

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA SOBRE ASPECTOS MOLECULARES DA REATIVIDADE MICROGLIAL

Raone Marques Moreira¹; Belmira Lara da Costa Andrade²

¹Estudante do Curso de Fisioterapia - CCS – UFPE E-mail: raonemarquesufpe@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia – CCB – UFPE. E-mail: belmira@gmail.com.

Sumário: O presente estudo testou a hipótese de que a eletroestimulação transcraniana por corrente contínua afetaria o comportamento molecular das células da glia e induziria plasticidade axonal. Foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos adultos, divididos aleatoriamente em dois grupos: (i) ETCC ativa anódica (E), e (ii) ETCC fictícia, *sham* (S). Os animais receberam ETCC anódica com intensidade de corrente igual a 400 μ A, durante 10 minutos por dia, durante cinco dias consecutivos. Após o tratamento foi feita análise imunohistoquímica para microglial reativa (Lectina do tomate) foram investigadas possíveis alterações teciduais estruturais (HE), bem como quantificação da expressão da proteína associada ao crescimento axonal, GFAP e GAP-43 fosforilada. Obtivemos aumento significativo do grupo experimental nos dados da proteína GAP-43 fosforilada ($p=0,0113$), e não houve diferença significativa para a proteína GFAP, de acordo com o teste t. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a ETCC-A em animais saudáveis é capaz de induzir alterações moleculares neuroplásticas capazes de modificar a excitabilidade do córtex cerebral na ausência de lesão estrutural.

Palavras-chave: ETCC; MICROGLIA; EXCITABILIDADE CORTICAL; NEUROPLASTICIDADE.

INTRODUÇÃO

A eletroestimulação transcraniana por corrente contínua é uma forma de excitabilidade cortical que tem aplicação em várias desordens do sistema nervoso, como Doença de Parkinson, Acidente Vascular encefálico, Alzheimer entre outros. Tem a vantagem de ser uma técnica não invasiva, de baixo custo e de respostas clínicas eficientes. Na qual consiste em uma aplicação de corrente contínua de baixa intensidade através do crânio por meio de eletrodos de diferentes polaridades. Uma diminuição da excitabilidade cortical é observada sob o cátodo (eletrodo positivo, ETCC catódica) e um efeito inverso, um aumento da excitabilidade, é observado sob o ânodo (eletrodo positivo, ETCC anódica) (NITSCHKE & PAULUS, 2000). Várias teorias levantaram algumas hipóteses para mecanismos de plasticidade. Esses fatos direcionaram o pensamento dos pesquisadores para mecanismos de plasticidade sináptica, tais como LTP e LTD, como possivelmente envolvidos nos efeitos duradouros das diferentes polaridades desta técnica. Recentemente, foi demonstrado que sessões sucessivas de ETCC dentro de uma janela temporal específica é capaz de induzir plasticidade similar à LTP com duração maior do que 1 hora no córtex motor de humanos (MONTE-SILVA et al., 2013). No sentido de corroborar esta hipótese, tornam-se necessários experimentos que investiguem marcadores moleculares de atividade microglial benéfica após estes tipos de estimulação. Este fato motivou o presente estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 20 ratos machos albinos da linhagem *Wistar* da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os procedimentos foram submetidos

e aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (CEEAA-CCB-UFPE), protocolo n°: 23076017070/2012-61. Aos 90 - 95 dias, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: Grupo Experimental (ratos submetidos à ETCC) e Grupo *Sham* (ratos submetidos a sessões fictícias de ETCC). A partir de 60 dias de idade foram realizados o manuseio e contenção dos animais com objetivo de diminuir o estresse dos animais durante a eletroestimulação. Foi realizada uma cirurgia para a colocação do implante e os animais foram alocados cada um em sua gaiola. Após o descanso de 3 dias da cirurgia, começou as sessões de ETCC no qual o eletrodo anódico conectado ao implante sem, no entanto, tocar o crânio. Para evitar os possíveis efeitos das drogas anestésicas os animais foram mantidos acordados durante a estimulação, em contenção. A corrente direta foi aplicada por cinco dias consecutivos durante 10 minutos/dia, com intensidade de 400µA. Vinte e quatro horas após o fim da quinta sessão de ETCC os animais foram pesados, profundamente anestesiados com enflurano volátil e sofreram perfusão transcárdica. Foram realizadas secções parasagittais para posterior procedimento imunohistoquímico. Foi realizada a imunohistoquímica para Lectina do tomate (Marcador neuronal para micróglia) e Wisteria Floribunda (Marcador Neuronal de redes perineuronais). A nossa hipótese é que a ETCC iria ativar a micróglia e causar uma frouxidão das redes perineuronais. Os cortes que não foram submetidos a imunohistoquímica foram corados com Hematoxilina-Eosina, para análise estrutural. Os animais, profundamente anestesiados com enflurano volátil, foram decapitados e os cérebros foram removidos e resfriados. O cortes cerebrais foram isolados, seus hemisférios separados e homogeneizados isoladamente. Os tubos com o homogenado foram centrifugados. O sobrenadante foi recolhido e aliqotado em eppendorfs para posterior análise pela técnica de Western blot. Não foi encontrado diferença significativa na expressão de GFAP, corroborando a hipótese que a ETCC não induz agressão na estrutura neuronal. Houve diferença significativa na GAP-43 fosforilada, no qual aumentos na expressão desta proteína ou em moléculas como a sinaptofisina, por exemplo, vêm sendo apontados como uma evidência de ativação neuroplástica (EVANS & COUSIN, 2005).

RESULTADOS

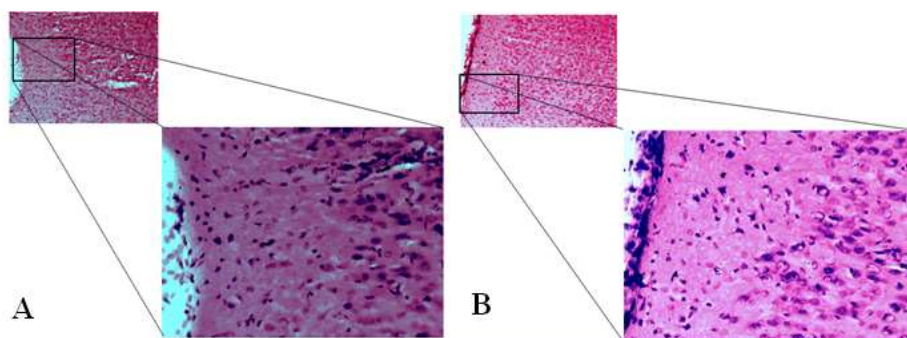


Figura 4 : Fotomicrografias de secções sagittais do córtex parietal direito coradas com Hematoxilina-eosina em região imediatamente abaixo ao ponto de implantação do tubo para estimulação (A) e fora do ponto de estimulação (B).

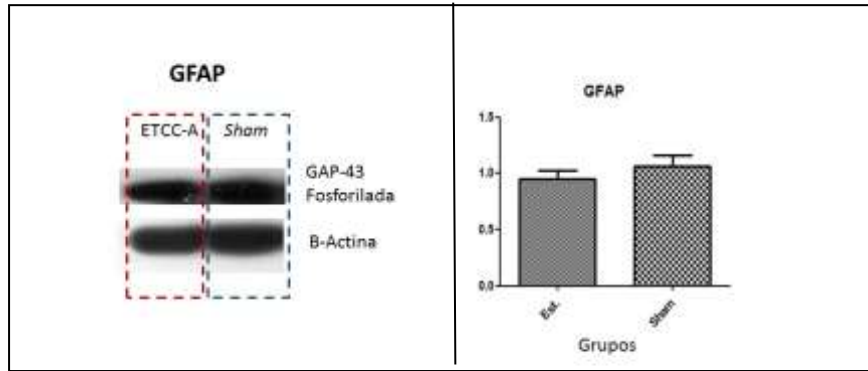


Figura 5 : Expressão da proteína GFAP nos animais estimulados (bandas da esquerda) em relação aos não estimulados (bandas da direita). Os valores obtidos foram normalizados pela expressão da B-Actina. O gráfico mostra nenhuma diferença significativa entre os grupos.

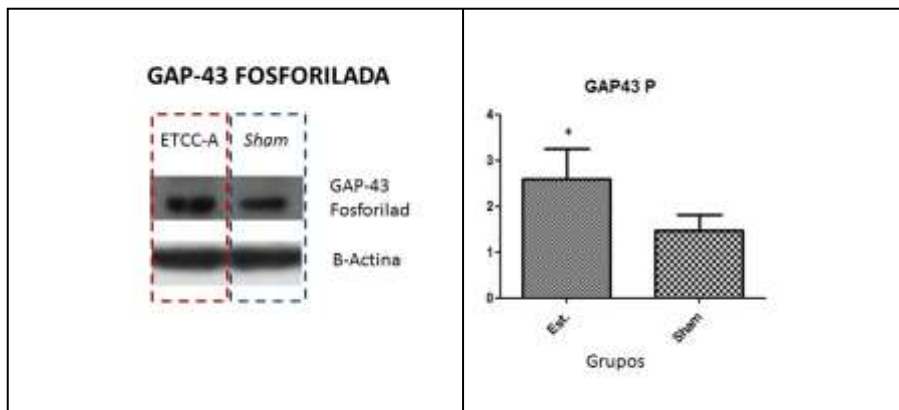


Figura 6 : Aumento na expressão da proteína GAP-43 fosforilada nos animais estimulados (bandas da esquerda) em relação aos não estimulados (bandas da direita). Os valores obtidos foram normalizados pela expressão da beta actina. O gráfico mostra o aumento significativo observado no hemisfério direito do grupo estimulado em relação ao mesmo hemisfério do grupo *sham* ($p=0,0335$).

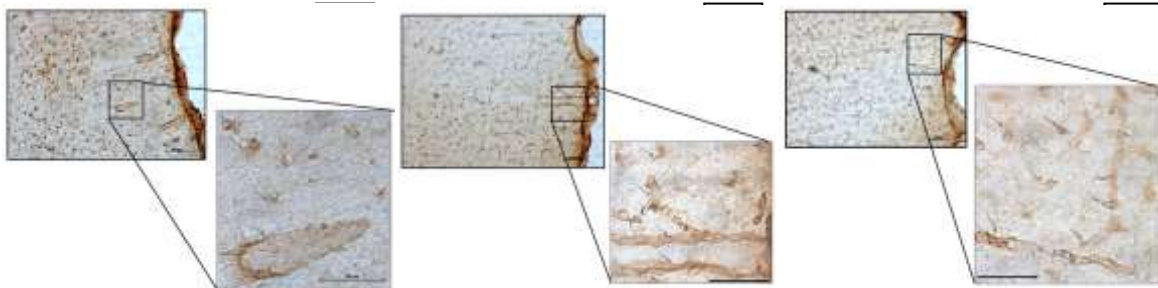


Fig 7: Marcação de Lectina do tomate evidenciando a marcação de vasos, não tendo marcação de microglia reativa. Tanto no grupo estimulado A e B, quanto no grupo *Sham* C.

DISCUSSÃO

O crescente número de artigos científicos publicados sobre os efeitos eletrofisiológicos e comportamentais benéficos da ETCC em humanos tem estimulado vários autores a investigar potenciais mecanismos envolvidos com tais efeitos em animais experimentais. No presente estudo, hipotetizamos que na ausência de qualquer insulto neurológico ou lesão induzida pela intensidade de corrente, um dos mecanismos envolvidos com os efeitos da aplicação repetitiva de ETCC-A seria um aumento na expressão de proteínas envolvidas com a ativação sináptica e para isto, avaliamos a expressão da GAP-43 fosforilada no hemisfério estimulado. A fosforilação da GAP-43 pela PKC parece modular os processos de LTP, e consequentemente, o armazenamento de memórias. Camundongos transgênicos que superexpressam GAP-43 na sua forma pseudo-fosforilada apresentam aumento na LTP e maior facilitação de pulso pareado (Hulo e colaboradores, 2002). Análise da imunorreatividade à proteína GFAP revela ausência de uma astrogliose induzida pela ETCC-A que é coerente com as evidências aqui obtidas por hematoxilina-eosina e pela Lectina do tomate de que o protocolo adotado não induz lesão tecidual, pois a microglia no seu estado reativo é atraída para o foco de injúria, muda sua morfologia para atuar como agente fagocitário.

CONCLUSÕES

Os achados deste estudo permitem a conclusão de que a ETCC anódica é capaz de induzir modificações na organização celular e molecular do córtex cerebral no seu estado basal, sem a presença de patologias associadas.

Tidos em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a ETCC-A em animais saudáveis é capaz de induzir efeitos moleculares e celulares os quais em concerto podem favorecer alterações neuroplásticas capazes de modificar a excitabilidade do córtex cerebral.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Laboratório de Neurofisiologia-UFPE através de seus professores, funcionários e colegas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de pesquisa. A minha família e amigos pela força.

REFERÊNCIAS

NITSCHKE, M. A.; PAULUS, W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. **J Physiol**, 527 Pt 3, 633-639, Sep 15, 2000.

MONTE-SILVA, K.; KUO, M.F.; THIRUGNANASAMBANDAM, N.; LIEBETANZ, D.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M.A. Dose-dependent inverted u-shaped effect of dopamine (d2-like) receptor activation on focal and nonfocal plasticity in humans. **J NEUROSCI.**, 29, 19, 6124-31, MAY, 2009.

LIEBETANZ, D.; FREGNI, F.; MONTE-SILVA, K.K.; OLIVEIRA, M.B.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; NITSCHKE, M.A.; GUEDES, R.C. After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. **Neurosci Lett.**, 398, (1-2), 85-90, May, 2006a.

EVANS, G.J.; COUSIN, M.A. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. **Biochem Soc Trans.**, 33 (Pt 6), 1350-3, Dec, 2005.

KETTENMANN, H.; HANISCH, U.K.; NODA, M.; VERKHRATSKY, A. Physiology of microglia. **Physiol Rev.**, 91, 2, 461-553, Apr, 2011.