos e osso (crânio) sem deflexão, permitindo que a corrente aplicada não seja perdida até atingir o tecido cerebral [71]. Um pulso padrão de EMT dura $\sim 10^{-5}$ segundo e induz um campo magnético de aproximadamente 2 Tesla¹. Entretanto, há um declínio na intensidade da corrente aplicada com o aumento da distância da bobina, que faz com que a penetração do campo magnético seja relativamente pequena na EMT.

¹ Tesla: unidade de medida da densidade do fluxo magnético (=indução magnética) conhecida como campo magnético.

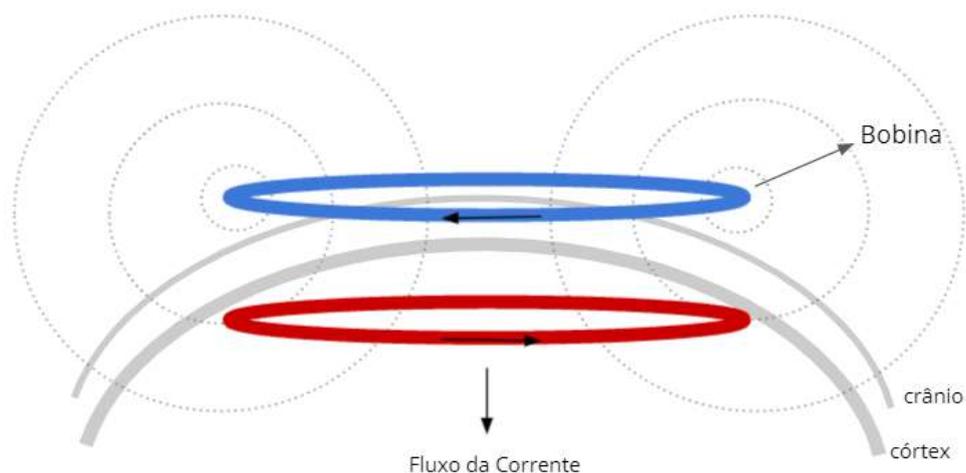


Figura 8. Modelo de funcionamento da EMT.

Os efeitos fisiológicos 'finais' da EMT são dependentes dos parâmetros utilizados pelos protocolos. Diferentes combinações de parâmetros induzem diferentes efeitos biológicos, os quais podem ser, por exemplo, efeitos inibitórios e excitatórios agudos ou de longo prazo. Diversos estudos já verificaram os efeitos fisiológicos da EMT e alguns deles serão comentados a seguir.

O primeiro experimento eletromagnético conduzido com humanos conscientes foi realizado na década de 1980, por Merton e Morton [72], no qual eles estimularam eletricamente o córtex motor dos sujeitos com um dispositivo elétrico de alta voltagem (2000V), com resultados positivos. Os pesquisadores observaram que a aplicação de estimulação de alta voltagem gerou uma contração muscular nos músculos do braço contralateral ao córtex estimulado, evocando PEMs na eletromiografia. Entretanto, a estimulação foi reportada como desconfortável e dolorosa, incentivando outros pesquisadores a criarem um dispositivo eletromagnético que não causasse dor aos sujeitos estimulados.

Com a criação da EMT por Barker e colegas, em 1985, seus efeitos começaram a ser investigados principalmente em córtex motor, região pela qual os efeitos

fisiológicos são mais facilmente mensurados [19]. Na verdade, os resultados com EMT sobre córtex motor são similares aos efeitos de ETCC, porém, os efeitos da estimulação magnética são mais duradouros.

Em 1994, Pascual-Leone e colegas testaram, pela primeira vez, os efeitos da EMTr sobre o córtex motor primário de 14 sujeitos saudáveis, com frequência e intensidade diferentes de estimulação. Com estes parâmetros distintos, os pesquisadores puderam mensurar os efeitos de estimulações menos intensas e mais intensas. Os resultados demonstraram que estímulos menos intensos, de 1Hz, não levaram a mudanças progressivas de PEMs, enquanto protocolos de frequência mais alta, entre 3Hz a 5Hz e de 10Hz a 25Hz, levaram a aumento progressivo dos PEMs [23]. Interessantemente, foi visto que intensidades mais altas (de até 200% do LMr) aumentaram ainda mais a amplitude dos PEMs em protocolos de 3 a 5Hz, por outro lado, estas intensidades levaram a um padrão alternante de amplitude em protocolos de 10 e 25Hz. Esses efeitos cíclicos podem ser resultantes de alterações na excitabilidade corticomotoneuronal produzidas por pulsos únicos [73].

Posteriormente, Chen e colegas, 1997 [74], mostraram a redução da excitabilidade cortical motora após aplicação de estimulação de baixa frequência (0.9 Hz) por 15 minutos (total de 810 pulsos), com intensidade de 115% do LMr. Essa redução durou por até 15 minutos após o final da estimulação. Esses achados foram confirmados posteriormente em diversos outros estudos com sujeitos saudáveis. Por outro lado, estudos aplicando protocolos com frequências mais altas (ex. 10Hz), apresentaram efeitos opostos. Por exemplo, Maeda e colegas, em 2000, investigaram os efeitos modulatórios da EMT aplicados com diferentes frequências (1, 10 e 20Hz) e observaram inibição significativa dos PEMs com protocolos de 1Hz e efeitos excitatórios com protocolos de 10 e 20Hz [75].

Como observado nos resultados dos estudos acima citados, a EMTr pode gerar efeitos moduladores inibitórios e excitatórios no córtex cerebral. É sabido, por meio de estudos de modelos animais, que a EMTr também apresenta efeitos duradouros, produzindo alterações sinápticas que duram até semanas após a estimulação [76]. Estes mecanismos de plasticidade sináptica, descritos inicialmente no hipocampo de roedores [77] são a LTP e LTD, brevemente mencionados anteriormente. Esses dois mecanismos são os exemplos mais típicos da teoria da plasticidade Hebbiana, que postula que o aumento da força sináptica ocorre através da estimulação repetida e persistente de células pré e pós-sinápticas, e é conhecida pela frase "*Cells that fire together wire together*"² [78]. Por fim, é hipotetizado que protocolos de baixa frequência (≤ 1 Hz) e de alta frequência (≥ 10 Hz), são, respectivamente, inibitório (induzindo LTD) e excitatório (induzindo LTP). O modelo explicativo dessa ativação seria que o disparo sincrônico de dois neurônios promoveria LTP a partir da coativação de receptores glutamatérgicos dos subtipos AMPA e NMDA, em sinapses ativadas com maior frequência e intensidade, com consequente aumento de receptores glutamatérgicos na membrana do neurônio pós-sináptico. Já nas sinapses pouco ativas, ocorreria o inverso, com endocitose de receptores glutamatérgicos e redução da eficácia sináptica [79]

4.2.1 Estimulação *Theta-Burst* (TBS)

Mais recentemente, uma nova modalidade de EMTr, a TBS, começou a ser investigada. O conceito original de TBS vem da descarga de explosão a 4-7 Hz (faixa teta em eletroencefalografia – terminologia EEG), registrada a partir do hipocampo de ratos durante comportamento exploratório [80]. Inicialmente, este parâmetro foi comumente utilizado em estudos em animais para indução de LTP. A TBS é uma

² Tradução nossa: 'Neurônios que disparam juntos, permanecem conectados.'

modalidade de EMTr e, como tal, gera potenciais de ação na região-alvo do córtex de acordo com os parâmetros de estimulação [64].

Em 2005, os efeitos da TBS foram investigados pela primeira vez em córtex motor de humanos [25]. Huang e colegas aplicaram três protocolos de TBS (contínuo, intermitente e intermediário) no córtex motor de sujeitos saudáveis, cada um consistindo de um total de 600 pulsos, com intensidade de 80% do LM ativo. O elemento básico desses protocolos foi um *burst* de três estímulos a 50Hz (20ms entre cada estímulo), o qual foi repetido a intervalos de 200ms (5Hz). Na estimulação contínua (cTBS) um *train* de 40s de TBS foi aplicado ininterruptamente (600 pulsos). No paradigma intermitente (iTBS), foi aplicado um *train* de 2s de TBS repetido a cada 10s em um total de 190s, e para o intermediário, foi administrado um *train* de 5s de TBS repetido a cada 15s em um total de 110s. Os resultados mostraram supressão dos PEMs por mais de 60 minutos no protocolo de cTBS, facilitação após iTBS e nenhuma mudança para TBS intermediário (Figura 9). Com estes resultados animadores, a TBS começou a ser amplamente estudada.

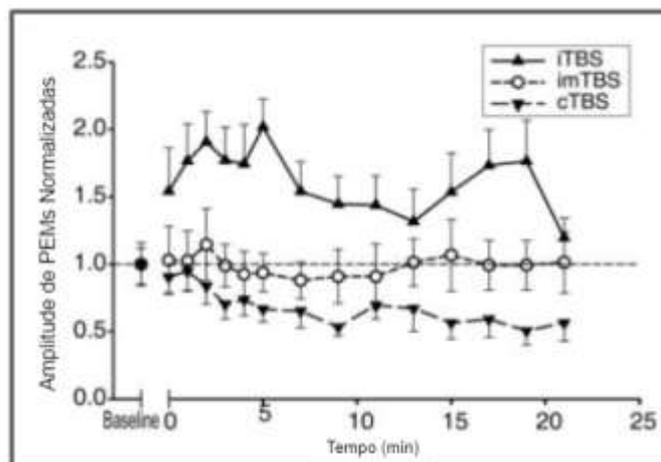


Figura 9. Alteração dos potenciais evocados motores após aplicação de protocolos de TBS. Adaptado de Huang et al 2005 [25].

Seus efeitos fisiológicos ainda vêm sendo estudados, entretanto, eles parecem ser semelhantes ao de protocolos de EMTr convencionais. De acordo com um estudo de ressonância magnética com espectroscopia, os efeitos da cTBS mostraram estar relacionados ao aumento da concentração de GABA [81]. Outro estudo recente mostrou que os efeitos da cTBS e iTBS são bloqueados pela memantina (um antagonista de receptor NMDA), sugerindo que os efeitos da técnica são do tipo LTP e LTD [82]. Dessa forma, é tido que a iTBS e a cTBS, respectivamente, aumentam ou diminuem a concentração pós-sináptica de Ca^{2+} , que é um fator importante na determinação da direção da plasticidade sináptica [83].

Devido à sua eficiência na indução de LTP e LTD, a TBS começou a ser avaliada como uma alternativa clínica para o tratamento da depressão [84]. Recentemente, um ensaio clínico de não-inferioridade investigou a eficácia clínica da iTBS comparada a um protocolo convencional de EMTr de 10Hz, ambos excitatórios, sobre o CPFDL esquerdo de sujeitos depressivos resistentes ao tratamento [85]. Os resultados mostraram não inferioridade da iTBS à EMTr de 10Hz para o tratamento da depressão. Em outras palavras, a iTBS foi tão eficaz quanto a um protocolo convencional de estimulação magnética repetitiva. Isso garantiu a aprovação do seu uso clínico para o tratamento da depressão nos Estados Unidos. Com base em um estudo de neuroimagem recente, que usou Tomografia Computadorizada por Emissão de Póstron (do inglês *PET*), a iTBS sobre CPFDL esquerdo tende a modular a ativação da circuitaria fronto-cíngulo-temporal em paciente com depressão refratária [86].

Finalmente, o uso da TBS clínica é promissor, uma vez que a duração de sua sessão é de, em média, 5 minutos, enquanto os protocolos convencionais de EMTr duram, em média, 30 minutos [44]. Entretanto, por ser uma modalidade mais moderna que a EMTr convencional, os efeitos da técnica foram bem menos investigados sobre o CPFDL [87].

5. EFEITOS DA ETCC SOBRE O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

5.1 Efeitos clínicos da ETCC sobre o córtex pré-frontal

A investigação dos efeitos da técnica sobre o CPF vem sendo progressivamente investigada clinicamente, principalmente para o tratamento de quadros depressivos [88]. A aplicação da ETCC para a depressão é baseada na premissa de que parâmetros específicos podem alterar a funcionalidade cerebral de regiões que estão disfuncionais. Uma das teorias biológicas que norteiam a aplicação da ETCC para a depressão é a do desbalanceamento inter-hemisférico do CPF, que apresenta relativa hipoatividade do hemisfério esquerdo e hiperatividade do hemisfério direito [89]. Dessa forma, na grande maioria dos ensaios clínicos, o ânodo é posicionado sobre CPFDL esquerdo e cátodo sobre CPFDL direito.

Até o atual momento, os efeitos clínicos da ETCC foram amplamente mais investigados na depressão se comparado a qualquer outro transtorno psiquiátrico. Segundo revisão recente, 25 ensaios clínicos aleatorizados já haviam sido conduzidos para investigar os efeitos da ETCC para sintomas depressivos até o ano de 2020 [90]. O primeiro ensaio clínico investigando os efeitos da ETCC para a depressão foi conduzido em 2006 por Fregni e colegas [91]. Os pesquisadores conduziram um estudo piloto aplicando ETCC bilateral (ânodo sobre CPFDL esquerdo e cátodo sobre área supraorbital direita) em 10 sujeitos diagnosticados com depressão. O protocolo foi aplicado por 5 dias seguidos, a 1-mA, com duração de 20 minutos. Os resultados foram significativamente superiores para melhora do quadro clínico no grupo ativo se comparado ao grupo placebo.

Posteriormente, diversos outros estudos foram conduzidos com amostras maiores e parâmetros diversos [90]. Por sua vez, o maior ensaio clínico investigando os

efeitos da ETCC (ânodo F3/ cátodo F4, 22 sessões, 2mA e 30 minutos) para depressão falhou em demonstrar sua superioridade a um tratamento farmacológico convencional (escitalopram 20mg/dia - dose máxima recomendada pelo FDA). Na verdade, os resultados deste estudo mostraram que os efeitos antidepressivos da ETCC foram inferiores ao escitalopram, embora superiores ao placebo [92].

Nesse sentido, embora revisões sistemáticas e meta-análises sugiram que a ETCC é mais eficaz do que placebo, os achados apontam para efeitos globais médios para baixo, como visto em meta-análises recentes de dados agregados ($k=25$, Hedges's $g = 0,46$, 95% intervalo de confiança [IC]: 0,22 - 0,70) [90] e de dados individuais ($\beta = 0.31$, 95% IC, 0.15–0.47) [93]. Ademais, um recente estudo multicêntrico, aleatorizado, placebo-controlado, que recrutou 130 pacientes, não encontrou melhora antidepressiva significativa entre o grupo de ETCC ativa e placebo [94].

Similarmente, os efeitos da ETCC para processos cognitivos sobre o córtex pré-frontal também vêm apresentando resultados mistos. O uso do ETCC para aprimoramento da memória de trabalho, por exemplo- que é o domínio cognitivo mais estudado no campo da ETCC, principalmente devido ao seu status de ser uma das três funções executivas centrais, juntamente com controle inibitório e flexibilidade cognitiva, e também por ter sido um potencial marcador para o tratamento da depressão - vem apresentando resultados promissores [95,96], mas vários estudos negativos também são vistos [97,98].

Nesse sentido, uma meta-análise que investigou os efeitos de sessão única de ETCC em diversos domínios cognitivos de sujeitos saudáveis sugeriu que os efeitos da técnica na cognição são nulos. No geral, os resultados deste estudo mostraram que nenhum domínio cognitivo avaliado (linguagem, memória, funções executivas, entre outras) apresentou superioridade ao placebo [99]. Similarmente, uma revisão guarda-chuva recente mostrou que, de 55 comparações de ETCC com placebo, distribuídas em

12 domínios cognitivos, apenas 16 reportaram efeitos significativos favorecendo a ETCC [100].

Finalmente, outra meta-análise que incluiu apenas sujeitos depressivos, que passaram por um curso de pelo menos duas sessões de ETCC, também não encontrou benefícios cognitivos da técnica, independentemente dos efeitos de humor [101]. Em consonância com os achados de revisão, dois ensaios clínicos aleatorizados recentes avaliaram os benefícios cognitivos da ETCC após cursos agudos de ETCC para pacientes depressivos unipolares e bipolares (aplicando mais de 12 sessões) e não encontraram diferenças cognitivas significativas entre os grupos de ETCC ativa e simulada [102,103].

Diversas fontes de variabilidade para os resultados heterogêneos da aplicação de ETCC como monoterapia sobre o CPF vêm sendo exploradas. Dentre elas estão:

a) variabilidade individual: variabilidade anatômica e funcional de cada cérebro e polimorfismos genéticos são alguns fatores que vêm sendo explorados. Por exemplo, estudos sugerem que polimorfismos genéticos do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, BDNF) estejam associados a mudanças de neuroplasticidade das estimulações cerebrais não invasivas [104]. Além disso, estudos mais recentes apontam que volume da massa cinzenta no CPF esteja relacionado aos efeitos antidepressivos da ETCC [105], bem como a anatomia cerebral esteja diretamente associada com a força dos fluxos elétricos da ETCC em diferentes regiões do córtex [106].

b) aspectos metodológicos: a falta de padronização nos protocolos da ETCC podem ser uma importante fonte de variabilidade para os efeitos da técnica uma vez que os parâmetros da técnica, como intensidade de corrente, duração de sessão, alvo de posicionamento do eletrodo e densidade de corrente são altamente heterogêneos entre os estudos e podem alterar os efeitos da ETCC, até mesmo levando a efeitos não-lineares, como foi apresentado anteriormente. Ademais, estudos recentes apontam que o protocolo placebo da ETCC seja um desafio metodológico importante nos ensaios

clínicos com a técnica, uma vez que o campo ainda carece de um protocolo placebo padronizado e as taxas de resposta nesse grupo são altas [107,108].

c) efeitos estado-dependente: como a ETCC não gera potenciais de ação *per se*, mas sim aumenta ou diminui a frequência de disparo destes potenciais, estudos mais recentes discutem que alguns efeitos da ETCC podem diferir em força (para mais ou para menos), dependendo do estado neuronal da região que está sendo estimulada e suas circuitarias adjacentes. Este 'estado-cerebral' pode ser controlado e padronizado por meio da aplicação de técnicas concomitantemente à sessão de estimulação. Especula-se, ainda, que a ETCC pode induzir efeitos mais robustos enquanto terapia adjuvante, ou complementar a outras intervenções, podendo causar efeitos aditivos (quando as intervenções não interagem e o resultado líquido é a soma de cada intervenção sozinha) ou efeitos sinérgicos (co-potencialização dos protocolos, levando a efeitos multiplicativos).

As descobertas progressivas do campo para compreender a variabilidade neuropsicológica e comportamental dos efeitos da ETCC em sujeitos saudáveis e pacientes fornece informações importantes sobre como aumentar e otimizar os efeitos da técnica. Nesse sentido, abaixo discorro sobre os achados de estudos que utilizam a ETCC combinada a outras intervenções, como forma de aprimorar os resultados da técnica.

5.2 ETCC como terapia combinada sobre o córtex pré-frontal

Como apresentei acima, a literatura recente sugere que a ETCC no campo da pesquisa neuropsiquiátrica vem apresentando grande heterogeneidade em sua eficácia como tratamento monoterápico. Na verdade, não apenas os achados mistos da ETCC na depressão e cognição de pacientes e sujeitos saudáveis chamam a atenção, mas

diversos outros quadros neuropsiquiátricos ainda não apresentam melhoras suficientes em sua sintomatologia com a aplicação da ETCC [88].

Considerando essas limitações, o campo vem crescentemente discutindo sobre a possibilidade de aplicação da ETCC em combinação a outras intervenções terapêuticas com o objetivo de gerar efeitos mais robustos nos tratamentos [109]. Na verdade, a discussão sobre a aplicação de técnicas de neuromodulação não-invasivas associadas a outros tratamentos de modo a produzir efeitos aditivos e sinérgicos foi relativamente inexplorada até o momento no campo da neuropsiquiatria, o que representa um hiato importante na literatura, uma vez que os efeitos das técnicas de neuromodulação não-invasiva são conhecidos por serem estado-dependentes.

Os efeitos estado-dependentes dizem respeito especificamente ao estado - ou seja, como está o funcionamento - do alvo cortical no momento da estimulação [110][111]. Em relação a ETCC, visto que ela não gera potenciais de ação *per se*, seus efeitos líquidos não ocorrem isoladamente. A comunicação entre células individuais e redes neuronais é não-linear e complexa, com um grande número de estímulos influenciando a atividade destes neurônios [112]. Portanto, mesmo uma pequena mudança na voltagem da membrana - ou estado do alvo - pode impactar o disparo neuronal. Nesse sentido, dado que os efeitos dependem do estado de ativação em curso, métodos para controlar a atividade neural na região alvo e em redes subjacentes podem incrementar os resultados finais da técnica, bem como reduzir a variabilidade de resposta.

Uma possibilidade de controlar a variabilidade de estímulos e aumentar a eficiência das técnicas de neuromodulação é sua aplicação combinada a intervenções que tenham influência direta nas circuitarias de interesse [109]. Essa abordagem vem sendo pesquisada a mais tempo no campo da neuroreabilitação, apresentando resultados positivos [113,114]. No campo da neuropsiquiatria, por sua vez, poucos estudos foram conduzidos até o momento. Para a depressão, alguns estudos foram

conduzidos combinando a ETCC a diversas técnicas terapêuticas, como treino cognitivo, terapia cognitivo comportamental, mindfulness e antidepressivos, mostrando resultados iniciais mistos (Tabela 2).

Por exemplo, em um ensaio clínico de desenho fatorial, os pesquisadores alocaram 120 participantes em quatro grupos de tratamento: 1) ETCC + sertralina, 2) ETCC + placebo, 3) ETCC placebo + sertralina e 4) ETCC placebo + pílula placebo. Os resultados demonstraram que a combinação de ETCC (2mA, 30min, sobre CPFDL direito e esquerdo) com sertralina (50mg/dia) foi clinicamente superior na redução de sintomas depressivos quando comparada a ETCC e sertralina em monoterapia ou placebo. Em um ensaio piloto, Segrave e colegas, por sua vez, combinaram ETCC com treino cognitivo em um estudo de 3 braços: 1) ETCC ativa + Treino cognitivo; 2) ETCC ativa + Treino cognitivo placebo; 3) ETCC placebo + Treino cognitivo. Os achados deste ensaio mostraram que a aplicação de ETCC (2mA, 24min, ânodo sobre CPFDL esquerdo e cátodo sobre supraorbital direita) com treino cognitivo foi melhor para a redução de sintomas clínicos da depressão quando comparado às técnicas em monoterapia.

Em contrapartida, Brunoni e colegas (2014) não encontraram superioridade clínica do protocolo que combinou ETCC ativa (2mA, 30min, sobre CPFDL direito e esquerdo) e treino cognitivo com o protocolo utilizando apenas treino cognitivo. Em um estudo mais recente, Nord e colegas também falharam em demonstrar a superioridade de melhora clínica da ETCC (2mA, 20min, ânodo sobre CPFDL esquerdo e cátodo sobre deltóide) combinada com um protocolo de terapia cognitivo comportamental, quando comparado apenas com a psicoterapia em monoterapia.

Mais recentemente, uma série de casos clínicos que avaliou os efeitos da combinação da ETCC domiciliar com uso de aplicativo de terapia cognitivo comportamental foi publicada. Dos 5 casos avaliados, 4 deles atingiram resposta após aplicação de 21 sessões combinadas [115]. Com esses resultados animadores, um

ensaio clínico, randomizado e duplo-cego, está atualmente em andamento, com objetivo de recrutar 210 pacientes para investigar a segurança, tolerabilidade e eficácia do uso combinado das duas intervenções.

Visto que esta é uma abordagem de investigação crescente no campo da neuromodulação na neuropsiquiatria, algumas razões para a falta de resultados robustos vêm sendo levantadas, dando destaque para a falta de estudos fatoriais. Além disso, as formas de interação das técnicas podem ser diversas, como aplicações concomitantes (online) ou sequenciais (offline) e resultados que geram efeitos antagonistas, sinérgicos ou até mesmo nulos, e que ainda foram pouco explorados. Ainda que uma revisão recente sugira que os efeitos *online* - ou seja, aplicação simultânea - das técnicas pode gerar efeitos mais robustos em relação a administração simultânea das técnicas, estes dados ainda são escassos. Finalmente, ainda é preciso aprofundar estes pontos em aberto, bem como investigar a combinação da ETCC com outras formas de intervenção.

Tabela 2. Estudos que combinaram a ETCC sobre o córtex pré-frontal dorsolateral em combinação com outras terapias.

Estudo	Combinação de Tratamento	Características do Tratamento com ETCC				Resultados
		Posição Eletrodos (A/C)	Tempo de sessão	Intensidade	Número de sessões	
Bennabi et al 2015	ETCC + Escitalopram (10-20mg)	F3/SOR	35	2	10	Protocolo de ETCC + escitalopram foi superior ao protocolo de escitalopram como monoterapia para o tratamento agudo, mas não em fase de seguimento
Brunoni 2013	ETCC + Sertralina (50mg)	F3/F4	30	2	12	Protocolo de ETCC + Sertralina foi superior aos tratamentos como monoterapia
Brunoni 2014	ETCC + Treino Cognitivo	F3/F4	30	2	10	Protocolo de ETCC + Treino cognitivo não foi superior ao protocolo de treino cognitivo como monoterapia
Mayur et al 2018	ETCC + ECT Ultra-breve	F3/F4	30	2	10	Protocolo de ETCC + ECT não foi superior ao protocolo de ECT como monoterapia
Monnard 2019	ETCC + Mindfulness	F3/F4	20	2	8	Protocolo de ETCC + Mindfulness foi equivalente ao protocolo de ETCC como monoterapia no final da fase aguda, mas superior em fase de seguimento.
Nord 2019	ETCC + Terapia Cog. Comportamental	F3/Deltoid Ipsilateral	20	1	8	Protocolo de ETCC + Terapia cognitiva não foi superior ao protocolo de Terapia cognitiva como monoterapia
Pavalova et al 2018	ETCC + Sertralina (50mg)	F3/SOR	20/30	0.5	10	Protocolo de 30 min de ETCC + Sertralina foi superior ao protocolo de 20 min de ETCC + sertralina e ao protocolo de sertralina como monoterapia
Segrave 2014	ETCC + Treino Cognitivo	F3/F8	24	2	5	Protocolo de ETCC + Treino cognitivo foi superior a ambos tratamentos como monoterapia
Welch 2019	ETCC + Terapia Cog. Comportamental	F3/F4	30	2	12	Sem poder estatístico para comparação dos grupos

A: Ânodo; C: Cátodo; ECT: Eletroconvulsoterapia; ETCC: Estimulação transcraniana por Corrente Contínua; SOR: supraorbital direto.

6. COMBINAÇÃO DA ETCC E EMTr

Alguns estudos já avaliaram a combinação da aplicação de ETCC com EMTr, mas grande parte da evidência atual é tida com a combinação das técnicas sobre o córtex motor e diferindo entre aplicação concomitante (online) ou sequenciais (offline). Em um destes estudos, três protocolos de estimulação foram analisados: 1) ETCC anódica (1mA), 2) ETCC catódica (1mA) e 3) ETCC placebo, aplicadas sobre o córtex motor primário esquerdo, seguidas de um protocolo de EMTr com 900 pulsos de 1Hz. Os resultados mostraram que a aplicação de ETCC modificou a plasticidade induzida pela administração subsequente de EMTr, uma vez que houve diminuição dos PEM com estimulação anódica e aumento significativo no grupo de estimulação catódica, enquanto que o grupo placebo permaneceu sem alterações significativas [116].

Outro estudo, também utilizando três protocolos: 1) ETCC catódica e 2) ETCC anódica a 1mA e 3) estimulação placebo, seguidas por um trem de 100 pulsos de EMTr de 5Hz no córtex motor esquerdo de voluntários saudáveis, apresentou resultados semelhantes: no protocolo 1 houve aumento, enquanto o protocolo 2 apresentou diminuição dos PEM [117].

No primeiro estudo combinando simultaneamente protocolos de ETCC com TBS em voluntários saudáveis, foram utilizados seis grupos: a) ETCC catódica + iTBS, b) ETCC anódica + iTBS, c) ETCC placebo + iTBS, d) ETCC catódica + cTBS, e) ETCC anódica + cTBS e f) ETCC placebo + cTBS, que foram aplicados sobre o córtex motor, em sessões distintas. Os resultados mostraram que a estimulação catódica aumentou os efeitos facilitadores de iTBS (grupo a) e diminuiu os efeitos de cTBS (grupo d), enquanto a estimulação anódica não teve influência significativa na resposta de iTBS (grupo b), mas suprimiu e até mesmo reverteu os efeitos de cTBS (grupo e) [118].

Recentemente, o primeiro estudo avaliando a aplicação concomitante de ETCC bilateral e iTBS sobre o CPF DL de sujeitos saudáveis foi conduzido. A ETCC foi aplicada sobre CDLPF direito e esquerdo, com duração de 20 minutos, intensidade de corrente de 20 minutos e eletrodos de 4.5 x 4.5 cms. A ETCC foi aplicada sozinha por 13 minutos e em combinação com iTBS (sobre CPF DL esquerdo) por 7 minutos. Nesse estudo, a aplicação dual das técnicas foi avaliada por meio de medidas neurofisiológicas do estresse, e falharam em demonstrar diferença significativa do protocolo combinado quando comparado ao grupo de iTBS sozinha. Entretanto, uma importante limitação do estudo é a falta de comparações dos achados a um grupo placebo [107].

Nesse sentido, a realização de pesquisas básicas sobre a aplicação combinada de ETCC e EMTr sobre o CPF avaliando desfechos distintos é crucial para investigar novas formas de aumento da ativação neural e, conseqüentemente, o aprimoramento dos protocolos terapêuticos.

7. PERFIL DE SEGURANÇA E TOLERABILIDADE DAS TÉCNICAS

A ETCC é considerada uma técnica segura, bem tolerada e que não produz efeitos adversos graves. Uma revisão sistemática recente demonstrou que os efeitos adversos mais relatados durante e após a sua aplicação foram eritema cutâneo, prurido no local da aplicação, sensação de queimação, sonolência e cefaleia [119] (Tabela 3). Episódios de mania e hipomania foram descritos em estudos com pacientes diagnosticados com depressão uni ou bipolar, mas ainda é difícil prever se esses sintomas foram causados pela técnica ou se foram ocasionados devido à história natural da doença. Porém, os resultados de uma recente meta-análise apresentaram risco maior para virada maníaca em sujeitos com depressão unipolar recebendo ETCC ativa quando comparada ao protocolo placebo [120].

Tabela 3. Incidência de efeitos adversos em estudos com ETCC. Adaptado de Sudbrack-Oliveira et al. 2021 [121].

Efeito Adverso	Grupo Ativo (%)	Grupo Placebo (%)
Formigamento	14.4	13.1
Vermelhidão	10.6	7.6
Coceira	6.7	5.8
Cefaleia	5.8	4.1
Sensação de queimação	6	4.2
Sonolência	6	4.8

Casos de lesões cutâneas abaixo dos eletrodos também já foram reportados em alguns estudos (ex. queimaduras) [122]. As lesões são geralmente reportadas em regiões frontais da cabeça, como testas e regiões sem cabelo, onde os eletrodos são aplicados diretamente na pele. As causas de fatores que podem intensificar o risco de queimadura ainda são desconhecidas, entretanto, os parâmetros da ETCC, posição dos eletrodos, alta impedância e problemas prévios de pele, podem influenciar o surgimento deste efeito colateral [31].

No geral, a ETCC apresenta algumas contraindicações relativas que devem ser mencionadas: 1) para evitar lesões cutâneas, os eletrodos não devem ser colocados sobre uma região com problemas de pele, como dermatite, psoríase ou eczema; 2) para evitar aquecimento e danos aos tecidos, os eletrodos não devem ser aplicados sobre ou entre as áreas com implantes metálicos; 3) indivíduos com história neurológica (neurocirurgia, epilepsia, malformação) e populações especiais, como mulheres grávidas, crianças e idosos, devem ser cuidadosamente considerados [121]. Todas as considerações citadas foram consideradas neste estudo.

Diferentemente da ETCC, a EMTr possui uma contraindicação absoluta que inclui a presença de materiais metálicos na cabeça (exceto boca), como implantes cocleares e dispositivos intracranianos como eletrodos, *stents* e cliques de aneurisma. Considera-se que o estímulo magnético possa aquecer ou deslocar estes dispositivos, com risco de lesão neurológica. Contraindicações relativas incluem o uso de marca-passo cardíaco, antecedente de epilepsia ou presença de lesões encefálicas estruturais [123].

Os efeitos adversos mais recorrentes são desconforto no local da aplicação, cefaleia e cervicalgia, que podem ocorrer em até 50% dos indivíduos. Entretanto, esses efeitos são geralmente de leve intensidade, são bem tolerados e raramente levam à descontinuação do tratamento [124]. Além disso, quanto maiores a intensidade e a frequência de estimulação, mais desconforto é relatado. O efeito mais temido da EMTr é a crise convulsiva, que já foi reportada em estudos que utilizaram pulsos únicos, pulsos pareados e também EMTr [125]. Todos os eventos registrados e reportados na literatura até o momento referem-se a eventos ictais ocorridos durante a estimulação [123].

Revisão recente da literatura mostrou que a incidência desses eventos é muito rara, inferior a 1%, mesmo quando são considerados estudos com amostras com doenças neurológicas. Ademais, a maior parte dos relatos na literatura ocorreram nos primeiros anos do uso da técnica, quando os limites e parâmetros de segurança

estavam ainda sendo estabelecidos [125]. As crises convulsivas ocorrem predominantemente associadas à estimulação de alta frequência. Estes protocolos devem ser realizados de forma intermitente, respeitando o intervalo mínimo de repouso entre as séries de estimulação.

Os protocolos de TBS também apresentam um bom perfil de segurança. Uma meta-análise avaliando a segurança destes protocolos revelou que os efeitos adversos encontrados são equivalentes ou menores que aqueles presentes em estudos com EMTr de alta frequência. Os efeitos colaterais mais reportados foram dores de cabeça transitórias (em quase 50% dos casos) e cervicalgia. Demais efeitos encontrados foram contração do músculo (região facial), náusea, tontura, lacrimejamento dos olhos, zumbido (Figura 10). Crises convulsivas aconteceram em 0,02% dos casos [126]. Em um outro estudo com pacientes depressivos, foram aplicadas cinco sessões de TBS por dia, com intensidade de 110% do LM de cada sujeito, durante quatro dias (total de 32.400 estímulos) e nenhum efeito colateral grave foi reportado [127]. Quanto ao risco de virada maníaca/hipomaníaca, não há evidência de que o tratamento ativo esteja associado com risco elevado desse desfecho.

Mesmo sendo uma técnica segura, as sessões de TBS deste estudo foram aplicadas seguindo todos os protocolos de segurança, bem como na presença de uma equipe treinada, qualificada para abortar uma crise convulsiva, caso ela ocorresse.

Os estudos que avaliaram as técnicas de ETCC e EMTr combinadas sobre o córtex motor não reportaram nenhum efeito colateral grave.

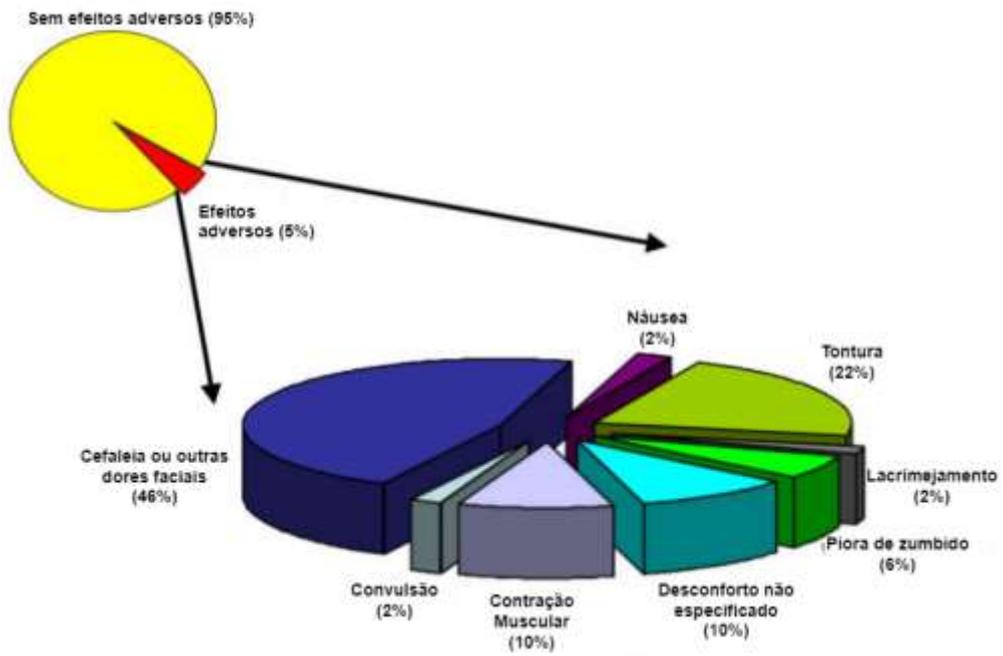


Figura 10. Incidência de efeitos adversos reportados durante estudos com iTBS. Adaptado de Oberman et al 2011 [126].

8. SPECT

O SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) cerebral, ou Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único, é uma técnica de neuroimagem funcional, introduzida para avaliação do fluxo sanguíneo cerebral regional, que permite o estudo não invasivo de eventos fisiológicos e fisiopatológicos do cérebro humano [128]. Para a obtenção das imagens, um radiofármaco é injetado no sujeito, e se acumula conforme o aporte vascular fornecido às diferentes regiões do cérebro. No exame SPECT, por meio de uma gama-câmera, uma imagem tridimensional é gerada, refletindo a captação e a retenção do radiofármaco. Quanto maior a perfusão sanguínea em determinada região cerebral, maior a captação do isótopo e vice-versa.

Esta técnica de neuroimagem é utilizada para diagnóstico, avaliação prognóstica, avaliação da resposta à terapia, estratificação de risco e escolha de terapia médica ou cirúrgica, para muitas condições neurológicas e psiquiátricas [129]. A utilização do SPECT em pesquisas com neuromodulação é promissora. Em ensaios com pacientes deprimidos, por exemplo, o exame auxiliou a entender que protocolos de EMTr a 1Hz e 15Hz apresentaram diferentes padrões de fluxo sanguíneo em regiões frontais e regiões adjacentes, sendo que protocolo de baixa-frequência (1Hz) levou a diminuição de atividade nas regiões cerebrais de interesse, enquanto o protocolo de alta frequência (15Hz) aumentou a atividade destas regiões logo após o término da sessão [130].

Como comentado anteriormente, os efeitos da ETCC sobre o CPF foram menos investigados em contraste com o córtex motor. Ademais, estudos apontam baixa confiabilidade de teste-reteste dos efeitos de ETCC sobre CPF com alguns métodos de neuroimagem, como é o caso da RM em estado de repouso [131,132]. Da mesma forma, os mecanismos de ação do TBS sobre o PFC não foram avaliados sistematicamente

[64]. Assim, para avaliar as mudanças no fluxo sanguíneo cerebral regional de CPFDL após as sessões de neuroestimulação, consideramos avaliar a perfusão cerebral usando SPECT.

O uso do SPECT é adequado para os fins deste estudo porque (1) comparado com a técnica de PET, o SPECT usa radioisótopos de longa duração e mais facilmente obtidos, permitindo aplicar testes cognitivos após o término das sessões de estimulação, e antes da aquisição de neuroimagem; (2) o radiofármaco injetado durante a sessão de estimulação permite avaliar alterações agudas na perfusão cerebral. A combinação de técnicas de neuromodulação e ressonância magnética simultaneamente é extremamente desafiadora e o aparelho de RM que permite aplicação conjunta com EMTr ainda não existe em território nacional; e (3) SPECT fornece uma medida direta da perfusão cerebral, em contraste com a técnica de RM funcional, que é baseada no sinal dependente do nível de oxigenação sanguínea (do inglês, *BOLD*) e tem baixa confiabilidade de teste-reteste em repouso para estudos ETCC [132].

9. OBJETIVOS

Considerando os efeitos modestos da ETCC como monoterapia no campo da neuropsiquiatria e os avanços na investigação da sua eficácia combinada às terapias complementares, esta pesquisa propõe investigar os efeitos isolados e simultaneamente combinados de protocolos de ETCC e iTBS sobre o córtex pré-frontal dorsolateral de sujeitos saudáveis, por meio de um teste de memória de trabalho e um método de neuroimagem funcional conhecida como SPECT. Para investigar o objetivo desta pesquisa, foi conduzido um estudo fase-I, fatorial, aleatorizado e duplo cego. O desenho fatorial foi escolhido pois permitiu testar três hipóteses simultaneamente (placebo vs. cada protocolo ativo como monoterapia e sua combinação) (Figura 11)[133].

		Estimulação Elétrica por Corrente Contínua	
		ETCC ativa	ETCC placebo
Estimulação Theta-Burst	iTBS ativa	Grupo ETCC ativa + iTBS ativa	Grupo ETCC placebo + iTBS ativa
	iTBS placebo	Grupo ETCC ativa + iTBS placebo	Grupo ETCC placebo + iTBS placebo

Figura 11. Desenho fatorial deste estudo.

Dessa forma, este estudo contribui não apenas para o conhecimento dos mecanismos de ação da aplicação simultânea das técnicas de ETCC e iTBS sobre o CPFDL, mas também investiga os mecanismos das técnicas como monoterapia, apresentando desfechos cognitivos e de neuroimagem. Considerando que estudos

avaliando a combinação destas técnicas sobre o CPFDL não foram realizados até o momento com técnicas de neuroimagem e cognição, pesquisas são fundamentais não somente para o aprofundamento do entendimento dos mecanismos de ação da aplicação das técnicas nesta região cortical, mas também para aprimoramento de protocolos terapêuticos.

O objetivo primário deste estudo foi avaliar a influência de cada protocolo em desfechos de neuroimagem em regiões de interesse (ROIs). As ROIs previamente estabelecidas foram o CPF e suas sub-regiões como o CPFDL, córtex orbitofrontal, CPF medial e o córtex cingulado anterior bilateralmente, uma vez que esta região está diretamente associada com a depressão maior. Entretanto, o córtex temporal, córtex cingulado posterior e a ínsula foram posteriormente incluídos como ROIs, uma vez que são regiões de neurocircuitarias adjacentes aos CPF, e são modulados com técnicas de neuroestimulação, como apresentado em estudos prévios [67]. O objetivo secundário foi identificar a influência de cada protocolo sobre a memória operacional. Análises secundárias foram conduzidas para investigar a interação iTBSxETCC, bem como os fatores ETCC e iTBS isoladamente sobre os desfechos de neuroimagem e cognição.

As hipóteses relacionadas com os achados de neuroimagem deste estudo foram a de que os protocolos ativos (ETCC e iTBS) apresentariam aumento de perfusão cerebral quando comparados ao protocolo placebo nas ROIs estabelecidas, enquanto o protocolo duplo-ativo aumentaria perfusão cerebral quando comparado aos protocolos em monoterapia e placebo.

As hipóteses relacionadas com os desfechos de cognição são similares: 1) os protocolos ativos (ETCC e iTBS) aumentariam performance na cognição quando comparado ao placebo; 2) o protocolo duplo-ativo aumentaria performance cognitiva quando comparado aos protocolos em monoterapia e placebo.

A hipótese secundária é de que as técnicas levariam a efeitos sinérgicos, tendo a interação iTBS X ETCC apresentando efeitos superiores em desfechos de neuroimagem e cognição, quando comparados aos fatores iTBS e ETCC isolados.

10. MATERIAS E MÉTODOS

10.1 Desenho do Estudo

Para a realização desta pesquisa foi proposto um desenho fatorial. Os sujeitos incluídos foram submetidos a 4 protocolos de estimulação, de forma aleatória, com um intervalo de uma semana entre eles (Figura 12).

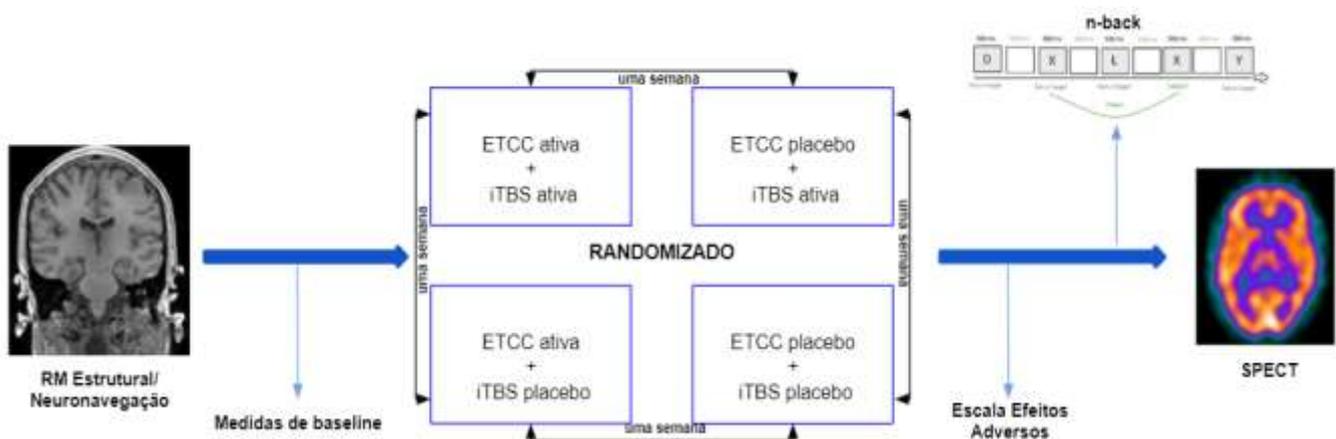


Figura 12. Sequência da aquisição dos dados deste projeto. Adaptado de Razza et al 2021 [133].

Os protocolos aplicados foram os que seguem:

1. ETCC placebo + TBS placebo sobre o CPFDL esquerdo;
2. ETCC bilateral (ânodo e cátodo sobre CPFDL esquerdo e direito, respectivamente) + TBS placebo sobre o CPFDL esquerdo;
3. ETCC placebo + iTBS sobre o CPFDL esquerdo.

4. ETCC bilateral (ânodo e cátodo sobre CPFDL esquerdo e direito, respectivamente) + iTBS sobre o CPFDL esquerdo;

O protocolo de ETCC bilateral aplicando ânodo e cátodo, respectivamente, sobre os CPFDLs esquerdo e direito, foi a montagem escolhida pois é o protocolo mais utilizado em ensaios clínicos com depressão. Ademais, a iTBS sobre CPFDL esquerdo foi o protocolo de escolha por ter sido recentemente aprovado para o tratamento da depressão, e por depender de um tempo mais curto de sessão (9 minutos) se comparada ao protocolo de EMTr de alta-frequência, com duração de 20 minutos.

Por fim, neste estudo, o protocolo (1) é considerado o grupo controle, o protocolo (2) é considerado o grupo 'ETCC', o protocolo (3) é o grupo 'iTBS' e (4) é o protocolo de 'Intervenções Combinadas'.

10.2 Estratégia de Recrutamento

O recrutamento dos voluntários desta pesquisa foi feito por meio de divulgação de *flyers* da pesquisa na Cidade Universitária da Universidade de São Paulo, bem como por meio de redes sociais, como o *Facebook*. As pessoas interessadas em participar voluntariamente da pesquisa eram orientadas a encaminhar um e-mail para o endereço de e-mail criado especificamente para essa pesquisa, neuromodulacao.pesquisa@gmail.com.

Inicialmente era enviado ao participante um e-mail de 'pré-triagem', em que era perguntado, além de dados demográficos (idade, sexo e escolaridade), alguns critérios básicos de elegibilidade (por exemplo, se já havia sido diagnosticado com algum transtorno psiquiátrico, se estava em uso de psicofármacos e se teria disponibilidade de comparecer ao centro de pesquisa uma vez por semana, por pelo menos quatro

semanas consecutivas). Caso o participante atendesse a todos os critérios específicos para a nossa pesquisa, era agendada uma triagem presencial, ocasião em que um avaliador treinado verificava se o voluntário tinha todos os critérios para ser elegível para a pesquisa.

10.3 Sujeitos

Foram recrutados sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 45 anos, destros, sem transtornos psiquiátricos ou neurológicos prévios ou presentes e/ou com doenças clínicas.

Em triagem presencial, psicólogos treinados avaliaram os participantes com o objetivo de investigar presença de diagnósticos psiquiátricos e neurológicos prévios ou atuais, com o auxílio de questionários de entrevista estruturados com base nos critérios diagnósticos do Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 5ª edição (DSM-5). Os avaliadores aplicaram a versão em português do Mini Exame do estado Mental [134], Escala de Depressão de Hamilton (HAMD) [135] e Inventário de Depressão de Beck (BDI) [136] com o objetivo de investigar, respectivamente, a presença de qualquer disfunção cognitiva ou transtornos de humor, como ansiedade ou depressão. A Escala de Afeto Positivo Afeto Negativo (PANAS) [137] também foi aplicada, pois estudos anteriores sugerem que esta escala pode ser uma escala preditora para a melhora clínica da depressão [106]. A escala de autoavaliação (BDI), foi aplicada a priori, e posterior heteroavaliação (HAMD) foi realizada a fim de confirmar o estado emocional dos participantes. Finalmente, o inventário de lateralidade de Edimburgo [138] foi aplicado para confirmar a lateralidade do participante,

Os critérios de exclusão para a pesquisa foram: 1) qualquer contra-indicação para as técnicas aplicadas (ETCC, EMTr, SPECT e RM), como implantes de metal na

região craniana, incluindo placas de metal no crânio e implantes no sistema nervoso central; 2) fumantes (acima de 10 cigarros por dia) ou abuso / dependência de outras drogas; 3) gravidez ou gravidez planejada durante o estudo; 4) uso de drogas psicoativas, incluindo drogas antidepressivas, benzodiazepínicos e drogas Z; 5) condições neurológicas ou clínicas graves; 6) condições que impeçam o comparecimento semanal ao serviço; 7) crises convulsivas prévias; 8) pontuação de HAMD > 7; 8) Pontuação do BDI > 10.

10.4 Aleatorização e Alocação

A lista de aleatorização dos protocolos deste estudo foi realizada no site www.randomizer.org. Foi programada uma aleatorização de 30 blocos, com 4 números únicos por bloco (de 1 a 4). Dessa forma, cada bloco foi gerado com combinações numéricas distintas (e.x: 1,3,4,2 ou 3,2,1,4). Essa forma de aleatorização possibilitou que a ordem das sessões fossem realizadas de forma aleatória entre os sujeitos. A alocação dos sujeitos foi realizada por meio de envelopes selados, por uma pessoa que não estava envolvida com este projeto de pesquisa.

10.5 Procedimentos

Todos os participantes selecionados para esta pesquisa leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, concordando, portanto, em participar do estudo. O estudo foi elaborado de acordo com a Declaração de Helsinque e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e pelo Comitê Nacional, via Plataforma Brasil (número de protocolo CAAE: 89310918.8.0000.0068).

Os participantes foram convidados a comparecer ao centro de pesquisa cinco vezes. No primeiro dia, todos os participantes foram submetidos à realização de uma Ressonância Magnética de 3 Tesla, para a aquisição de sequências estruturais T1 e T2, realizada na Divisão de Medicina Nuclear do HCFMUSP. A aquisição da RM foi realizada previamente para direcionar a localização dos córtices pré-frontal dorsolateral direito e esquerdo de cada sujeito, via sistema de neuronavegação (Brainsight, Rogue Resolutions, Inc). Ambos CPFDL esquerdo e direito foram localizados em cada participante por correção reverso das coordenadas estereotáticas MNI152 (x-38, y + 44, z + 26 ex + 38, y + 44, z + 26, respectivamente) e marcados em uma toca.

O método de navegação é considerado como padrão-ouro para a localização de estruturas encefálicas individuais, e as coordenadas utilizadas neste estudo foram avaliados como ideal para a localização dos pontos de interesse deste estudo (CPFDL esquerdo e direito) com base em resultados clínicos e de conectividade funcional de todo o cérebro [67,85]. Após a aquisição de RM e realização de neuronavegação, todas as demais sessões foram realizadas com uma semana de intervalo, para evitar efeitos *carry-over*. As sessões de estimulação e os testes cognitivos aconteceram em ambiente controlado, no Serviço Interdisciplinar de Neuromodulação - HCFMUSP, São Paulo, Brasil. Os mesmos procedimentos foram aplicados em cada uma das quatro sessões, e serão apresentados a seguir.

Antes do início de cada uma das quatro sessões experimentais, os participantes foram solicitados a responder algumas medidas de *baseline*, como escalas HAMD, BDI, PANAS e inventário de ansiedade de Hamilton (HAI), que foram aplicadas essencialmente para identificar o estado dos participantes antes das sessões de estimulação. Posteriormente, o limiar motor de repouso dos voluntários foi determinado usando uma máquina de EMT MagVenture (MagPro X100, Dinamarca) e uma bobina em forma de oito. O limiar motor foi realizado por meio da visualização da contração dos

músculos da mão direita - contralateral ao hemisfério estimulado. Após aferição de limiar motor, foi aplicado acesso venoso por uma biomédica treinada. O acesso venoso foi realizado previamente à estimulação para evitar a perfuração do voluntário durante as sessões de estimulação.

Após o acesso venoso, os sujeitos foram submetidos às sessões de neuroestimulação. Primeiramente, a sessão de ETCC era aplicada sozinha durante os 11 minutos iniciais e a iTBS era concomitantemente aplicada ao longo dos 9 minutos finais. O radiofármaco (^{99m}Tc -ECD) foi injetado logo após o início do protocolo de iTBS.

Para garantir a segurança de ambas as técnicas sozinhas e sua combinação, a Escala de Efeitos Adversos [119] foi aplicada imediatamente após o término das sessões de neuroestimulação. Essa escala consiste em identificar os efeitos produzidos e medi-los em uma escala de 1 a 4 pontos, sendo 1 - ausente, 2 - leve, 3 - moderado e 4 - grave. O teste de memória de trabalho (*n-back*) foi aplicado após a medição dos efeitos adversos.

Ao término do teste de memória de trabalho, os voluntários eram encaminhados à Divisão de Medicina Nuclear - HCFMUSP, onde o SPECT era adquirido por uma equipe treinada.

10.5.1 Protocolo de ETCC

As sessões de ETCC foram aplicadas com estimulação por corrente contínua de 2mA por meio de esponjas de 25cm² umidificadas em solução salina e tiveram duração total de 20 minutos (dispositivo Neuroconn DC-Stimulator MR - Neuroconn GmbH, Ilmenau, Alemanha). O ânodo e o cátodo foram colocados respectivamente sobre os CPFDLs direito e esquerdo de cada participante por corregristo com as coordenadas

estereotáxicas MNI152. O mesmo protocolo foi usado para a ETCC ativa e placebo, mas para o protocolo simulado a corrente teve um breve período ativo de 30 segundos com *ramp-up* e *ramp-down* no início e no final da sessão e a corrente atingindo o pico de 2mA. O dispositivo ETCC foi programado para fornecer estimulação ativa ou simulada de acordo com um código aleatorizado que era imputado no aparelho. A ETCC foi administrada sozinha por onze minutos e aplicada concomitantemente com a iTBS por nove minutos.

10.5.2 Protocolo do iTBS

Para as sessões de iTBS, a bobina de EMT foi colocada sobre o ânodo (CPFDL esquerdo localizado com base na neuronavegação) e posicionada a 45 graus em relação à linha média. O parâmetro de estimulação consistia em 54 ciclos de 10 rajadas triplas com uma duração de *train* de 2s e um intervalo de 8s entre os *trains* (um total de 1620 pulsos) a 110% do limiar do motor em repouso. O protocolo iTBS durou 8 minutos e 40 segundos. As sessões de iTBS ativa e simulada usaram o mesmo protocolo e foram aplicadas por meio de uma bobina Magventure (dispositivo Cool - B65 Active / Placebo - MagVenture). Essa bobina tem dois lados idênticos que fornecem estimulação ativa ou simulada. O lado da bobina é escolhido pelo dispositivo EMT quando um código aleatório é imputado.

10.5.3 Cegamento

Este estudo foi duplo-cego, o que quer dizer que nem voluntários, nem pesquisadores tinham conhecimento de qual protocolo estava sendo aplicado.

A ETCC é particularmente vantajosa para garantir o cegamento, isto porque a técnica produz poucos e leves efeitos colaterais durante sua aplicação. Além disso, neste estudo foi utilizado um aparelho de ETCC (Neuroconn) que permite a imputação de um código numérico aleatório na máquina, que previamente determina qual tipo de estimulação será realizada (ativa ou placebo). Esta informação é desconhecida ao aplicador e aos sujeitos. Para o protocolo placebo, uma corrente ativa era ligada, com uma subida de intensidade de 30 segundos, até atingir 2mA. Após atingir o pico de 2mA, a corrente produzia uma rampa de descida por 30s até ser desligada. O mesmo acontecia no minuto final da sessão de ETCC. Dessa forma, a aplicação inicial e final ativa garantem que o voluntário não perceba a diferença entre estimulação ativa e placebo. Este método assegura o duplo-cegamento.

Nos protocolos de TBS, foi utilizada uma bobina MagVenture com funções ativa e placebo. Seu design simétrico, sem indicação de lado ativo versus placebo, torna-a ideal para estudos duplo-cego. Para cada sessão, o aplicador tinha que digitar um código de aleatorização na máquina, que indicava o lado da bobina a ser utilizado. Além disso, em todas as sessões foram colocados dois eletrodos estimuladores na região de aplicação, com o objetivo de produzir, automaticamente, nos protocolos placebo, contrações musculares semelhantes às presentes no protocolo ativo. Este método garante o cegamento dos aplicadores, avaliadores e sujeitos.

10.5.4 Teste de memória operacional *n-back*

O teste *n-back* é amplamente utilizado para avaliar a memória operacional tanto em estudos com ETCC, quanto em estudos avaliando os efeitos cognitivos da EMTr. Nesse teste cognitivo, os participantes são solicitados a indicar se o estímulo atual, apresentado em tela de um computador, corresponde ao que foi apresentado “*n*”

tentativas na sequência. A memória operacional pode ser manipulada variando o número de letras que precisam ser armazenadas sequencialmente e atualizadas na memória operacional.

Neste estudo, o teste de memória operacional *n-back* foi programado no software E-prime 2.0 (Psychology Software, Tools Inc Pittsburgh, Pennsylvania, EUA). As imagens foram apresentadas em tela de computador LCD de 15 polegadas e os participantes ficaram sentados a uma distância de aproximadamente 50 cm da tela. O estímulo visual consistiu em letras do alfabeto (A a Z) que aparecem de forma individual e aleatória na tela do computador. Apenas a condição 2-back foi utilizada. A tarefa foi realizada com 3 blocos de 30 letras, cada um sendo exibido na tela por 500ms, com intervalo interestímulo de 3000ms. Os participantes tiveram que pressionar diferentes botões no teclado para estímulos corretos (*target*) e não corretos (tecla '2' para 'correto' e tecla '0' para 'não correto'). Os sujeitos precisavam apertar a tecla '2' quando o mesmo estímulo apresentado no computador era o mesmo e de duas posições anteriores.

O tempo de resposta e o número de respostas corretas (acurácia) foram os desfechos de interesse. Números de acurácia mais altos representam melhor performance no teste, enquanto tempos de resposta mais baixos (incluindo negativos) representam uma resposta mais rápida.

O teste *n-back* não foi aplicado antes das sessões de neuroestimulação para evitar efeitos de aprendizagem. Os efeitos de aprendizagem acontecem quando há aumento significativo ocorrendo nas pontuações dos testes cognitivos conforme o número de repetições aumenta até que a pontuação não mude mais e alcance estabilidade.

Além disso, o desempenho *n-back* após o protocolo placebo foi usado como o valor de referência em nossa comparação estatística e os protocolos de estimulação

aleatorizados e contrabalançados nos permitiram avaliar estatisticamente os efeitos de aprendizagem ao introduzir a ordem como uma variável em nossos modelos estatísticos. Esta metodologia foi aplicada com base em estudos anteriores que avaliaram o desempenho da memória de trabalho com intervenção não-invasivas de neuromodulação (Ruf et al., 2017).

10.5.5 Questionário de Efeitos Adversos

Para avaliação dos efeitos adversos produzidos por cada protocolo aplicado neste estudo, nós aplicamos o questionário elaborado por Aparício e colegas. Neste questionário é possível avaliar a intensidade do efeito adverso, bem como sua relação com o protocolo aplicado. Primeiramente, o sujeito é solicitado a descrever se o efeito adverso foi experimentado. Se isso ocorreu, é solicitado que classifique a intensidade do mesmo em uma escala Likert de 1 a 4 (1 - muito leve; 2 - leve; 3 - moderado; 4 - grave). A relação do efeito adverso com o protocolo aplicado também é acessada com uma escala Likert de 1 a 5, em que '1' é o equivalente a 'nenhuma relação' e 5 'relação absoluta'. Este questionário contém o termo "ânodo" e "cátodo" para destacar os efeitos adversos produzidos por cada polaridade, mas essa diferença não foi aplicada em nosso estudo.

Os efeitos colaterais acessados pelo questionário são: cefaleia, dor de pescoço, dor local, coceira, formigamento, queimação, vermelhidão, sonolência, alterações cognitivas, fadiga, náusea, contração muscular, convulsões e outros. Para acessar outros efeitos colaterais encontrados na literatura da EMTr, também acrescentamos 'mudanças de humor' e 'contração muscular facial'.

10.5.6 SPECT

Apesar de ter menor resolução temporal e espacial do que outras técnicas de medicina nuclear e Ressonância Magnética (RM), o uso do ^{99m}Tc SPECT é adequado para os objetivos deste estudo, que é avaliar os efeitos da combinação de ETCC com iTBS no CPFDL no momento da aplicação.

Para a realização do exame, todos os voluntários foram submetidos a um preparo prévio que recomendou a suspensão do uso de cafeína ou álcool e exercícios rigorosos na véspera da data do exame. Como preparação, foi considerado um jejum obrigatório de 6 horas. Água pura (com exceção de sucos, refrigerantes, ou alimentos líquidos) pôde ser ingerida à vontade, mesmo no dia do procedimento.

As imagens de SPECT foram adquiridas de 30 a 45 minutos após a administração intravenosa de dímero de etilcisteínato marcado tecnécio-99m (^{99m}Tc -ECD), atividade de 20 mCi (555 MBq). Os exames foram obtidos em equipamento de SPECT dedicado (General Electric - GE, Milwaukee, Wisconsin – USA) composto por dois conjuntos de detectores. As imagens de SPECT foram adquiridas sequencialmente com protocolo padronizado, utilizando-se fator de zoom de 2.5, matriz 128 x 128, com aquisição de 240 projeções de $3/3^\circ$ (duas voltas de 360°) a cada 20 segundos. O fotópico foi centrado em 140keV, com janela em 10% e o colimador '*Fan Beam*'. O processamento foi realizado com método de reconstrução interativa (OSEM) com filtro *Butterworth*, sendo a frequência de corte de 0,57 e número de ordem de 10. O número de interações utilizado foi de 20 e 40 de subset. O tempo total do exame foi de 45 minutos.

10.5.7 Ressonância Magnética

Todas as imagens foram adquiridas em um sistema RM 3-Tesla (equipamento General Electric PET / RM). As imagens volumétricas foram baseadas em sequências ponderadas em T1 e T2 usando uma sequência de pulso 3D FFE com os seguintes parâmetros: 1) sequência T1: FOV 25.6, TR 7.7ms, TE 3.1ms, FA 8 e 202 cortes na programação sagital; 2) sequência T2: FOV 25.6, TR 2500, TE 85 e 202 cortes na programação sagital. As aquisições de RM ocorreram pelo menos uma semana antes da primeira sessão de neuroestimulação/aquisição de SPECT na Divisão de Medicina Nuclear do Departamento de Radiologia (Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo). As sequências ponderadas em T1 foram utilizadas para a realização da neuronavegação e para a correção do volume parcial das imagens SPECT.

10.6 Cálculo Amostral

O tamanho da amostra foi calculado com o auxílio do software G*Power 3.1. Como se trata de um estudo inédito, estimamos um tamanho de efeito f moderado (0,25). Na análise, foram considerados 4 grupos, 4 mensurações, correlação entre as medidas repetidas de 0,5, alfa de 0,05 e poder de 0,85, obtendo-se um tamanho amostral de 28 participantes. Em comparação, o estudo de Hone-Blanchet et al. [61], que usou RM funcional combinada com ETCC, recrutou 17 sujeitos que participaram em 2 grupos (total de 34 observações).

10.7 Análises Estatísticas

Inicialmente, as imagens de SPECT e sequências T1 da RM foram convertidas do formato DICOM para o formato Analyse utilizando o software MRICROn [139]. As imagens de SPECT foram co-registradas com os dados estruturais da sequência T1-RM de cada indivíduo, utilizando o software PMOD™ versão 3.4. Todas as imagens foram manualmente orientadas de acordo com a comissura anterior do sistema de coordenadas tridimensional MNI. Em relação às imagens de SPECT, todas foram corrigidas pelo efeito de volume parcial (do inglês, *PVE*) utilizando o método *Meltzer*, com o objetivo de evitar fatores de confusão na captação do radiofármaco. O método *Meltzer* é amplamente utilizado para a correção de volume parcial e se baseia em um algoritmo de otimização de voxels, que está implementado no software PVElab [140]. As imagens estruturais da sequência T1 de cada sujeito foram espacialmente normalizadas para o padrão MNI, por meio do software SPM12 (Wellcome Trust Centre of Neuroimaging, London, United Kingdom), rodado em MATLAB versão R2012a (MathWorks, Natick, MA, USA), utilizando o protocolo DARTEL. Posteriormente, a normalização espacial da sequência T1 de cada indivíduo foi aplicada às imagens de SPECT corrigidas pelo PVE, a fim de obter a normalização espacial em MNI. Finalmente, as imagens de SPECT espacialmente normalizadas e corrigidas com PVE foram suavizadas utilizando um filtro Gaussiano de largura à meia-altura (do inglês, *FWHM*) de 8mm.

A aplicação de um *template* MNI foi necessária para que os voxels (unidades volumétricas de imagem) pudessem corresponder à mesma localização em cada indivíduo, de acordo com coordenadas tridimensionais x , y e z . Utilizando as coordenadas específicas, foi possível extrair os valores de voxel de regiões específicas de cada imagem.

Após estas etapas, os valores de voxel de cada ROI foram extraídos e carregados em software estatístico. Embora todas as etapas de construção de dados tenham sido realizadas através do software SPM12, optamos por usar o software estatístico para rodar análises mais refinadas, utilizando o modelo de efeitos lineares mistos, indicado para o desenho deste estudo. Esse modelo é indicado para a análise de medidas repetidas e nos permite utilizar efeitos fixos - variáveis que apresentam uma relação constante com o desfecho - e também efeitos aleatórios - variáveis que têm influência no desfecho, mas não estarão sendo individualmente avaliadas. Dessa forma, modelos lineares de efeitos mistos foram conduzidos para explorar os efeitos individuais de cada protocolo e a interação de ETCC x iTBS e os fatores isolados na ativação dos ROIs. Em nossos modelos, as interceptações individuais foram consideradas efeitos aleatórios, enquanto os protocolos e sessões foram considerados efeitos fixos. Como variável dependente, foi utilizado o número de voxels em cada ROI. Os resultados foram considerados significativos sob um valor de $p \leq 0,05$.

Para os dados de cognição, acurácia (porcentagem de resposta correta) e tempo de reação (RT, em milissegundos (ms)) apenas para o estímulo correto foram as variáveis dependentes avaliadas. Porcentagens mais altas de acurácia representaram uma melhoria, enquanto os valores de RT mais baixos representaram uma resposta mais rápida. RTs > 1200ms foram considerados respostas não genuínas e, portanto, foram substituídos por 1200ms [139]. Os dados foram transformados usando o logaritmo de cada variável RT e ACC devido à distribuição não normal [139].

Para análise de desfecho principal, realizamos uma análise de variância de uma via para investigar a influência de cada protocolo sobre os resultados de desfecho cognitivos que foram médias de RT e ACC por grupo. Esses resultados também foram ajustados por características demográficas (como sexo e idade). Análises de comparações múltiplas não foram conduzidas devido ao pequeno tamanho amostral.

Para a análise fatorial, utilizamos uma análise de variância de duas vias (2x2) para avaliar os efeitos isolados de ETCC e iTBS e sua interação (ETCC X iTBS) sobre as médias de RT e ACC. Nesta análise consideramos médias de RT e ACC como variáveis dependentes, duas variáveis independentes (ETCC e iTBS, cada qual com dois níveis) e a interação condicional ETCC X iTBS. Com esta análise fatorial é possível identificar: a) caso a interação não seja significativa, isso significa que os efeitos das técnicas são aditivos e os fatores são independentes; b) caso a interação seja significativa, então os fatores não são independentes e possuem efeitos sinérgicos ou antagônicos.

A correção Greenhouse-Geisser foi aplicada sempre que a esfericidade foi violada. Os resultados foram significativos com valor de $p \leq 0,05$. Eta quadrado (η^2) foi o tamanho do efeito medido (0,02, 0,13 e 0,26 efeitos correspondentes a efeitos pequenos, médios e grandes, respectivamente).

As análises de tolerabilidade, para investigação dos efeitos adversos por protocolos, foram conduzidas com análise de variância de duas vias, tendo cada efeito colateral acessado como variável dependente e protocolos como variável independente.

10.7.1 Regiões do Córtex Pré-Frontal

Escolhemos a abordagem baseada em ROIs devido ao nosso tamanho amostral. Abordagens mais refinadas, como a análise de componentes independentes, seriam ainda mais vulneráveis com o nosso número de dados. Algumas das regiões do córtex pré-frontal foram definidas de acordo com uma publicação prévia que estabeleceu sub-regiões do CPFDL com base em estudos de dados funcionais e de abordagem com tractografia em humanos e primatas (REF). Nessa publicação, os autores dividiram o CPFDL em dez sub-regiões, que são atribuídas a áreas de Brodmann (BAs) [67]. Este atlas foi escolhido por permitir identificar regiões do CPFDL levando em consideração

dados anatômicos e funcionais. As sub-regiões extraídas foram a área de brodmann (BA) 9 esquerda, BA10 e BA9 / 46D (sub-região anterior), BA10 esquerda (sub-região anterior única) e BA9 direita (sub-região única medial) e BA10 direita (Figura 13). Além dessas regiões, também foram extraídas, bilateralmente, as regiões de córtex orbitofrontal, córtex frontal medial, córtex dorsolateral e pré-frontal.



Figura 13. Sub-regiões do córtex pré-frontal dorsolateral. Extraído de Bulubas et al 2019 [105].

11. RESULTADOS

11.1 Participantes

Ao todo, 211 participantes apresentaram interesse em participar da nossa pesquisa. Desses, 105 foram excluídos por apresentarem algum critério de exclusão no email de pré-triagem e outros 50 não responderam ao e-mail de triagem prévia. Dos 56 sujeitos que foram selecionados para triagem presencial, 30 apresentaram todos os critérios de elegibilidade para participar da pesquisa, mas 5 desistiram antes de assinar o termo de consentimento e começar a pesquisa. Ao todo, 25 participantes foram alocados, dos quais 23 realizaram as 4 sessões de estimulação e 2 realizaram apenas uma sessão.

Infelizmente, tivemos que encerrar a pesquisa após a primeira sessão dos dois últimos voluntários devido à falta de recebimento de radiofármaco (ECD) que a Divisão de Medicina Nuclear do HCFMUSP está enfrentando. A falta de fornecimento do material, que é imprescindível para a realização do exame SPECT, durou mais de um ano, sem previsão de retorno. Assim, foi preciso encerrar nossa pesquisa com um total de 94 sessões realizadas.

No geral, os sujeitos que participaram da pesquisa tinham idade média de 28.6 anos (desvio padrão (DP) = 7), 17 (DP =3.1) anos de escolaridade e 76% eram mulheres. Na Tabela 4, é possível ver as características demográficas médias dos sujeitos, bem como as características clínicas gerais dos sujeitos incluídos nesta pesquisa. As pontuações das escalas de humor aplicadas previamente às sessões de neuromodulação não sugerem alterações significativas do estado de humor dos sujeitos entre as sessões (Tabela 5).

Tabela 4. Dados demográficos e clínicos globais dos participantes incluídos.

Características Demográficas

Idade (média/DP), anos	28.6 (7.0)
Gênero (F/M)	19/6
Anos de Estudo (média/DP)	17 (3.1)
Etnia (%)	
Negro	36
Branco	60
Amarelo	4
Religião (%)	
Evangélico	8
Católico	20
Espírita	4
Judeu	4
Ateu/Agnóstico	40
Não tem	24
Estado Civil (%)	
Casado	16
Solteiro	84

Características Clínicas

HAS (%)	4
Diabetes (%)	0
Obesidade (%)	4
Tabagismo (< 10 cigarros/semana) (%)	8

Tabela 5. Média dos escores de medidas de linha de base por sessão.

	Sessão 1	Sessão 2	Sessão 3	Sessão 4	p-valor
HDRS	1.45 (1.8)	1.2 (1.4)	0.8 (1.4)	0.9 (0.9)	0.35
BDI	3.1 (3.7)	1.8 (2)	1.6 (2.1)	1.3 (2.1)	0.08
PA	32.7 (56.7)	32.7 (5.6)	32.9 (4.7)	31.8 (6.8)	0.9
NA	13.9 (4.8)	13.3 (3.4)	13.3 (3.4)	13.2 (3.6)	0.8
HAI	3.8 (5.7)	2.6 (3)	2.3 (3)	1.9 (2.7)	0.3

11.2 Objetivo primário: Neuroimagem

Para as nossas análises, o córtex pré-frontal foi dividido em diversas partes para a extração dos voxels de cada região de interesse. Primeiramente, extraímos os valores de voxels de ambos córtex pré-frontal direito e esquerdo. Em seguida, sub-regiões do córtex pré-frontal foram investigadas. Analisamos os valores de voxels das coordenadas MNI do CPFDL utilizadas para a aplicação das técnicas de neuromodulação ($x-38$, $y + 44$, $z + 26$ e $x + 38$, $y + 44$, $z + 26$), a região dorsolateral pré-frontal direita e esquerda e suas sub-regiões, como áreas BA09, BA10, BA46 e BA09/BA46. Além destes, os córtices pré-frontal medial e orbitofrontal também foram avaliados bilateralmente.

Nossas análises também consideraram regiões cerebrais mais distantes do alvo de estimulação, mas que estão envolvidas em neurocircuitarias ativadas pela aplicação de iTBS e/ou ETCC, como visto em estudos anteriores [57,86]. Essas regiões são: córtex cingulado, ínsula e córtex temporal.

11.2.1 Comparação com o protocolo placebo

As análises com regiões do córtex pré-frontal demonstraram que a ETCC sozinha aumentou o fluxo sanguíneo em regiões orbitofrontal esquerda (coef.<0.001, $z=2.06$, $p=0.04$) (Figura 14) e direita (coef.=0.86, $z= 2.35$, $p=0.02$) (Figura 15). Nenhum outro protocolo de estimulação apresentou diferença significativa em fluxo sanguíneo nas regiões de interesse do córtex pré-frontal quando comparados ao placebo.

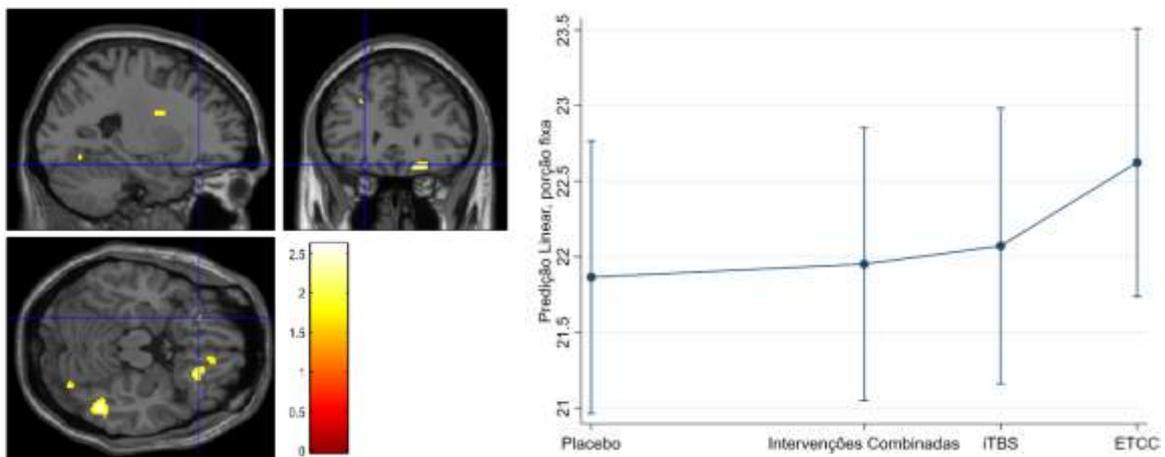


Figura 14 . Ativação em região orbitofrontal esquerda com aplicação de protocolo de ETCC.

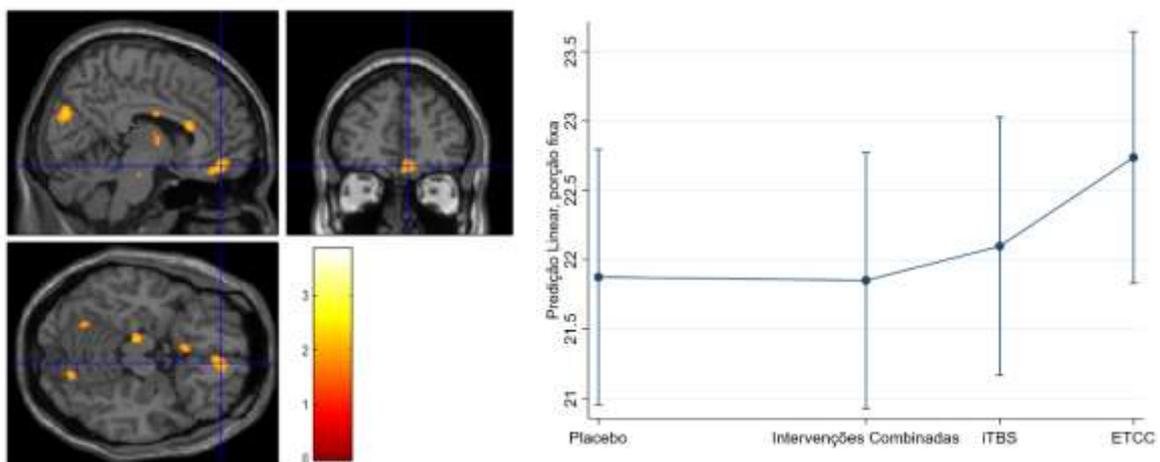


Figura 15. Ativação em região orbitofrontal direita com aplicação de protocolo de ETCC.

Por sua vez, em regiões mais remotas foi possível observar que o protocolo de intervenções combinadas aumentou o fluxo sanguíneo em córtex cingulado anterior esquerdo (coef. = 0.1, $z = 2.12$, $p = 0.03$) (Figura 16) e posterior direito (Figura 17) (coef. <math>< 0.001</math>, $z = 2.74$, $p = 0.02$). O protocolo de iTBS não apresentou nenhuma alteração significativamente diferente quando comparada ao placebo.

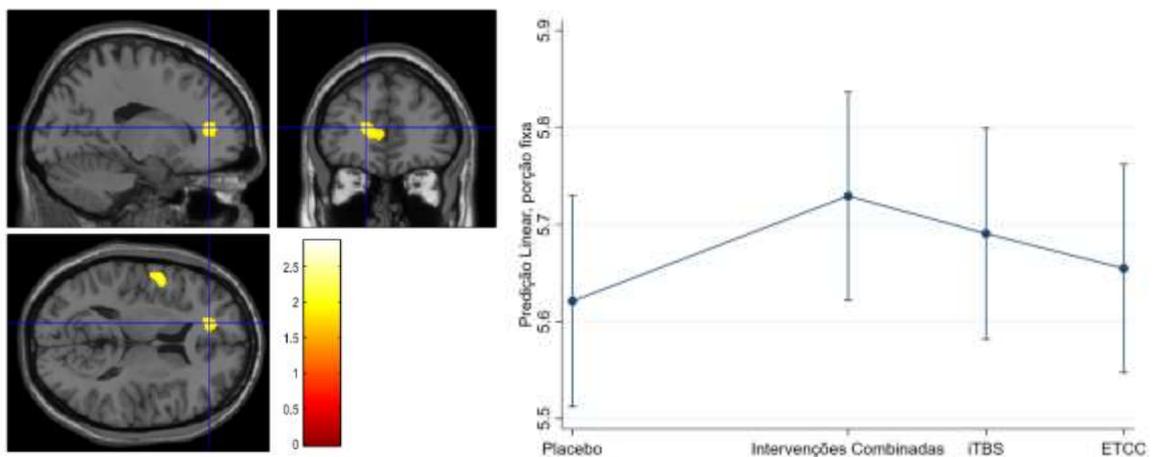


Figura 16. Ativação em região esquerda do córtex cingulado anterior com aplicação de protocolo de Intervenções Combinadas.

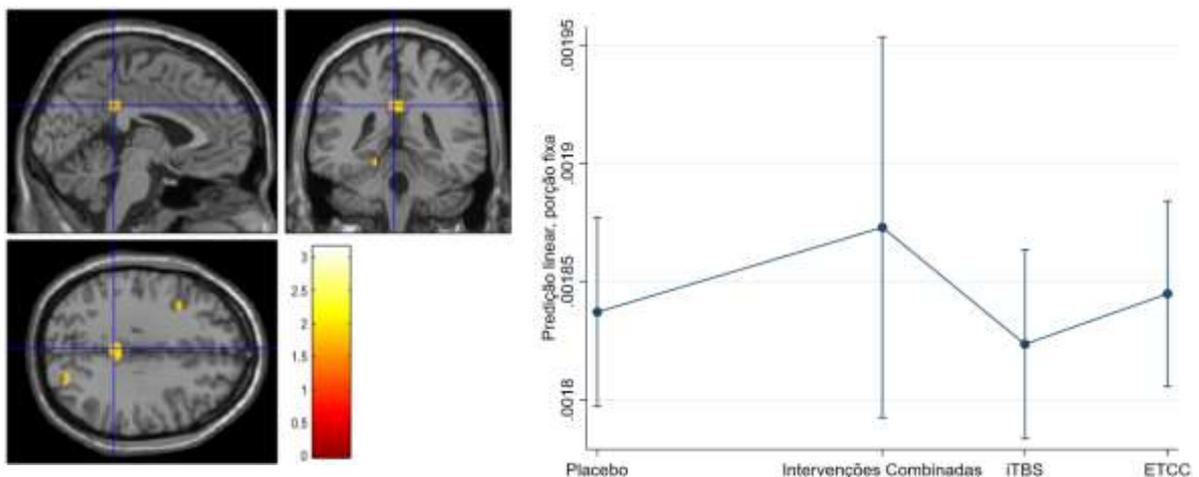


Figura 17. Ativação em região direita do córtex cingulado posterior com aplicação de protocolo de Intervenções Combinadas.

11.2.2. Comparação entre protocolos ativos

Na comparação entre os protocolos ativos, a ETCC apresentou aumento significativo do fluxo sanguíneo em córtex orbitofrontal direito em comparação ao protocolo de iTBS ($p=0.018$), assim como foi visto em relação ao protocolo placebo. Por outro lado, a ativação da ínsula esquerda mostrou-se significativamente aumentada com os protocolos de iTBS ($p=0.03$) e intervenções combinadas ($p=0.03$) se comparados ao protocolo de ETCC ativa (Figura 18).

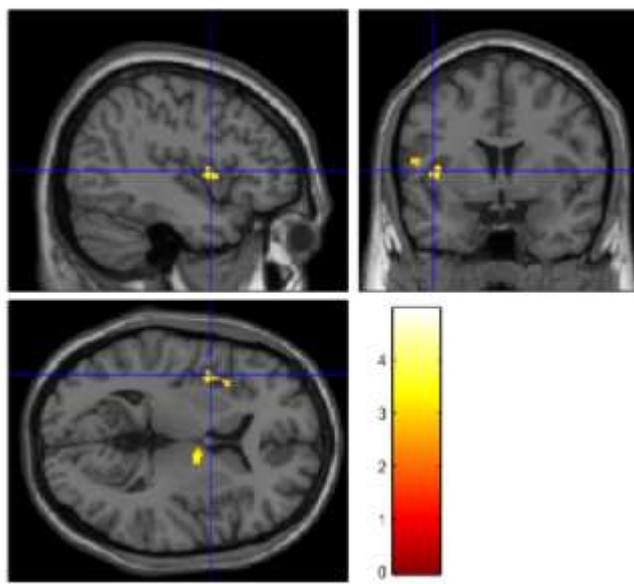


Figura 18. Ativação em ínsula esquerda.

Além disso, ativações significativamente aumentadas em comparação à ETCC também foram observadas em córtex frontal superior medial esquerdo ($p=0.006$) com iTBS e em córtex temporal esquerdo ($p=0.04$) com o protocolo combinado.

11.3 Objetivo Secundário: Memória Operacional

Dentre os 94 testes cognitivos realizados, um precisou ser excluído pois os resultados apresentados pelo software E-prime estavam corrompidos. Inicialmente, consideramos os 93 resultados em análises de variância de uma via e análises fatoriais, mas nenhum resultado significativo foi encontrado. As Tabelas 6 e 7 apresentam os resultados destas análises, respectivamente.

Tabela 6. Resultados das análises de variância de uma via com os dados de todas as sessões.

Protocolo	
2-Back	
Acurácia	F(3,89)=0.3, p=0.9, $\eta^2 = 0.008$
Tempo de Reação	F(3,89)=0.3, p=0.8, $\eta^2 = 0.01$

Tabela 7. Resultados das análises fatoriais com os dados de todas as sessões.

	ETCC	iTBS	Interação ETCC x iTBS
2-Back			
Acurácia	F(1,89)=0.7, p=0.4, $\eta^2 < 0.001$	F(1,89)=0.04, p=0.8, $\eta^2 < 0.001$	F(1,89)=0.005, p=0.9, $\eta^2 < 0.001$
Tempo de Reação	F(1,89)=0.9, p=0.4, $\eta^2 = 0.01$	F(1,89)=0.03, p=0.9, $\eta^2 < 0.001$	F(1,89)=0.12, p=0.7, $\eta^2 < 0.001$

ETCC: Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua; iTBS: Estimulação Theta-Burst Intermitente.

Entretanto, ao explorar nossos dados, percebemos que estes foram significativamente influenciados pela variável sessão. Visto isso, inferimos que o

desenho deste estudo (1 sessão por semana) provavelmente levou a um efeito aprendizagem no teste de cognição ao longo das quatro sessões. Como exemplo desses achados, a Figura 19 apresenta visualmente a diferença em desempenho do tempo de reação para o teste 2-back ao longo das quatro sessões ($F(3,89)=3.6$, $p=0.01$, $\eta^2 = 0.1$), tendo o tempo de reação diminuindo ao longo do tempo. Ou seja, a repetição do teste cognitivo levou ao aprimoramento da tarefa.

Dessa forma, todas as análises de teste cognitivo foram rodadas apenas com os dados do subset 'sessão 1'. Os achados de ACC e RT para este subset estão apresentados na Tabela 8.

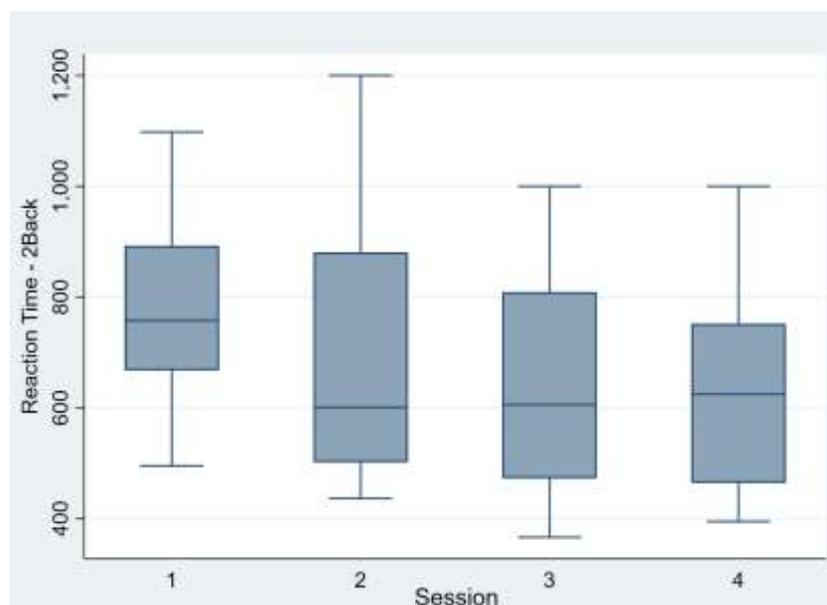


Figura 19. Diferença de desempenho em tempo de reação ao longo das sessões.

A análise de variância de uma via foi rodada com o objetivo de investigar os efeitos de cada protocolo nas variáveis RT e ACC. Por termos analisado apenas os resultados da primeira sessão, as análises de desfecho cognitivo foram consideradas exploratórias, e, portanto, ajustes de múltiplas comparações para avaliar a diferença entre os protocolos não foram realizados. Os resultados revelaram um efeito significativo entre os protocolos para RT ($F(1,23) = 4,2$, $p = 0,02$, $\eta^2 = 0,38$) (Figura 20A), mas não para ACC ($F(1,23) = 1,57$, $p = 0,60$, $\eta^2 = 0,08$) (Figura 20B). Nenhuma característica demográfica, como sexo e idade, influenciou significativamente os resultados gerais.

Tabela 8. Resultados da análise de variância de uma via com dados da sessão um.

	Placebo (Sujeitos = 5)	Intervenções Combinadas (Sujeitos = 7)	iTBS (Sujeitos = 5)	ETCC (Sujeitos = 7)	<i>p</i> -valor
2-Back					
% Acurácia	0.828 (0.23)	0.695 (0.16)	0.648 (0.23)	0.737 (0.19)	0.6
Tempo de Reação	880.1 (159.1)	695.3 (171)	657.9 (92.2)	864.3 (103.9)	0.02

ETCC: Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua; iTBS: Estimulação Theta-Burst Intermitente.

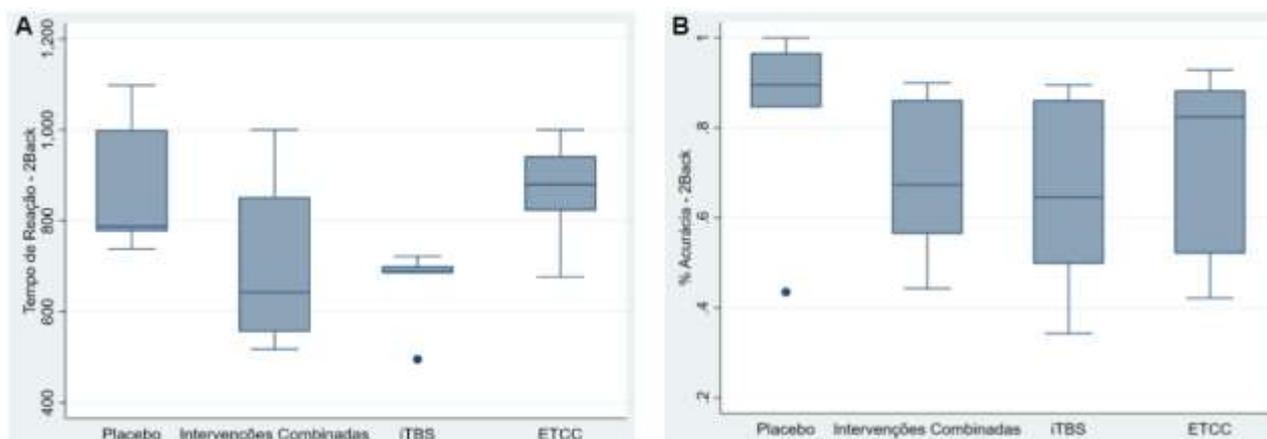


Figura 20. Média de (A) tempo de reação e (B) acurácia entre os protocolos.

11.4 Análises Secundárias

11.4.1 Neuroimagem: Análise Fatorial

A análise fatorial foi rodada com o objetivo de identificar a interação entre ETCC e iTBS e os fatores isolados sobre o desfecho de neuroimagem. Os achados das análises fatoriais mostraram o fator ETCC significativamente influenciando o aumento de perfusão cerebral em região orbitofrontal esquerda (coef.= 0.75, $z= 2.06$, $p=0.04$) e direita (coef.=0.86, $z= 2.35$, $p= 0.02$). A interação iTBS x ETCC apresentou aumento significativo de fluxo sanguíneo em região orbitofrontal esquerda (coef.= 0.76, $z=2.06$, $p=0.04$) e no córtex temporal esquerdo (coef. = 0.45, $z=2.09$, $p=0.047$) (Figura 21).

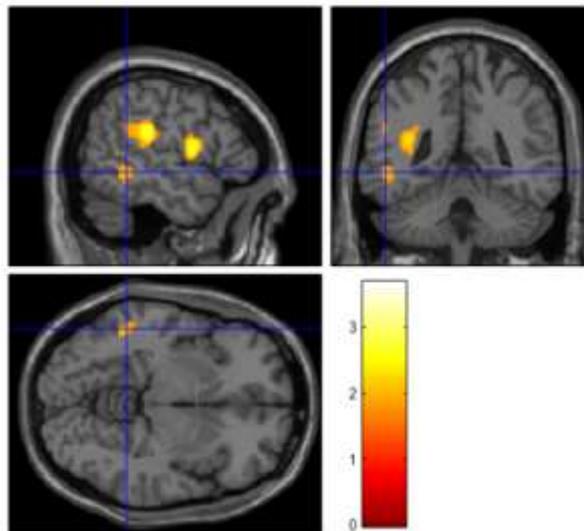


Figura 21. Ativação em córtex temporal esquerdo

11.4.2 Memória Operacional: Análise Fatorial

A análise fatorial foi rodada com o objetivo de identificar a interação entre ETCC e iTBS sobre o desfecho cognitivo. Nesta análise, médias de RT e ACC foram as variáveis dependentes. A análise fatorial, porém, não revelou nenhum efeito significativo para a interação entre iTBS e ETCC para ambos RT ($F(1,20) = 0,13$, $p = 0,72$, $\eta^2 =$

0,006) (Figura 22A) e ACC ($F(1,20) = 0,67, p = 0,4, \eta^2 < 0,001$) (Figura 22B) na tarefa 2-back, mostrando que a interação das técnicas não estava associada aos desfechos cognitivos.

Por outro lado, a análise fatorial mostrou que o fator iTBS estava relacionado com uma resposta mais rápida ($F(1,20) = 12,4, p = 0,02, \eta^2 = 0,38$) (Figura 22C), enquanto nenhum efeito significativo foi encontrado para o fator ETCC em RT ($F(1,20) = 0,73, p = 0,40, \eta^2 = 0,04$) (Figura 22D). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas na acurácia de respostas para os fatores iTBS e ETCC ($F(1,20) = 0,3, p = 0,3, \eta^2 < 0,001$ e $F(1,20) < 0,001, p = 1,0, \eta^2 < 0,001$, respectivamente).

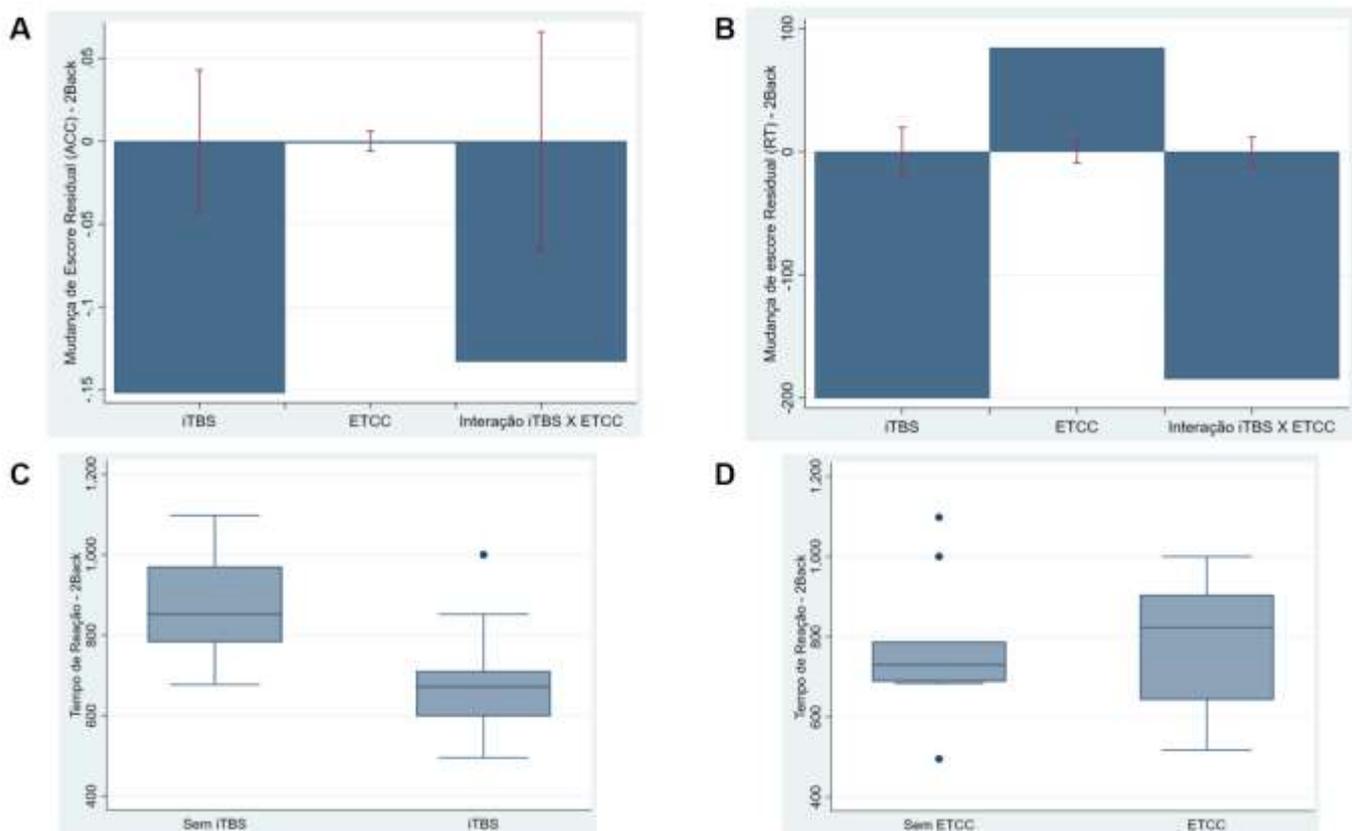


Figura 22. Performance no teste de memória operacional com análises fatoriais. A) Mudança de escore residual para acurácia; B) Mudança de escore residual para tempo de reação; C) Influência do fator iTBS sobre tempo de reação; D) Influência do fator ETCC sobre o tempo de reação.

11.5 Segurança e tolerabilidade

Nenhum efeito adverso sério (ex. convulsão) foi reportado durante ou após as sessões de neuroestimulação. Para cada evento adverso reportado na Tabela 9 foi perguntado ao participante a gravidade do mesmo em uma escala Likert de 1 a 4 e a relação do efeito colateral com o protocolo de estimulação aplicado. Para nossas análises, até mesmo os efeitos colaterais que foram considerados sendo 'improváveis' (escore =1) de estarem relacionados com o protocolo de estimulação, foram considerados em nossas análises.

De acordo com os dados de nosso estudo, as incidências de efeitos colaterais foram baixas, tendo coceira, formigamento, vermelhidão e sonolência como os efeitos colaterais mais reportados. Entretanto, os resultados das análises de variância de uma via mostraram efeitos significativos na incidência de cefaleia ($F(3,90) = 3.48, p = 0.02$), vermelhidão ($F(3,90) = 4.9, p = 0.003$) e contração muscular ($F(3,90) = 3.73, p = 0.01$) entre os protocolos. Numericamente, os protocolos com iTBS ativa (iTBS sozinha e intervenções combinadas) apresentaram maior incidência de cefaleia e contração muscular se comparados ao protocolo de ETCC e placebo. Em contrapartida, os protocolos com ETCC ativa (ETCC sozinha e intervenções combinadas) apresentaram maior incidência de vermelhidão no local de aplicação dos eletrodos, se comparado aos protocolos de iTBS sozinha e placebo.

Tabela 9. Incidência de efeitos colaterais por protocolo aplicado.

Efeitos Adversos	Placebo (Sessões = 23)	Intervenções Combinadas (Sessões = 24)	iTBS (Sessões = 23)	ETCC (Sessões = 24)	<i>p-valor</i>
Cefaleia	0 (0%)	13 (10.9%)	10 (8.7%)	0 (0%)	0.02
Dor de Pescoço	2 (1.7%)	0 (0%)	3 (2.6%)	4 (3.3%)	0.75
Dor Local	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Coceira	29 (25.2%)	31 (25.8%)	28 (24.3%)	31 (25.8%)	0.99
Formigamento	29 (25.2%)	31 (25.8%)	28 (24.3%)	31 (25.8%)	0.99
Queimação	2 (1.7%)	8 (6.7%)	2 (1.7%)	6 (5.2%)	0.47
Vermelhidão	23 (20%)	42 (35%)	20 (17.4%)	45 (37.5%)	0.003
Sonolência	16 (13.9%)	12 (10%)	10 (8.7%)	25 (20.8%)	0.24
Alterações Cognitivas	3 (2.6%)	2 (1.7%)	0 (0%)	4 (3.3%)	0.75
Alteração de Humor	3 (2.6%)	5 (4.2%)	3 (2.6%)	6 (5.2%)	0.92
Fadiga	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Náusea	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Contração Muscular	8 (6.9%)	23 (19.2%)	29 (25.2%)	6 (5.2%)	0.01
Convulsões	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-

ETCC: Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua; iTBS: Estimulação Theta-Burst Intermitente.

12. DISCUSSÃO

Neste ensaio aleatorizado, controlado, fatorial e duplo cego foram avaliados os efeitos isolados e combinados de ETCC e iTBS sobre o córtex pré-frontal de sujeitos saudáveis por meio de medidas de neuroimagem e de memória operacional. De um total de 211 voluntários interessados em participar da pesquisa, 25 participantes foram incluídos (idade média = 28.6 (7)) e aleatoriamente alocados para receber 4 sessões de neuromodulação cada: a) ETCC ativa; b) iTBS ativa; c) Placebo; d) Intervenções Combinadas. Ao todo foram realizadas 24 sessões de Intervenções Combinadas e ETCC e 23 sessões de iTBS e placebo, somando um total de 94 sessões. Os achados específicos dos resultados de neuroimagem e de cognição serão discutidos abaixo.

12.1 Achados de Neuroimagem

O objetivo primário desta tese foi avaliar as alterações na perfusão cerebral de sujeitos saudáveis a partir da aplicação combinada de iTBS e ETCC, seus protocolos como monoterapia e placebo em regiões de interesse. A hipótese primária do nosso estudo era de que o protocolo de intervenções combinadas aumentaria a perfusão cerebral das regiões de interesse quando comparado aos demais protocolos. Entretanto, nossos achados foram diversos. O protocolo de ETCC levou ao aumento significativo de fluxo sanguíneo em região orbitofrontal esquerda se comparado ao protocolo placebo, e em região orbitofrontal direita em comparação ao placebo e iTBS. Por sua vez, o protocolo de intervenções combinadas aumentou a ativação de regiões mais remotas ao córtex frontal. Por exemplo, quando comparado ao placebo, o protocolo duplo ativo aumentou o fluxo sanguíneo em córtices cingulados anterior esquerdo e cingulado posterior direito, mas também apresentou maior ativação em ínsula esquerda e em córtex temporal quando comparado à ETCC. Por fim, o protocolo de iTBS foi

superior à ETCC na ativação da ínsula esquerda e do córtex frontal superior medial esquerdo.

Em relação aos achados com o protocolo de intervenções combinadas, o aumento da ativação do córtex cingulado anterior com aplicação de intervenções combinadas é um resultado particularmente importante para este estudo, uma vez que o cingulado anterior está diretamente associado a alterações funcionais e anatômicas em quadros de depressão. Estudos prévios mostraram que pacientes depressivos apresentam volume reduzido e diminuição de fluxo sanguíneo cerebral na porção anterior do córtex cingulado [140,141]. Como o córtex cingulado não pode ser diretamente estimulado com ETCC ou com bobinas mais tradicionais de EMTr, como bobina em figura de 8, circular ou duplo-cone, diversos estudos investigam a possibilidade do CPFDL esquerdo ser um alvo importante para acessar a neurocircuitaria da depressão, que apresenta desbalanço em atividades de porções corticais, mas também subcorticais do cérebro.

Na verdade, estudos prévios mostram que a conectividade entre CPFDL esquerdo e córtex cingulado podem estar diretamente associados com a eficácia clínica da EMTr [67]. Foi observado que coordenadas específicas do CPFDL podem aprimorar a conectividade com estas áreas mais remotas do cérebro e aumentar os efeitos terapêuticos da EMTr. Em nosso estudo, por exemplo, aplicamos neuronavegação com as coordenadas MNI ótimas do CPFDL esquerdo para esta finalidade, como descrito em Fox e colegas, 2012 [67]. Segundo os pesquisadores, essas coordenadas podem aprimorar a resposta clínica das técnicas de neuromodulação. É interessante notar que mesmo utilizando coordenadas MNI ótimas, a iTBS sozinha, ou até mesmo a ETCC, não modularam esta região em sujeitos saudáveis com apenas uma sessão de estimulação. Esses achados são animadores para o campo uma vez que o protocolo combinado pode ser uma possibilidade de otimizar os efeitos de conectividade entre o

CPFDL e o córtex cingulado anterior e posterior, ampliando a eficácia do tratamento da depressão com técnicas de neuromodulação não invasiva.

Outro achado interessante foi que o protocolo de intervenções combinadas modulou outras regiões mais distantes do córtex pré-frontal, como a ínsula e o córtex temporal esquerdo. Na verdade, estudos anteriores sugerem que a aplicação de iTBS sobre o CPFDL pode modular a ativação da ínsula, região que está funcionalmente conectada com essa porção do córtex pré-frontal [142,143], bem como o circuitaria fronto-cíngulo-temporal [86]. Nossos achados sugerem que a ínsula esquerda foi significativamente ativada com ambos protocolos que aplicaram iTBS ativa - iTBS isolada e intervenções combinadas. Esses achados eram previamente esperados uma vez que a iTBS é uma intervenção que possui mais focalidade e profundidade que a ETCC, e pode atingir regiões mais profundas mais facilmente.

Por outro lado, o protocolo de intervenções combinadas apresentou alterações significativas também em córtex temporal esquerdo, achado que não pôde ser confirmado com o protocolo de iTBS sozinha. Interessantemente, nossos dados podem sugerir que a aplicação dual de ETCC e iTBS leva a modulação mais robusta de redes associadas ao córtex pré-frontal quando comparada aos demais protocolos. Esse achado também é animador do ponto de vista clínico uma vez que a rede frontotemporal é uma circuitaria com atividade desbalanceada em quadros depressivos [144] e em outros quadros psiquiátricos [145].

Por sua vez, o protocolo de ETCC foi o único que apresentou alterações mais robustas em regiões corticais do pré-frontal. Os achados apontam que ETCC modulou significativamente o córtex orbitofrontal esquerdo em relação ao placebo, e o córtex orbitofrontal direito em comparação ao protocolo placebo e iTBS. É de se esperar que alterações significativas sejam encontradas sobre o córtex pré-frontal direito com aplicação de ETCC em comparação com o protocolo de iTBS ou o placebo, uma vez

que estes não aplicaram nenhum estímulo ativo sobre o córtex direito. Entretanto, é interessante que essas alterações tenham sido observadas em regiões frontais um pouco mais distantes do local de aplicação dos eletrodos. Isso pode ser explicado pela baixa focalidade da ETCC quando comparada com outras técnicas mais focais.

Na verdade, estudos de modelamento computacional que investigaram a aplicação bilateral de ETCC sobre o córtex pré-frontal mostraram uma grande variação da força dos campos elétricos que penetraram no cérebro, sendo que efeitos globais da ETCC também foram visto como mais robustos em regiões não-alvo do córtex pré-frontal [106,146]. Ademais, achados também apontam que a montagem bilateral sobre o CPFDL aplicando ânodo sobre F3 (CPFDL esquerdo) e cátodo sobre F8 (área frontal lateral direita) induz campos elétricos mais fortes sobre o CPFDL esquerdo quando comparada à montagem similar a deste estudo, que posicionou ânodo sobre F3 (CPFDL esquerdo) e cátodo sobre F4 (CPFDL direito) [146].

Nossos achados também sugerem que o protocolo de iTBS aumentou a ativação do córtex frontal superior medial esquerdo em comparação com o protocolo de ETCC. Esse achado está de acordo com a literatura que mostrou modulação do córtex frontal superior em estudos que aplicaram EMTr sobre o CDLPF esquerdo de pacientes com depressão e sujeitos saudáveis, por exemplo [147,148].

Finalmente, a análise fatorial com os achados de neuroimagem deste estudo mostrou que a interação dos protocolos de iTBS e ETCC causaram um efeito sinérgico para aumento de ativação de fluxo sanguíneo em córtex orbitofrontal esquerdo e em córtex temporal.

12.2 Achados de Cognição

Este estudo também avaliou os efeitos da aplicação combinada, isoladas das técnicas de iTBS e ETCC sobre córtex pré-frontal de sujeitos saudáveis em desfechos cognitivos. Primeiramente, utilizando dados de 93 aquisição, não foi possível encontrar diferença na cognição após aplicação dos diferentes protocolos de neuroestimulação. Entretanto, explorando nossos dados, foi percebido uma melhora cognitiva significativa ao longo das sessões, o que nos fez entender que o desenho de nosso estudo (uma sessão por semana) causou um efeito aprendizagem a partir da repetição da tarefa cognitiva, independentemente dos protocolos de estimulação aplicados. Dessa forma, apenas os dados da sessão 1 foram utilizados para realizar as análises de cognição deste estudo.

Com uma amostra de 24 sessões, as análises de uma via revelaram que o tempo de reação, mas não acurácia de resposta, foi significativamente diferente entre os protocolos aplicados neste estudo. Por termos uma amostra pequena, análises de comparações múltiplas não foram conduzidas. Complementarmente, as análises fatoriais conduzidas com os dados de cognição revelaram que o fator iTBS apresentou resultados significativamente superior ao fator ETCC para tempo de reação.

Contrariamente à hipótese prévia deste estudo, não foi possível perceber o protocolo combinado significativamente aumentando a performance cognitiva de sujeitos saudáveis, quando comparado com protocolos em monoterapia ou placebo. Embora inesperados, os resultados desta tese estão de acordo com o estudo recente que investigou a aplicação concomitante de ETCC e iTBS sobre o CPFDL de sujeitos saudáveis em medidas psicológicas do estresse e não conseguiu encontrar superioridade da técnica combinada quando comparado com iTBS sozinha [107].

A falta de efeitos sinérgicos/aditivos da combinação das técnicas para cognição sobre o CPF pode ser explicada pelo fato de que a ETCC e a iTBS são duas técnicas que estimulam áreas corticais e suas redes adjacentes, mas não domínios cognitivos específicos *per se*, como já foi visto em estudos prévios [149]. Uma outra explicação para os resultados encontrados no nosso estudo é de que a ETCC sozinha não produziu efeitos robustos, o que pode não ter contribuído para os efeitos sinérgicos ou aditivos do protocolo combinado.

Por sua vez, nossos resultados mostraram que o fator iTBS, mas não ETCC, levou a um tempo de reação significativamente mais rápido na memória de trabalho. Até o momento, não há estudos na literatura comparando os efeitos diretos dos protocolos ETCC e iTBS na cognição de indivíduos saudáveis. Apenas uma meta-análise investigou os efeitos de ETCC e EMTr na memória de trabalho do teste *n-back* em amostras saudáveis e neuropsiquiátricas e mostrou um efeito geral maior para protocolos de EMTr [98]. Embora interessantes, nossas descobertas podem ser explicadas porque iTBS pode causar potenciais de ação natural no disparo neuronal endógeno e pode ter produzido mudanças de excitabilidade cortical mais robustas no CPFDL e nas redes associadas à cognição de forma aguda.

Além disso, outra meta-análise recente mostrou que o método de localização do alvo terapêutico pode influenciar os efeitos cognitivos gerais de protocolos de iTBS [150]. Neste estudo, os autores descobriram que uma abordagem mais individualizada da localização do alvo aplicado pode levar a um aumento significativo no desempenho cognitivo. Portanto, uma vez que a iTBS é um método mais focal do que a ETCC, o método de neuronavegação aplicado em nosso estudo pode ter potencializado os ganhos da iTBS em direção a um desempenho cognitivo superior. Na verdade, estas são descobertas encorajadoras para o campo, uma vez que os protocolos de TBS

consomem menos tempo do que os protocolos EMTr convencionais e seus efeitos foram menos explorados para desempenho cognitivos [151].

Por outro lado, o fator ETCC não apresentou nenhum efeito significativo no desempenho cognitivo. Os efeitos da ETCC na memória de trabalho de voluntários saudáveis ou de população neuropsiquiátrica foram muito mais investigados do que o protocolo iTBS. No entanto, durante os últimos anos, novos estudos têm descoberto efeitos mistos da ETCC para o desempenho cognitivo, como apresentado anteriormente nesta tese.

Embora não tenhamos conseguido provar que a combinação de ETCC com outra técnica de neuromodulação pode aprimorar significativamente a performance cognitiva de sujeitos saudáveis, entende-se que nosso estudo seja importante para pensar novas possibilidades de otimização do protocolo de ETCC para a cognição. Para direções futuras, algumas perguntas ainda se mantêm em aberto. Por exemplo, é importante que próximos estudos de ETCC avaliem preditores de resposta (marcadores biológicos multimodais) da técnica para a cognição, por exemplo. Ou até mesmo que investigue a melhor 'dose' para a cognição, por meio do uso de modelamento computacional, uma vez que vários estudos sugerem que a aplicação de 2mA sobre o córtex pré-frontal para desfechos cognitivos para produzir uma resposta não linear.

Portanto, é importante entender a força dos campos elétricos em diferentes regiões cerebrais e poder correlacioná-las com as respostas cognitivas. Ademais, estudos futuros precisam ser conduzidos para avaliar investigar os efeitos diversos de aplicações concomitantes (online) ou simultâneas (offline) da ETCC com outras técnicas na cognição.

12.3 Segurança e tolerabilidade

Vermelhidão, contração muscular e cefaleia foram os únicos efeitos adversos com incidência significativamente diferente entre os protocolos. Embora não tenhamos conduzido análises de comparações múltiplas para este desfecho, foi possível perceber, pelo número de incidências dos efeitos adversos por protocolo, que o protocolo de intervenções combinadas não foi numericamente diferente dos demais. Tanto os efeitos de contração muscular e cefaleia apresentaram a mesma incidência em protocolos de iTBS isolada e intervenções combinadas, o que sugere que estes efeitos tenham sido produzidos pela aplicação de iTBS ativa. Esses efeitos colaterais estão de acordo com os achados da literatura que apresentam dor de cabeça, tontura e contrações musculares como os efeitos adversos mais presentes durante e após a aplicação de estimulação theta-burst [126].

Por outro lado, foi possível identificar 'vermelhidão' como sendo um efeito colateral de incidência semelhante nos protocolos de estimulações combinadas e ETCC, levando-nos a perceber que a ETCC ativa influenciou diretamente no relato de presença de vermelhidão na pele. Seguindo revisões recentes, vermelhidão na pele é o segundo efeito colateral mais presente em protocolos de ETCC ativa, apenas sendo inferior à sensação de formigamento na pele [119,121]. No geral, os efeitos do protocolo de intervenções combinadas não foram menos tolerados que os demais. Esses resultados são similares aos achados anteriores, que combinaram ETCC e iTBS sobre o córtex motor [107,152].

12.4 Pontos fortes e limitações do estudo

Este estudo apresenta pontos fortes e limitações que precisam ser mencionados. Como pontos fortes é preciso destacar que este é o primeiro estudo combinando duas técnicas de neuromodulação não-invasiva sobre o córtex pré-frontal, tendo seus efeitos

avaliados por meio de técnicas de neuroimagem e cognição. Ademais, os métodos aplicados neste estudo propiciam uma baixa variabilidade de respostas das técnicas de neuromodulação, diferenciando-o dos estudos do campo. Este ponto será discutido com mais profundidade no tópico seguinte, intitulado 'variabilidade metodológica e reprodutibilidade'.

Das limitações, destaca-se o tamanho amostral pequeno, especialmente com os achados de cognição, que foram baseados apenas no *subset* de uma sessão. Uma amostra pequena pode ocasionar resultados falso-negativos, e, por isso, podemos não ter conseguido identificar com mais precisão possíveis achados deste estudo. A integridade do cegamento não foi analisada em nosso estudo. Entretanto, julgamos que a integridade de cegamento não seria ideal para o desenho de nosso estudo, uma vez que poderia influenciar o voluntário a prestar mais atenção nas nuances das diferenças entre os protocolos semanalmente. O desfecho de cognição foi apenas realizado com o domínio de memória operacional, o que limitou nossos achados a outros domínios cognitivos específicos. Porém, uma bateria cognitiva mais longa poderia ter causado ausência dos efeitos agudos das técnicas sobre o desempenho cognitivo. Ademais, os achados de neuroimagem só foram conduzidos levando em consideração regiões de interesse específica, não aprofundando em outras técnicas possíveis, como investigação de alterações em redes neuronais. Entretanto, esses dados poderão ser investigados posteriormente, em futuros estudos com os dados desta pesquisa.

12.5 Variabilidade Metodológica e Reprodutibilidade

Como já comentado anteriormente, a variabilidade de respostas da ETCC pode estar relacionada com uma série de fatores, sendo que muitos deles dizem respeito exclusivamente a questões metodológicas. Embora em grande ascensão, os estudos que investigam a neuromodulação não-invasiva no campo da neurociência cognitiva e

comportamental apresentam uma grande variabilidade de procedimentos metodológicos, que vem sendo amplamente discutidos e criticados [153]. Alguns autores relacionam essas variabilidades à falta de diretrizes claras que possam guiar os pesquisadores em seus campos de interesse.

Contudo, alguns pontos já foram levantados como sendo importantes para garantir a reprodutibilidade e menor variabilidade metodológica dos estudos científicos neste campo. Os pontos específicos que garantem menor variabilidade entre os estudos, segundo uma ampla revisão recente [153], são: 1) localização de alvos terapêuticos por meio de neuronavegação ao invés de métodos que levem em consideração apenas medidas cranianas, como o sistema 10-20 do EEG; 2) inclusão de testes cognitivos ou medidas comportamentais para garantir que os efeitos das técnicas de neuromodulação são, de fato, específicos do desfecho que está sendo avaliado; 3) controlar a funcionalidade de regiões alvo; 4) inclusão de achados de neuroimagem para quantificar os efeitos das técnicas de neuromodulação em regiões locais e para medir a relação com as neurocircuitarias adjacentes; 5) caracterização de protocolos terapêuticos (Figura 23).

Esses são alguns aspectos metodológicos que podem servir para a redução da variabilidade de resposta das técnicas, mas eles não necessariamente precisam ser aplicados em conjunto. Na verdade, eles podem ser, muitas vezes, impraticáveis em pesquisas clínicas, mas podem ser decisivos para pesquisas básicas. Nesse sentido, uma das forças de nosso estudo está associada com os esforços metodológicos aqui aplicados, desde a localização personalizada de alvos de interesse, passando pela avaliação cognitiva e controle de funcionalidade de regiões alvo com o protocolo de estimulação combinado, até a aquisição de neuroimagem. Esses aspectos de nosso estudo podem assegurar uma baixa variabilidade nas respostas dos protocolos de

estimulação, bem como a reprodutibilidade acessível de acordo com os métodos aqui aplicados.

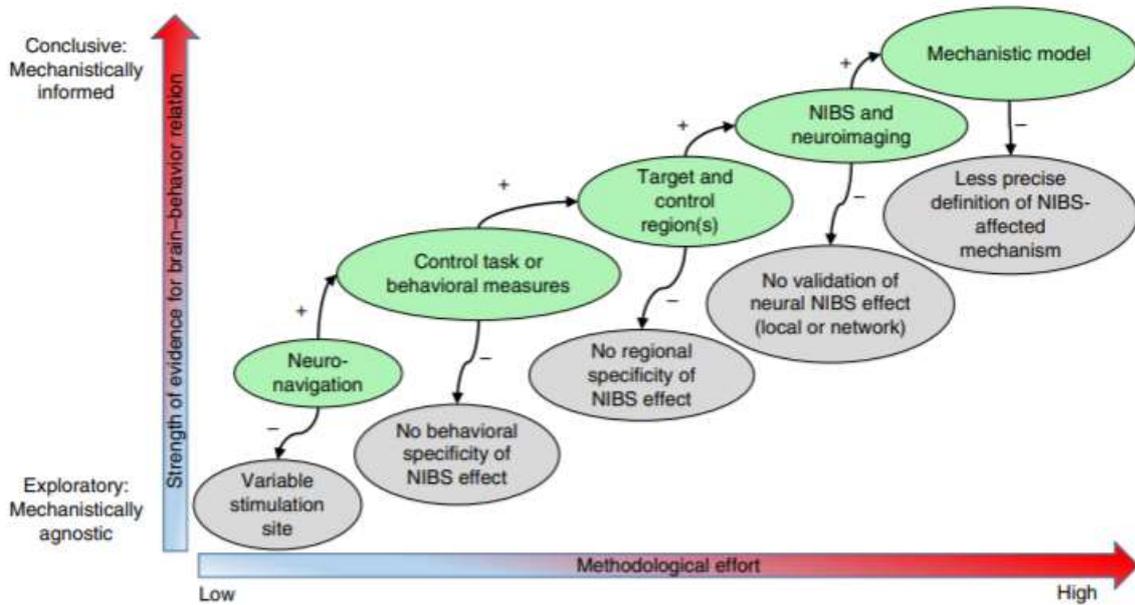


Figura 23. Esforços metodológicos que influenciam na variabilidade de resposta de estudos com estimulações não-invasivas. Extraído de Polanía et al. [156]

13. CONCLUSÃO

Esta tese propôs investigar os efeitos isolados e combinados de duas técnicas de estimulação transcraniana não-invasiva sobre o córtex pré-frontal de sujeitos saudáveis por meio de medidas de neuroimagem e cognição. Para isso, foi conduzido um ensaio randomizado, controlado, duplo-cego e fatorial que permitiu a aplicação de uma sessão de quatro protocolos distintos de estimulação: 1) ETCC; 2) iTBS; 3) Intervenções Combinadas; 4) Placebo.

Nossos achados mostraram que o protocolo combinado sobre a porção dorsolateral do córtex pré-frontal foi capaz de induzir alterações significativas de fluxo sanguíneo em regiões mais profundas do cérebro, como córtex cingulado anterior e posterior, enquanto o protocolo de ETCC sozinha foi capaz de modular regiões mais corticais, como córtices orbitofrontal direito e esquerdo. Por sua vez, não foi possível encontrar alterações significativas com o protocolo de iTBS sozinha. Entretanto, os achados de cognição deste estudo mostraram que a iTBS, mas não ETCC ou o protocolo combinado, significativamente aprimorou a capacidade cognitiva de sujeitos saudáveis.

Os achados de neuroimagem são animadores, do ponto de vista clínico, para o campo, uma vez que estudos futuros podem ser conduzidos com o objetivo de investigar os efeitos da combinação das técnicas na melhora de quadros depressivos, a fim de otimizar os efeitos de conectividade entre o córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo, o córtex cingulado anterior, ínsula e córtex temporal - redes que apresentam ativação desbalanceada na depressão.

Ademais, embora os resultados desta tese tenham falhado em mostrar aumento da performance cognitiva após sessão única de intervenções combinadas, os achados de que o fator iTBS pode aprimorar a capacidade cognitiva de sujeitos saudáveis é também encorajador para o campo, uma vez que este protocolo de EMTr teve seus

efeitos menos avaliados na cognição, se comparado com protocolos mais tradicionais de EMTr. Além disso, a vantagem da iTBS é que seu protocolo consome menos tempo que os demais métodos.

Do ponto de vista do perfil de segurança e tolerabilidade, não foi possível observar maior incidência de efeitos adversos durante o protocolo combinado, evidenciando que este protocolo foi tão tolerado quanto aos protocolos com técnicas isoladas.

14. REFERÊNCIAS

1. Cambiaghi M, Sconocchia S. Scribonius Largus (probably before 1CE-after 48CE). *J Neurol*. 2018 Oct;265(10):2466–8.
2. Finger S, Piccolino M. *The Shocking History of Electric Fishes: From Ancient Epochs to the Birth of Modern Neurophysiology*. OUP USA; 2011. 470 p.
3. Tsoucalas G, Karamanou M, Lymperi M, Gennimata V, Androutsos G. The “torpedo” effect in medicine. *Int Marit Health*. 2014;65(2):65–7.
4. Bertucci P. Sparks in the dark: the attraction of electricity in the eighteenth century. *Endeavour*. 2007 Sep;31(3):88–93.
5. Brazier MA. The Abbé Nollet (1700-1770): the beginnings of electrotherapy. *J Hist Neurosci*. 1993 Jan;2(1):53–64.
6. Piccolino M. *Shocking Frogs: Galvani*. Oxford Scholarship Online; 2013.
7. Partin C. Profiles in cardiology. Alessandro Volta. *Clin Cardiol*. 2002 Nov;25(11):541–3.
8. Volta A. *The Voltaic Pile and the Voltaic Battery are Developed*. 1958. 7 p.
9. Parent A. Giovanni Aldini (1762-1834). *J Neurol*. 2004 May;251(5):637–8.
10. Metastasio A, Dodwell D. A translation of “L’Elettroshock” by Cerletti & Bini, with an introduction. *Eur J Psychiatry*. 2013 Dec;27(4):231–9.
11. Purpura DP, Mcmurtry JG. INTRACELLULAR ACTIVITIES AND EVOKED POTENTIAL CHANGES DURING POLARIZATION OF MOTOR CORTEX. *J Neurophysiol*. 1965 Jan;28:166–85.
12. Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW. THE ACTION OF BRIEF POLARIZING CURRENTS ON THE CEREBRAL CORTEX OF THE RAT (1) DURING CURRENT FLOW AND (2) IN THE PRODUCTION OF LONG-LASTING AFTER-EFFECTS. *J Physiol*. 1964 Aug;172:369–82.
13. Schott GD. Penfield’s homunculus: a note on cerebral cartography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993 Apr;56(4):329–33.
14. Priori A. Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged non-invasive modulation of brain excitability. *Clin Neurophysiol*. 2003 Apr;114(4):589–95.
15. Priori A, Berardelli A, Rona S, Accornero N, Manfredi M. Polarization of the human motor cortex through the scalp. *Neuroreport*. 1998 Jul 13;9(10):2257–60.
16. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol*. 2000 Sep 15;527 Pt 3:633–9.
17. Geddes LA. History of magnetic stimulation of the nervous system. *J Clin Neurophysiol*. 1991 Jan;8(1):3–9.

18. Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*. 1985 May 11;1(8437):1106–7.
19. Tweney RD. Inventing the field: Michael Faraday and the creative of electromagnetic field theory. *Inventive minds: Creativity in technology*. 1992;31.
20. Horvath JC, Perez JM, Forrow L, Fregni F, Pascual-Leone A. Transcranial magnetic stimulation: a historical evaluation and future prognosis of therapeutically relevant ethical concerns. *J Med Ethics*. 2011 Mar;37(3):137–43.
21. Pascual-Leone A, Gates JR, Dhuna A. Induction of speech arrest and counting errors with rapid-rate transcranial magnetic stimulation. *Neurology*. 1991 May 1;41(5):697–702.
22. Pascual-Leone A, Valls-Solé J, Wassermann EM, Hallett M. Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain*. 1994 Aug;117 (Pt 4):847–58.
23. Kolbinger HM, Höflich G, Hufnagel A, Müller H-J, Kasper S. Transcranial magnetic stimulation (TMS) in the treatment of major depression — a pilot study. *Hum Psychopharmacol*. 1995 Jul;10(4):305–10.
24. Huang Y-Z, Edwards MJ, Rounis E, Bhatia KP, Rothwell JC. Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron*. 2005 Jan 20;45(2):201–6.
25. Truong DQ, Bikson M. Physics of Transcranial Direct Current Stimulation Devices and Their History. *J ECT*. 2018 Sep;34(3):137–43.
26. DaSilva AF, Volz MS, Bikson M, Fregni F. Electrode positioning and montage in transcranial direct current stimulation. *J Vis Exp [Internet]*. 2011 May 23;(51). Available from: <http://dx.doi.org/10.3791/2744>
27. Bikson M, Esmaeilpour Z, Adair D, Kronberg G, Tyler WJ, Antal A, et al. Transcranial electrical stimulation nomenclature. *Brain Stimul*. 2019 Nov;12(6):1349–66.
28. Borriero L, Moffa AH, Martin D, Loo CK, Brunoni AR. Transcranial Direct Current Stimulation in the Acute Depressive Episode: A Systematic Review of Current Knowledge. *J ECT*. 2018 Sep;34(3):153–63.
29. Paulus W. Transcranial electrical stimulation (tES - tDCS; tRNS, tACS) methods. *Neuropsychol Rehabil*. 2011 Oct;21(5):602–17.
30. Antal A, Alekseichuk I, Bikson M, Brockmüller J, Brunoni AR, Chen R, et al. Low intensity transcranial electric stimulation: Safety, ethical, legal regulatory and application guidelines. *Clin Neurophysiol*. 2017 Sep;128(9):1774–809.
31. Hahn C, Rice J, Macuff S, Minhas P, Rahman A, Bikson M. Methods for extra-low voltage transcranial direct current stimulation: current and time dependent impedance decreases. *Clin Neurophysiol*. 2013 Mar;124(3):551–6.
32. Miranda PC, Faria P, Hallett M. What does the ratio of injected current to electrode area tell us about current density in the brain during tDCS? *Clin Neurophysiol*. 2009 Jun;120(6):1183–7.

33. De Smet S, Nikolin S, Moffa A, Suen P, Vanderhasselt M-A, Brunoni AR, et al. Determinants of sham response in tDCS depression trials: a systematic review and meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021 Jan 23;109:110261.
34. Fonteneau C, Mondino M, Arns M, Baeken C, Bikson M, Brunoni AR, et al. Sham tDCS: A hidden source of variability? Reflections for further blinded, controlled trials [Internet]. Vol. 45, *L'Encéphale*. 2019. p. S76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.encep.2019.04.033>
35. Sung K, Gordon B. Transcranial direct current stimulation (tDCS) facilitates overall visual search response times but does not interact with visual search task factors. *PLoS One*. 2018 Mar 20;13(3):e0194640.
36. Valiengo L da CL, Goerigk S, Gordon PC, Padberg F, Serpa MH, Koebe S, et al. Efficacy and Safety of Transcranial Direct Current Stimulation for Treating Negative Symptoms in Schizophrenia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*. 2020 Feb 1;77(2):121–9.
37. Razza LB, De Smet S, Moffa A, Sudbrack-Oliveira P, Vanderhasselt M-A, Brunoni AR. Follow-up effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) for the major depressive episode: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res*. 2021 Aug;302:114024.
38. JASPER, H. Report of the committee on methods of clinical examination in electroencephalography. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1958;10:370–5.
39. Mir-Moghtadaei A, Caballero R, Fried P, Fox MD, Lee K, Giacobbe P, et al. Concordance Between BeamF3 and MRI-neuronavigated Target Sites for Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation of the Left Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Brain Stimul*. 2015 Sep;8(5):965–73.
40. Enchev Y. Neuronavigation: geneology, reality, and prospects. *Neurosurg Focus*. 2009 Sep;27(3):E11.
41. Wagner S, Rampersad SM, Aydin Ü, Vorwerk J, Oostendorp TF, Neuling T, et al. Investigation of tDCS volume conduction effects in a highly realistic head model. *J Neural Eng*. 2014 Feb;11(1):016002.
42. Vöröslakos M, Takeuchi Y, Brinyiczki K, Zombori T, Oliva A, Fernández-Ruiz A, et al. Direct effects of transcranial electric stimulation on brain circuits in rats and humans. *Nat Commun*. 2018 Feb 2;9(1):483.
43. Brunoni AR, Sampaio-Junior B, Moffa AH, Aparicio LV, Gordon P, Klein I, et al. Noninvasive brain stimulation in psychiatric disorders: a primer. *Braz J Psychiatry*. 2019;41(1):70–81.
44. Nitsche MA, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology*. 2001 Nov 27;57(10):1899–901.
45. Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*. 2003 Apr;114(4):600–4.

46. Kronberg G, Bridi M, Abel T, Bikson M, Parra LC. Direct Current Stimulation Modulates LTP and LTD: Activity Dependence and Dendritic Effects. *Brain Stimul.* 2017 Jan;10(1):51–8.
47. Monte-Silva K, Kuo M-F, Hessenthaler S, Fresnoza S, Liebetanz D, Paulus W, et al. Induction of late LTP-like plasticity in the human motor cortex by repeated non-invasive brain stimulation. *Brain Stimul.* 2013 May;6(3):424–32.
48. Batsikadze G, Moliadze V, Paulus W, Kuo M-F, Nitsche MA. Partially non-linear stimulation intensity-dependent effects of direct current stimulation on motor cortex excitability in humans. *J Physiol.* 2013;591(7):1987–2000.
49. Hassanzahraee M, Nitsche MA, Zoghi M, Jaberzadeh S. Determination of anodal tDCS duration threshold for reversal of corticospinal excitability: An investigation for induction of counter-regulatory mechanisms. *Brain Stimul.* 2020 May;13(3):832–9.
50. Nitsche MA, Jaussi W, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, Paulus W. Consolidation of human motor cortical neuroplasticity by D-cycloserine. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Aug;29(8):1573–8.
51. Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain.* 2002 Oct 1;125(10):2238–47.
52. Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J Physiol.* 2003 Nov 15;553(Pt 1):293–301.
53. Bachtiar V, Johnstone A, Berrington A, Lemke C, Johansen-Berg H, Emir U, et al. Modulating Regional Motor Cortical Excitability with Noninvasive Brain Stimulation Results in Neurochemical Changes in Bilateral Motor Cortices. *J Neurosci.* 2018 Aug 15;38(33):7327–36.
54. Kuo M-F, Paulus W, Nitsche MA. Boosting focally-induced brain plasticity by dopamine. *Cereb Cortex.* 2008 Mar;18(3):648–51.
55. Marek S, Dosenbach NUF. The frontoparietal network: function, electrophysiology, and importance of individual precision mapping. *Dialogues Clin Neurosci.* 2018 Jun;20(2):133–40.
56. Keeser D, Meindl T, Bor J, Palm U, Pogarell O, Mulert C, et al. Prefrontal transcranial direct current stimulation changes connectivity of resting-state networks during fMRI. *J Neurosci.* 2011 Oct 26;31(43):15284–93.
57. Park C-H, Chang WH, Park J-Y, Shin Y-I, Kim ST, Kim Y-H. Transcranial direct current stimulation increases resting state interhemispheric connectivity. *Neurosci Lett.* 2013 Feb 28;539:7–10.
58. Kim K, Sherwood MS, McIntire LK, McKinley RA, Ranganath C. Transcranial Direct Current Stimulation Modulates Connectivity of Left Dorsolateral Prefrontal Cortex with Distributed Cortical Networks. *J Cogn Neurosci.* 2021 Jun 1;33(7):1381–95.

59. Stagg CJ, Lin RL, Mezue M, Segerdahl A, Kong Y, Xie J, et al. Widespread modulation of cerebral perfusion induced during and after transcranial direct current stimulation applied to the left dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2013 Jul 10;33(28):11425–31.
60. Hone-Blanchet A, Edden RA, Fecteau S. Online Effects of Transcranial Direct Current Stimulation in Real Time on Human Prefrontal and Striatal Metabolites. *Biol Psychiatry*. 2016 Sep 15;80(6):432–8.
61. Brunoni AR. *Princípios e Práticas do Uso da Neuromodulação Não Invasiva em Psiquiatria*. Artmed Editora; 2016. 365 p.
62. Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron*. 2007 Jul 19;55(2):187–99.
63. Klomjai W, Katz R, Lackmy-Vallée A. Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS). *Ann Phys Rehabil Med*. 2015 Sep;58(4):208–13.
64. Suppa A, Huang YZ, Funke K, Ridding MC, Cheeran B, Di Lazzaro V, et al. Ten Years of Theta Burst Stimulation in Humans: Established Knowledge, Unknowns and Prospects. *Brain Stimul*. 2016;9(3):323–35.
65. Lu M, Ueno S. Comparison of the induced fields using different coil configurations during deep transcranial magnetic stimulation. *PLoS One*. 2017 Jun 6;12(6):e0178422.
66. Samoudi AM, Tanghe E, Martens L, Joseph W. Deep Transcranial Magnetic Stimulation: Improved Coil Design and Assessment of the Induced Fields Using MIDA Model. *Biomed Res Int*. 2018 Jun 5;2018:7061420.
67. Fox MD, Buckner RL, White MP, Greicius MD, Pascual-Leone A. Efficacy of transcranial magnetic stimulation targets for depression is related to intrinsic functional connectivity with the subgenual cingulate. *Biol Psychiatry*. 2012 Oct 1;72(7):595–603.
68. Richter L, Neumann G, Oung S, Schweikard A, Trillenber P. Optimal coil orientation for transcranial magnetic stimulation. *PLoS One*. 2013 Apr 11;8(4):e60358.
69. Milev RV, Giacobbe P, Kennedy SH, Blumberger DM, Daskalakis ZJ, Downar J, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) 2016 Clinical Guidelines for the Management of Adults with Major Depressive Disorder: Section 4. Neurostimulation Treatments. *Can J Psychiatry*. 2016 Sep;61(9):561–75.
70. Borrione L, Bellini H, Razza LB, Avila AG, Baeken C, Brem A-K, et al. Precision non-implantable neuromodulation therapies: a perspective for the depressed brain. *Braz J Psychiatry*. 2020 Aug;42(4):403–19.
71. Fitzgerald PB, Daskalakis ZJ. An Introduction to the Basic Principles of TMS and rTMS. In: Fitzgerald PB, Daskalakis ZJ, editors. *Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Treatment for Depressive Disorders: A Practical Guide*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 1–6.

72. Merton PA, Morton HB. Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject [Internet]. Vol. 285, *Nature*. 1980. p. 227–227. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/285227a0>
73. Brasil Neto J. Neurofisiologia e plasticidade no córtex cerebral pela estimulação magnética transcraniana repetitiva. *Arch Clin Psychiatry (São Paulo)*. 2004;31(5):216–20.
74. Chen R, Classen J, Gerloff C, Celnik P, Wassermann EM, Hallett M, et al. Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology*. 1997 May 1;48(5):1398–403.
75. Maeda F, Keenan JP, Tormos JM, Topka H, Pascual-Leone A. Modulation of corticospinal excitability by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol*. 2000 May;111(5):800–5.
76. Levkovitz Y, Marx J, Grisaru N, Segal M. Long-term effects of transcranial magnetic stimulation on hippocampal reactivity to afferent stimulation. *J Neurosci*. 1999 Apr 15;19(8):3198–203.
77. Huerta PT, Volpe BT. Transcranial magnetic stimulation, synaptic plasticity and network oscillations. *J Neuroeng Rehabil*. 2009 Mar 2;6:7.
78. Brown TH, Zhao Y, Leung V. Hebbian Plasticity [Internet]. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009. p. 1049–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-008045046-9.00796-8>
79. Huganir RL, Nicoll RA. AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*. 2013 Oct 30;80(3):704–17.
80. Diamond DM, Dunwiddie TV, Rose GM. Characteristics of hippocampal primed burst potentiation in vitro and in the awake rat. *J Neurosci*. 1988 Nov;8(11):4079–88.
81. Stagg CJ, Wylezinska M, Matthews PM, Johansen-Berg H, Jezzard P, Rothwell JC, et al. Neurochemical effects of theta burst stimulation as assessed by magnetic resonance spectroscopy. *J Neurophysiol*. 2009 Jun;101(6):2872–7.
82. Huang Y-Z, Chen R-S, Rothwell JC, Wen H-Y. The after-effect of human theta burst stimulation is NMDA receptor dependent. *Clin Neurophysiol*. 2007 May;118(5):1028–32.
83. Huang Y-Z, Rothwell JC, Chen R-S, Lu C-S, Chuang W-L. The theoretical model of theta burst form of repetitive transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol*. 2011 May;122(5):1011–8.
84. Chung SW, Hoy KE, Fitzgerald PB. Theta-burst stimulation: a new form of TMS treatment for depression? *Depress Anxiety*. 2015 Mar;32(3):182–92.
85. Blumberger DM, Vila-Rodriguez F, Thorpe KE, Feffer K, Noda Y, Giacobbe P, et al. Effectiveness of theta burst versus high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with depression (THREE-D): a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2018 Apr 28;391(10131):1683–92.

86. Li C-T, Chen M-H, Juan C-H, Liu R-S, Lin W-C, Bai Y-M, et al. Effects of prefrontal theta-burst stimulation on brain function in treatment-resistant depression: A randomized sham-controlled neuroimaging study. *Brain Stimul.* 2018 Sep;11(5):1054–62.
87. Razza LB, Afonso dos Santos L, Borrión L, Bellini H, Branco LC, Cretaz E, et al. Appraising the effectiveness of electrical and magnetic brain stimulation techniques in acute major depressive episodes: an umbrella review of meta-analyses of randomized controlled trials. *Brazilian Journal of Psychiatry [Internet]*. 2020;(AHEAD). Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-44462020005035205&script=sci_arttext
88. Fregni F, El-Hagrassy MM, Pacheco-Barrios K, Carvalho S, Leite J, Simis M, et al. Evidence-based guidelines and secondary meta-analysis for the use of transcranial direct current stimulation (tDCS) in neurological and psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol [Internet]*. 2020 Jul 26; Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ijnp/pyaa051>
89. Vanderhasselt M-A, De Raedt R, Leyman L, Baeken C. Acute effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on attentional control are related to antidepressant outcomes. *J Psychiatry Neurosci.* 2009 Mar;34(2):119–26.
90. Razza LB, Palumbo P, Moffa AH, Carvalho AF, Solmi M, Loo CK, et al. A systematic review and meta-analysis on the effects of transcranial direct current stimulation in depressive episodes. *Depress Anxiety.* 2020 Jul;37(7):594–608.
91. Fregni F, Boggio PS, Nitsche MA, Marcolin MA, Rigonatti SP, Pascual-Leone A. Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. *Bipolar Disord.* 2006 Apr;8(2):203–4.
92. Brunoni AR, Moffa AH, Sampaio-Junior B, Borrión L, Moreno ML, Fernandes RA, et al. Trial of Electrical Direct-Current Therapy versus Escitalopram for Depression. *N Engl J Med.* 2017 Jun 29;376(26):2523–33.
93. Moffa AH, Martin D, Alonzo A, Bennabi D, Blumberger DM, Benseñor IM, et al. Efficacy and acceptability of transcranial direct current stimulation (tDCS) for major depressive disorder: An individual patient data meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2020 Apr 20;99:109836.
94. Loo CK, Husain MM, McDonald WM, Aaronson S, O'Reardon JP, Alonzo A, et al. International randomized-controlled trial of transcranial Direct Current Stimulation in depression. *Brain Stimul.* 2018 Jan;11(1):125–33.
95. Moreno ML, Vanderhasselt M-A, Carvalho AF, Moffa AH, Lotufo PA, Benseñor IM, et al. Effects of acute transcranial direct current stimulation in hot and cold working memory tasks in healthy and depressed subjects [Internet]. Vol. 591, *Neuroscience Letters*. 2015. p. 126–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.036>
96. Oliveira JF, Zanão TA, Valiengo L, Lotufo PA, Benseñor IM, Fregni F, et al. Acute working memory improvement after tDCS in antidepressant-free patients with major depressive disorder. *Neurosci Lett.* 2013 Mar 14;537:60–4.
97. Nikolin S, Martin D, Loo CK, Boonstra TW. Effects of TDCS dosage on working memory in healthy participants. *Brain Stimul.* 2018 May;11(3):518–27.

98. Brunoni AR, Vanderhasselt MA. Working memory improvement with non-invasive brain stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex: a systematic review and meta-analysis. *Brain Cogn*. 2014 Apr;86:1–9.
99. Horvath JC, Forte JD, Carter O. Quantitative Review Finds No Evidence of Cognitive Effects in Healthy Populations From Single-session Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS). *Brain Stimul*. 2015 May;8(3):535–50.
100. Farhat LC, Carvalho AF, Solmi M, Brunoni AR. Evidence-based Umbrella Review of Cognitive Effects of Prefrontal tDCS. *Soc Cogn Affect Neurosci* [Internet]. 2020 Jun 24; Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/scan/nsaa084>
101. Martin DM, Moffa A, Nikolov S, Bennabi D, Brunoni AR, Flannery W, et al. Cognitive effects of transcranial direct current stimulation treatment in patients with major depressive disorder: An individual patient data meta-analysis of randomised, sham-controlled trials. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018 Jul;90:137–45.
102. Moreno ML, Goerigk SA, Bertola L, Suemoto CK, Razza LB, Moffa AH, et al. Cognitive changes after tDCS and escitalopram treatment in major depressive disorder: Results from the placebo-controlled ELECT-TDCS trial. *J Affect Disord*. 2020 Feb 15;263:344–52.
103. Tortella G, Sampaio-Junior B, Moreno ML, Moffa AH, da Silva AF, Lafer B, et al. Cognitive outcomes of the bipolar depression electrical treatment trial (BETTER): a randomized, double-blind, sham-controlled study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2021 Feb;271(1):93–100.
104. Chaieb L, Antal A, Ambrus GG, Paulus W. Brain-derived neurotrophic factor: its impact upon neuroplasticity and neuroplasticity inducing transcranial brain stimulation protocols. *Neurogenetics*. 2014 Mar;15(1):1–11.
105. Bulubas L, Padberg F, Bueno PV, Duran F, Busatto G, Amaro E Jr, et al. Antidepressant effects of tDCS are associated with prefrontal gray matter volumes at baseline: Evidence from the ELECT-TDCS trial. *Brain Stimul*. 2019 Sep;12(5):1197–204.
106. Suen PJC, Doll S, Batistuzzo MC, Busatto G, Razza LB, Padberg F, et al. Association between tDCS computational modeling and clinical outcomes in depression: data from the ELECT-TDCS trial. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* [Internet]. 2020 Apr 11; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00406-020-01127-w>
107. De Smet S, Baeken C, De Raedt R, Pulopulos MM, Razza LB, Van Damme S, et al. Effects of combined theta burst stimulation and transcranial direct current stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex on stress. *Clin Neurophysiol*. 2021 May;132(5):1116–25.
108. Jones BDM, Razza LB, Weissman CR, Karbi J, Vine T, Mulsant LS, et al. Magnitude of the Placebo Response Across Treatment Modalities Used for Treatment-Resistant Depression in Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2021 Sep 1;4(9):e2125531.

109. Sathappan AV, Luber BM, Lisanby SH. The Dynamic Duo: Combining noninvasive brain stimulation with cognitive interventions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;89:347–60.
110. Bergmann TO. Brain State-Dependent Brain Stimulation. *Front Psychol*. 2018 Nov 1;9:2108.
111. Spagnolo PA, Montemitro C, Pettorruso M, Martinotti G, Di Giannantonio M. Better Together? Coupling Pharmacotherapies and Cognitive Interventions With Non-invasive Brain Stimulation for the Treatment of Addictive Disorders. *Front Neurosci*. 2019;13:1385.
112. Philip NS, Nelson BG, Frohlich F, Lim KO, Widge AS, Carpenter LL. Low-Intensity Transcranial Current Stimulation in Psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2017;174(7):628–39.
113. Clark DJ, Chatterjee SA, Skinner JW, Lysne PE, Sumonthee C, Wu SS, et al. Combining Frontal Transcranial Direct Current Stimulation With Walking Rehabilitation to Enhance Mobility and Executive Function: A Pilot Clinical Trial. *Neuromodulation*. 2021 Jul;24(5):950–9.
114. Llorens R, Fuentes MA, Borrego A, Latorre J, Alcañiz M, Colomer C, et al. Effectiveness of a combined transcranial direct current stimulation and virtual reality-based intervention on upper limb function in chronic individuals post-stroke with persistent severe hemiparesis: a randomized controlled trial. *J Neuroeng Rehabil*. 2021 Jul 1;18(1):108.
115. Borrione L, Klein I, Razza LB, Suen P, Brunoni AR. Use of app-based psychological interventions in combination with home-use transcranial direct current stimulation for the treatment of major depressive disorder: A case series. *J Affect Disord*. 2021 Apr 17;288:189–90.
116. Siebner HR. Preconditioning of Low-Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation with Transcranial Direct Current Stimulation: Evidence for Homeostatic Plasticity in the Human Motor Cortex [Internet]. Vol. 24, *Journal of Neuroscience*. 2004. p. 3379–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5316-03.2004>
117. Lang N, Siebner HR, Ernst D, Nitsche MA, Paulus W, Lemon RN, et al. Preconditioning with transcranial direct current stimulation sensitizes the motor cortex to rapid-rate transcranial magnetic stimulation and controls the direction of after-effects [Internet]. Vol. 56, *Biological Psychiatry*. 2004. p. 634–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.07.017>
118. Hasan A, Hamada M, Nitsche MA, Ruge D, Galea JM, Wobrock T, et al. Direct-current-dependent shift of theta-burst-induced plasticity in the human motor cortex. *Exp Brain Res*. 2012 Mar;217(1):15–23.
119. Aparício LVM, Guarienti F, Razza LB, Carvalho AF, Fregni F, Brunoni AR. A Systematic Review on the Acceptability and Tolerability of Transcranial Direct Current Stimulation Treatment in Neuropsychiatry Trials. *Brain Stimul*. 2016 Sep;9(5):671–81.
120. Berlow YA, Zandvakili A, Carpenter LL, Philip NS. Transcranial direct current stimulation for unipolar depression and risk of treatment emergent mania: An updated meta-

analysis. *Brain Stimul* [Internet]. 2019;2019/03/31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2019.03.025>

121. Palm U, Keeser D, Schiller C, Fintescu Z, Nitsche M, Reisinger E, et al. Skin lesions after treatment with transcranial direct current stimulation (tDCS). *Brain Stimul*. 2008 Oct;1(4):386–7.
122. Sudbrack-Oliveira P, Razza LB, Brunoni AR. Non-invasive cortical stimulation: Transcranial direct current stimulation (tDCS). *Int Rev Neurobiol*. 2021 Mar 2;159:1–22.
123. Rossi S, Antal A, Bestmann S, Bikson M, Brewer C, Brockmüller J, et al. Safety and recommendations for TMS use in healthy subjects and patient populations, with updates on training, ethical and regulatory issues: Expert Guidelines. *Clin Neurophysiol*. 2021 Jan;132(1):269–306.
124. Machii K, Cohen D, Ramos-Estebanez C, Pascual-Leone A. Safety of rTMS to non-motor cortical areas in healthy participants and patients. *Clin Neurophysiol*. 2006 Feb;117(2):455–71.
125. Stultz DJ, Osburn S, Burns T, Pawlowska-Wajswol S, Walton R. Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) Safety with Respect to Seizures: A Literature Review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020 Dec 7;16:2989–3000.
126. Oberman L, Edwards D, Eldaief M, Pascual-Leone A. Safety of theta burst transcranial magnetic stimulation: a systematic review of the literature. *J Clin Neurophysiol*. 2011 Feb;28(1):67–74.
127. Duprat R, Wu G-R, De Raedt R, Baeken C. Accelerated iTBS treatment in depressed patients differentially modulates reward system activity based on anhedonia. *World J Biol Psychiatry*. 2018 Oct;19(7):497–508.
128. Catafau AM. Brain SPECT in clinical practice. Part I: perfusion. *J Nucl Med*. 2001 Feb;42(2):259–71.
129. Camargo EE. Brain SPECT in neurology and psychiatry. *J Nucl Med*. 2001 Apr;42(4):611–23.
130. Loo CK, Sachdev PS, Haindl W, Wen W, Mitchell PB, Croker VM, et al. High (15 Hz) and low (1 Hz) frequency transcranial magnetic stimulation have different acute effects on regional cerebral blood flow in depressed patients. *Psychol Med*. 2003 Aug;33(6):997–1006.
131. Wörsching J, Padberg F, Ertl-Wagner B, Kumpf U, Kirsch B, Keeser D. Imaging transcranial direct current stimulation (tDCS) of the prefrontal cortex—correlation or causality in stimulation-mediated effects? *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Oct 1;69:333–56.
132. Wörsching J, Padberg F, Helbich K, Hasan A, Koch L, Goerigk S, et al. Test-retest reliability of prefrontal transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) effects on functional MRI connectivity in healthy subjects [Internet]. Vol. 155, *NeuroImage*. 2017. p. 187–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.04.052>

133. Razza L, Buchpiguel C, DeSmet S, Klein I, Baeken C, Galhardoni R, et al. Combined effects of theta-burst stimulation with transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex: study protocol of a randomized, double-blinded, sham-controlled trial using 99mTc-ECD SPECT. *Trends Psychiatry Psychother* [Internet]. 2021; Available from: <https://docs.google.com/document/d/107f7Biv3GILW28bzYwnEwXwRS1zMfIE4-npzQfLubaE/edit>
134. SHEEHAN, DV. MINI-Mini International Neuropsychiatric Interview-English Version 5.0.0-DSM-IV. *J Clin Psychiatry*. 1998;59:34–57.
135. Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1960 Feb;23:56–62.
136. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1961 Jun;4:561–71.
137. Watson D, Clark LA, Tellegen A. Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. *J Pers Soc Psychol*. 1988 Jun;54(6):1063–70.
138. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971 Mar;9(1):97–113.
139. Rorden C, Brett M. Stereotaxic display of brain lesions. *Behav Neurol*. 2000;12(4):191–200.
140. Rask T, Dyrby T, Comerchi M, Quarantelli M, Alfano B, Berkouk K, et al. PVELab: Software for correction of functional images for partial volume errors. *Neuroimage* [Internet]. 2004;22. Available from: http://140.164.70.5/biblio/Poster_PVELab_fin.pdf
141. Whelan R. Effective Analysis of Reaction Time Data. *Psychol Rec*. 2008 Jul 1;58(3):475–82.
142. Sallet J, Mars RB, Noonan MP, Neubert F-X, Jbabdi S, O'Reilly JX, et al. The organization of dorsal frontal cortex in humans and macaques. *J Neurosci*. 2013 Jul 24;33(30):12255–74.
143. Drevets WC, Savitz J, Trimble M. The subgenual anterior cingulate cortex in mood disorders. *CNS Spectr*. 2008 Aug;13(8):663–81.
144. Zhang F-F, Peng W, Sweeney JA, Jia Z-Y, Gong Q-Y. Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence. *CNS Neurosci Ther*. 2018 Nov;24(11):994–1003.
145. Sridharan D, Levitin DJ, Menon V. A critical role for the right fronto-insular cortex in switching between central-executive and default-mode networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 26;105(34):12569–74.
146. Li R, Zhang S, Yin S, Ren W, He R, Li J. The fronto-insular cortex causally mediates the default-mode and central-executive networks to contribute to individual cognitive performance in healthy elderly. *Hum Brain Mapp*. 2018 Nov;39(11):4302–11.

147. Li B-J, Friston K, Mody M, Wang H-N, Lu H-B, Hu D-W. A brain network model for depression: From symptom understanding to disease intervention. *CNS Neurosci Ther*. 2018 Nov;24(11):1004–19.
148. Solé-Padullés C, Castro-Fornieles J, de la Serna E, Sánchez-Gistau V, Romero S, Puig O, et al. Intrinsic functional connectivity of fronto-temporal networks in adolescents with early psychosis. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2017 Jun;26(6):669–79.
149. Csifcsák G, Boayue NM, Puonti O, Thielscher A, Mittner M. Effects of transcranial direct current stimulation for treating depression: A modeling study. *J Affect Disord*. 2018 Jul;234:164–73.
150. Zheng A, Yu R, Du W, Liu H, Zhang Z, Xu Z, et al. Two-week rTMS-induced neuroimaging changes measured with fMRI in depression. *J Affect Disord*. 2020 Jun 1;270:15–21.
151. Tang Y, Jiao X, Wang J, Zhu T, Zhou J, Qian Z, et al. Dynamic Functional Connectivity Within the Fronto-Limbic Network Induced by Intermittent Theta-Burst Stimulation: A Pilot Study. *Front Neurosci*. 2019 Sep 13;13:944.
152. Segrave RA, Arnold S, Hoy K, Fitzgerald PB. Concurrent cognitive control training augments the antidepressant efficacy of tDCS: a pilot study. *Brain Stimul*. 2014 Mar;7(2):325–31.
153. Pabst A, Proksch S, Médé B, Comstock D, Ross JM, Balasubramaniam R. A systematic review of the efficacy of intermittent theta burst stimulation (iTBS) on cognitive enhancement [Internet]. *PsyArXiv*. 2021. Available from: <https://osf.io/me6n4>
154. Lowe CJ, Manocchio F, Safati AB, Hall PA. The effects of theta burst stimulation (TBS) targeting the prefrontal cortex on executive functioning: A systematic review and meta-analysis. *Neuropsychologia*. 2018 Mar;111:344–59.
155. Loo C, Martin D, Pigot M, Arul-Anandam P, Mitchell P, Sachdev P. Transcranial direct current stimulation priming of therapeutic repetitive transcranial magnetic stimulation: a pilot study. *J ECT*. 2009 Dec;25(4):256–60.
156. Polanía R, Nitsche MA, Ruff CC. Studying and modifying brain function with non-invasive brain stimulation. *Nat Neurosci*. 2018 Feb;21(2):174–87.