



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

**GABRIEL MENEZES DA CRUZ**

**INVESTIGAÇÃO SOBRE O MECANISMO NEUROFISIOLÓGICO RESPONSÁVEL PELA  
MODULAÇÃO DA EXCITABILIDADE REFLEXA APÓS ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE  
ELÉTRICA CONTÍNUA NOS MEMBROS INFERIORES**

**Área de concentração: Atividade Física e Esporte**

**Linha de pesquisa: Aspectos Biológicos Relacionados ao Desempenho e a Saúde.**

**BRASÍLIA**

**2024**

**INVESTIGAÇÃO SOBRE O MECANISMO NEUROFISIOLÓGICO  
RESPONSÁVEL PELA MODULAÇÃO DA EXCITABILIDADE  
REFLEXA APÓS ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE ELÉTRICA  
CONTÍNUA NOS MEMBROS INFERIORES**

GABRIEL MENEZES DA CRUZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Educação Física.

**Orientador:** Prof. Dr. Rinaldo André Mezzarane

**BRASÍLIA**

**2024**

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, expressei profunda gratidão a mim mesmo. Esta jornada foi marcada por desafios significativos, exigindo dedicação incansável e perseverança. A pandemia global impôs pausas e exigiu adaptações, tornando o caminho árduo e repleto de obstáculos. No entanto, agradeço por minha capacidade de retomar este projeto com determinação e não desistir diante das adversidades. A conclusão desta etapa acadêmica é motivo de imensa gratidão e satisfação pessoal e profissional.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Rinaldo, pela oportunidade, direcionamento, apoio e incentivo ao longo de todo o processo. Sua expertise e dedicação foram referência para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por sempre ser o maior incentivador do meu potencial e por reconhecer intelecto além do que eu poderia ver. Obrigado pela confiança em ter sido seu braço direito no laboratório durante muitos anos.

Agradeço também aos membros da banca examinadora, Prof. Fabio Caixeta, Prof. Fernando Magalhães e Profa. Luciana Hagstrom por dedicarem seu tempo para avaliação deste trabalho.

Sou grato aos professores e colegas do programa de mestrado, cujas discussões e insights enriqueceram meu entendimento sobre o tema estudado.

Agradeço aos amigos e companheiros de jornada que fizeram e fazem parte do laboratório de Processamento de Sinais que me ajudaram muito durante toda construção desse trabalho como ajudantes durante as coletas, muitas vezes como voluntários e também sendo sempre bons amigos.

Com carinho, devo agradecer a minha parceira de laboratório Leandra Batista que sempre me aconselhou e me motivou ao longo de toda esta jornada. Nunca teria conseguido chegar até aqui sem seu apoio e otimismo que me ajudaram tanto.

Minha parceira de jornada Leticia Nappo merece um agradecimento especial pelo apoio, amor incondicional, encorajamento e por ser a minha luz quando mais precisei ao longo desta etapa acadêmica.

Agradeço a minha família, em especial minha tia Joana, por ser sempre leve e contagiante, minha maior apoiadora. Obrigado por sempre me incentivar e comemorar comigo todas as pequenas e grandes conquistas.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e colaboração de todos vocês. Obrigado.

Agradeço a todos os meus voluntários por terem se disponibilizado a participar do meu estudo. E um agradecimento especial a Universidade de Brasília, pelo suporte e infraestrutura que foi de grande ajuda durante todos estes anos e garantiu a conclusão do meu mestrado.

Agradeço a todos os membros da secretaria de pós graduação e a todos os professores com que tive aula durante o mestrado. E também a todos os funcionários da UnB que foram sempre gentis e solícitos comigo.

Por fim, quero expressar minha gratidão a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, mesmo que não estejam mencionados aqui.

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1. ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE CONTINUA (ECC)	16
1.2. REFLEXO H	19
1.3. INIBIÇÃO PRE-SINÁPTICA (IPS)	25
1.4. ONDA V	28
1.5. MOTIVAÇÃO E HIPÓTESE DO ESTUDO	30
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
3.1. AMOSTRA	31
3.2. INSTRUMENTAÇÃO	32
3.3. PREPARO DO PARTICIPANTE	33
3.4. AQUISIÇÃO DO REFLEXO H E ONDA M	35
3.5. ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE ELÉTRICA CONTINUA	36
3.6. PARADIGMA C-T	37
3.7. PROTOCOLO DE THRESHOLD TRACKING (THTR)	37
3.8. PROTOCOLO DE ONDA V	37
3.9. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
3.10. PROCESSAMENTO DE SINAIS	41
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
4.1. PROTOCOLO DE CURVA DE RECRUTAMENTO	45
4.1.1. ECC REAL (PARÂMETROS DA CURVA)	45
4.1.2. ECC SHAM (PARÂMETROS DA CURVA)	46
4.1.3. CONDIÇÃO REAL (CORRENTES)	51
4.1.4. CONDIÇÃO SHAM (CORRENTES)	51
4.2. PROTOCOLO DE INIBIÇÃO PRE SINÁPTICA (IPS)	53
4.2.1. CONDIÇÃO REAL (IPS E THTR)	54
4.2.2. CONDIÇÃO SHAM (IPS E THTR)	54
4.3. ONDA V	56
4.3.1. CONDIÇÃO REAL (ONDA V E ONDA M)	57
4.3.2. CONDIÇÃO SHAM (ONDA V E ONDA M)	57
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
5.1. CURVA DE RECRUTAMENTO (CR) DO REFLEXO H	58
5.2. EFEITOS DA ECC SOBRE A IPS	60
5.3. PROTOCOLO DE ONDA V	63
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>65</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

SNC – Sistema Nervoso Central.

ECC – Estimulação por corrente elétrica contínua.

ETCC - Estimulação transcraniana por corrente elétrica contínua

CIVM - Contração isométrica voluntária máxima

C-T - Condicionante-teste

IPS – Inibição pr-sináptica.

FIB – Nervo fibular comum.

Hlim – Reflexo H limiar.

Hmax – Reflexo H máximo.

Mmax – Onda M máxima.

MN - Motoneurônios

PA - Potencial de ao

SUR - Nervo sural

THTR – *Threshold Tracking*

## RESUMO

**Introdução:** A neuroplasticidade se define como alterações funcionais e/ou estruturais em certas regiões do sistema nervoso central decorrentes de alguma intervenção, como por exemplo estimulação por corrente elétrica contínua (ECC). A estimulação transcraniana por corrente contínua é talvez a ECC mais utilizada em diferentes estudos sobre plasticidade, seguida da estimulação medular. Contudo, ECC aplicada em membros para estímulo de nervos tem sido pouco explorada, com um estudo mostrando modulação do reflexo H. Os mecanismos envolvidos em adaptações do sistema nervoso a diferentes tipos de intervenção ou estimulação têm sido estudados utilizando paradigmas experimentais para avaliar vias inibitórias envolvidas na modulação da excitabilidade reflexa. No presente estudo, um paradigma condicionante-teste foi utilizado para se avaliar a excitabilidade da via de inibição pré-sináptica (IPS) com o objetivo de identificar o mecanismo de modulação reflexa que pode estar sendo afetado pela ECC aplicada no membro inferior. Outra técnica de avaliação da IPS, *threshold tracking* (THTR), que permite estudar aproximadamente a mesma população de motoneurônios, foi adotada. O reflexo H em repouso e durante a contração voluntária máxima (e resposta à estimulação supra-máxima: onda V) foram também avaliados em resposta a ECC aplicada no membro inferior. Estas respostas permitem avaliar a excitabilidade das vias medulares e descendentes (dos centros suprasegmentares), respectivamente.

**Objetivos:** Avaliar os efeitos da ECC no membro inferior sobre a excitabilidade reflexa e possíveis mecanismos de modulação.

**Métodos:** O reflexo H foi evocado no músculo sóleo com um pulso retangular de corrente de 1ms aplicado no nervo tibial (estímulo teste) em diferentes intensidades para se obter parâmetros de amplitude da curva de recrutamento. A resposta reflexa equivalente à 50% da resposta H máxima (Hmax) foi condicionada por um estímulo no nervo fibular aplicado 100ms antes para induzir a IPS (paradigma condicionante-teste, ou C-T). A técnica de THTR consiste em aumentar a intensidade do estímulo teste para se obter um reflexo H condicionado com mesma amplitude do controle. A ECC consistiu em 20 minutos de estimulação anódica (REAL) com 2mA de intensidade ou placebo (SHAM) (sem intensidade aplicada) divididas em 2 sessões com intervalo de uma semana entre elas. Cada sessão era composta por 4 protocolos em 3 momentos distintos: 1) 20 reflexos H controle, 20 reflexos H condicionados pela estimulação no nervo fibular (técnica C-T); 2) 20 reflexos H utilizando a técnica do THTR; 3) Curva de recrutamento (CR); 4) Onda V. Os momentos eram divididos em: PRE (antes da estimulação com ECC REAL ou SHAM); DUR (durante estimulação com ECC REAL ou SHAM); POS (após estimulação REAL ou SHAM). Foram analisadas variáveis eletromiográficas antes (PRE), durante (DUR), e após (POS) cada momento de ECC em cada dia. As variáveis investigadas foram: 1) Parâmetros extraídos da curva de recrutamento (CR) do reflexo H; 2) Amplitude da onda V; 3) Grau de inibição pré-sináptica (GIPS); 4) Mudança de intensidade de corrente por meio do THTR (COR).

**Resultados:** A intervenção não foi eficaz em gerar alterações significativas nos parâmetros da curva e na amplitude de onda V. Entretanto, foi eficiente em apresentar diferenças significativas entre GIPS\_PRE comparado ao GIPS\_POS na condição REAL. Além disso, foram encontradas diferenças significativas entre COR\_PRE x COR\_POS e COR\_DUR x

COR\_POS ( $p < 0,05$ ). Os resultados sugerem que a ECC somada ao estímulo FIB produz uma inibição potencializada no reflexo H.

**Conclusão:** O uso de ECC anódica em membros inferiores alterou o nível de IPS avaliado pelas duas técnicas (paradigma C-T e THTR). Portanto, o protocolo de duas sessões de ECC foi eficaz para gerar efeitos sobre o GIPS e sobre a COR, mas não sobre os parâmetros da CR ou na amplitude da onda V. Estes resultados complementam os achados recentes por apresentar evidências de um possível mecanismo atuante na modulação reflexa em resposta à ECC em membro inferior. Contribui, portanto, para a discussão de adaptação em mecanismos medulares decorrentes de alterações nas propriedades biofísicas das aferentes dos fusos neuromusculares. .

**Palavras-chave:** Eletromiografia, Reflexo H, Inibição pré-sináptica, Medula espinhal, Threshold Tracking

## ABSTRACT

**Introduction:** Neuroplasticity is defined as functional and/or structural changes in certain regions of the central nervous system resulting from some kind of intervention, such as direct electrical current stimulation (DCS). Transcranial direct current stimulation is perhaps the most used DCS in different studies on plasticity, followed by spinal cord stimulation. However, DCS applied to limbs to stimulate nerves has been little explored, with one study showing modulation of the H reflex. The mechanisms involved in adaptations of the nervous system to different types of intervention or stimulation have been studied using experimental paradigms to evaluate inhibitory pathways involved in the modulation of reflex excitability. In the present study, a conditioning-test paradigm was used to evaluate the excitability of the presynaptic inhibition pathway (PSI) with the aim of identifying the reflex modulation mechanism that may be affected by DCS applied to the lower limb. Another PSI assessment technique, threshold tracking (THTR), which allows studying approximately the same population of motoneurons, was adopted. The H reflex at rest and during maximal voluntary contraction (and response to supra-maximal stimulation: V wave) were also evaluated in response to the DCS applied to the lower limb. These responses make it possible to evaluate the excitability of the medullary and descending pathways (of the suprasegmental centers), respectively.

**Objectives:** To evaluate the effects of DCS in the lower limb on reflex excitability and possible modulation mechanisms.

**Methods:** The H reflex was evoked in the soleus muscle with a 1ms rectangular current pulse applied to the tibial nerve (test stimulus) at different intensities to obtain amplitude parameters of the recruitment curve. The reflex response equivalent to 50% of the maximum H response (Hmax) was conditioned by a stimulus to the peroneal nerve applied 100 ms before to induce the IPS (conditioning-test paradigm, or C-T). The THTR technique consists of increasing the intensity of the test stimulus to obtain a conditioned H reflex with the same amplitude as the control. DCS consisted of 20 minutes of anodal stimulation (REAL) with 2mA intensity or placebo (SHAM) (no intensity applied) divided into 2 sessions with a one-week interval between them. Each session consisted of 4 protocols at 3 different times: 1) 20 control H reflexes, 20 H reflexes conditioned by stimulation of the peroneal nerve (C-T technique); 2) 20 H reflexes using the THTR technique; 3) Recruitment curve (RC); 4) V wave. The times were divided into: PRE (before stimulation with DCS REAL or SHAM); DUR (during stimulation with DCS REAL or SHAM); POS (after REAL or SHAM stimulation). Electromyographic variables were analyzed before (PRE), during (DUR), and after (POS) each moment of DCS on each day. The variables investigated were: 1) Parameters extracted from the H-reflex recruitment curve (RC); 2) Amplitude of V wave; 3) Rate of presynaptic inhibition (GIPS); 4) Change in current intensity through THTR (COR).

**Results:** The intervention was not effective in generating significant changes in the curve parameters and V wave amplitude. However, it was efficient in presenting significant differences between GIPS\_PRE compared to GIPS\_POS in the REAL condition.

Furthermore, significant differences were found between COR\_PRE x COR\_POS and COR\_DUR x COR\_POS ( $p < 0.05$ ). The results suggest that DCS added to the FIB stimulus produces a potentiated inhibition in the H reflex.

**Conclusion:** The use of anodal DCS in the lower limbs changed the PSI level assessed by both techniques (C-T and THTR paradigm). Therefore, the two-session DCS protocol was effective in generating effects on GIPS and COR, but not on RC parameters or V wave amplitude. These results complement recent findings by presenting evidence of a possible acting mechanism in reflex modulation in response to DCS in the lower limb. It therefore contributes to the discussion of adaptation in spinal mechanisms resulting from changes in the biophysical properties of afferents from the neuromuscular spindles. .

**Key Words:** Eletromiography, H Reflex, Pre synaptic inhibition, Spinal cord, Threshold Tracking

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Equipamento de Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC). Nesta foto, encontra-se o posicionamento dos eletrodos referentes a estimulação anódica, ou seja, com o anodo localizado sobre o córtex motor primário e o catodo sobre a região da testa contralateral. Na estimulação catódica este posicionamento é invertido.

**Figura 2.** Região da fossa poplíteia, localizada na parte posterior do joelho.

**Figura 3.** Locais de estimulação por corrente contínua representados pelo círculo e retângulo brancos; Estimulação do reflexo H representado pelo raio preto; Ponto de fixação do eletrodo terra representado pelo retângulo preto. Modificado de Bolzoni et al. 2017.

**Figura 4.** Registro eletromiográfico (EMG) do músculo sóleo mostrando o Hmax obtido por meio de estímulo elétrico aplicado na fossa poplíteia (a intensidade de estimulação foi de 10,7 mA). **A:** Artefato de estímulo; **M:** onda M; **H:** reflexo H. A latência para surgimento do reflexo H é de aproximadamente 30ms. E para onda M de ~10ms. (veja o texto para detalhes) (dado do autor).

**Figura 5.** Registros eletromiográficos (EMG) mostrando a onda M e o reflexo H em resposta a algumas das várias intensidades de estimulação (em mA mostradas sobre a porção direita do EMG) utilizadas para construir a CR. O segundo EMG de cima para baixo corresponde ao mesmo dado apresentado na figura 4 e mostra a resposta H máxima (Hmax). O último EMG (registro mais abaixo) mostra a onda Mmax. Note que os EMGs correspondentes às intensidades maiores mostram reflexos H menores devido à colisão de PAs (detalhes no texto) (dados do autor).

**Figura 6. Curva de recrutamento sem normalização de um participante.** Cada ponto representa a média de cinco valores de amplitude pico-a-pico do reflexo H (e da onda M). Com o aumento da intensidade de estimulação ocorre aumento da amplitude do reflexo H até um platô. Em seguida, observa-se diminuição na amplitude do reflexo H devido ao fenômeno de aniquilação. O ponto que corresponde à maior amplitude do reflexo H (Hmax) (referente à intensidade de 10,7 mA) foi calculado a partir do dado da figura 4 (dados do autor).

**Figura 7.** Os mesmos dados da figura 6 apresentando os valores normalizados para se proceder com os ajustes sigmoidais. **A)** A curva em azul é o ajuste da alça ascendente da CR do reflexo H, e a vermelha ao ajuste feito na CR da onda M. A inclinação das retas pontilhadas indica o ganho de recrutamento (dados do autor). **B)** Zoom nos dados apresentados em **A** para enfatizar a alça ascendente da CR com o ajuste sigmoidal (a CR da onda M não está representada para facilitar a visualização).

**Figura 8.** Parâmetros da curva de recrutamento. 1- Hmax, 2- 50% de Hmax, 3- Inclinação (slope – Hslp) da reta ajustada à alça ascendente, 4- Corrente Limiar do H lim (Hth), 5- Corrente à 50% de Hmax (H50), 6- Corrente à 100% de Hmax (mapeando o H100 na curva ajustada). Modificado de Klimstra & Zehr (2008).

**Figura 9. Inibição pré-sináptica das aferentes la evocadas por um estímulo condicionante no nervo fibular comum.** A figura ilustra a circuitaria espinhal durante a aplicação de um estímulo condicionante com intensidade de 1,1 vezes o limiar motor com intervalo de 10ms para avaliar inibição D1 e 100ms para avaliar inibição D2. (figura e texto retirados de Agostinucci, 2013)

**Figura 10.** Registro dos sinais EMG do SO após estimulação elétrica supramáxima do nervo tibial (150% da intensidade necessária para se evocar uma onda Mmax) durante CIVM dos flexores plantares do tornozelo. A onda Mmax surge logo após o artefato, como consequência da estimulação de 100% dos axônios motores, e a onda V surge em cerca de 30 ms. Registro coletado no LACOMOT e não publicado.

**Figura 11.** Neuropack X1 MEB 2300.

**Figura 12.** Soterix Medical 1x1.

**Figura 13.** Suporte instrumentalizado confeccionado para experimentos com reflexo H.

**Figura 14. Voluntário durante o teste.** Locais de fixação dos eletrodos de ECC (fita azul). Os eletrodos de estimulação para se evocar o reflexo H foram fixados pela fita de velcro cinza envolvendo a fossa poplíteia. Estimulação cutânea do FIB representado pela fita que cruza a cabeça da fíbula e perna. Eletrodo terra posicionado no punho sobre o processo estilóide.

**Figura 15. Desenho experimental das coletas.** Cada voluntário visitou o laboratório duas vezes, com o mesmo protocolo, sendo que a única diferença entre os dias era o tipo de estimulação aplicada no momento DUR. Durante o PRE, o protocolo era coletar 60 respostas (20 Controle/20 C-T/ 20 THTR), realizar uma curva de recrutamento e três aquisições de onda V; Durante o pós, o protocolo era semelhante ao PRE, mas o aparelho de ECC era montado no voluntário e aplicava-se a estimulação por corrente contínua, ou seja, durante as 60 respostas (ECC anódica (REAL) ou SHAM + 20 Controle/20 C-T/20 THTR), realizar uma curva de recrutamento e três aquisições de onda V; No POS, o aparelho de estimulação por corrente contínua era removido e o protocolo era idêntico ao do PRE.

**Figura 16. EMGs do músculo SO com o artefato de estímulo (A), onda M (M) e reflexo H (H).** Cada registro com traçado mais espesso representa uma média síncrona (promedição) dos 15 traçados mais finos. O traçado em azul é o reflexo H controle, o traçado verde é o reflexo H condicionado, e o traçado vermelho é o reflexo condicionado evocado com maior estimulação.

**Figura 17.** Intensidades de corrente para evocar a resposta controle (primeiros 20 estímulos), seguidas das intensidades de corrente para se evocar as respostas condicionadas (15 estímulos) e, por último, os estímulos necessários para se evocar um reflexo H condicionado com amplitude igual a do controle (20 últimos estímulos). O traçado horizontal em vermelho representa a média das quinze últimas respostas.

**Figura 18.** Valores de amplitude pico-a-pico (p-p) do reflexo H controle e condicionado pelo estímulo no FIB. Dados obtidos a partir dos registros apresentados na figura 16. Os círculos maiores conectados com a linha mais espessa representam a média das 15 medidas em cada situação (controle e condicionada). Houve diferença significativa entre os valores de amplitude ( $p < 0,05$ ).

**Figura 19.** Comparação das variáveis Hlim (representado por Hth) e H@lim (representado por H@th) nos momentos antes e após uma intervenção; H50 e H@50 nos momentos antes e após uma intervenção; H100 e H@100 nos momentos antes e após uma intervenção; Note que todos possuem as respectivas correntes (corrente limiar para o Hlim, corrente a 50% do Hmax para o H50 e corrente 100% para o H100) para serem evocados. Modificado de Klimstra & Zehr (2008).

**Figura 20. Valores de H Limiar antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de H limiar de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados pela Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

**Figura 21. Valores de H50 antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de H50 de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da onda Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

**Figura 22. Valores de H100 antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de H100 de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da onda Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

**Figura 23. Valores de H Máx antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de H Máx de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da onda Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

**Figura 24. Curva de recrutamento de um participante PRE e POS estimulação por corrente elétrica contínua na situação REAL. A)** Ajuste sigmoidal da CR do reflexo H na situação PRE. São apresentados os valores de Hth, H50 e H100 e suas respectivas correntes elétricas para comparação com o POS. **B)** CR do reflexo H antes (PRE, azul escuro) e depois (POS, vermelho) da ECC. Há três círculos vermelhos mostrando os parâmetros H@th, H@50 e H@100, encontrados na curva pós usando como referência a corrente normalizada (que são os quadrados da abscissa). As retas pontilhadas azul e vermelha condizem com o Hslp PRE e o Hslp POS, respectivamente.

**Figura 25. Valores de Corrente H Limiar antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de corrente Hlim de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da corrente a 50% Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

**Figura 26. Valores de Corrente H50 antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de corrente H50 de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da corrente a 50% Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

**Figura 27. Valores de Corrente H100 antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de corrente H100 de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da corrente a 50% Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

**Figura 28. Valores de GIPS antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de GIPS de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as situações.

**Figura 29. Valores de corrente antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de Cor\_THTR de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as situações.

**Figura 30. Valores de onda V antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de onda V de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram

normalizados como uma razão da onda Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros da curva de recrutamento.

Tabela 2. Correntes utilizadas para obtenção dos parâmetros da curva de recrutamento.

Tabela 3. Protocolo de inibição pré sináptica e rastreo da resposta H (*threshold tracking*)

Tabela 4. Percentuais de mudança da GIPS e Cor\_THTR.

Tabela 5. Parâmetros do protocolo de onda V

## 1. INTRODUÇÃO

A excitabilidade do Sistema Nervoso Central (SNC) pode ser modulada por exercícios físicos (Tahayori e Koceja, 2012), substâncias químicas (Warlton e Kafarelli, 2003; Macdonell et al., 1989) e estimulação elétrica e mecânica (Roche et al., 2011), dentre outros fatores. Estas mudanças, quando se tornam permanentes ou se mantêm por períodos longos (semanas ou meses), são comumente associadas à plasticidade neuronal. Plasticidade se define como alterações estruturais em certas regiões do SNC decorrentes de alguma intervenção (Tahayori e Koceja, 2012). Tais alterações podem ocorrer em diferentes níveis do SNC, desde os mais rostrais (córtex e cerebelo), até os mais caudais (determinados segmentos da medula espinhal) (Tahayori e Koceja, 2012; Roche et al., 2011; Brunoni et al., 2012).

Estudos da neurofisiologia da medula espinhal em humanos têm mostrado que esta região do SNC é suscetível às adaptações neurofisiológicas decorrentes de lesões que acometem o sistema motor (Burke e Pierrot-Deseilligny, 2005), de atividades físicas que envolvem aprendizado motor (Avelar et al., 2016), imobilização de membros inferiores (Loadman e Zehr, 2007), aumento de força e resistência (Casabona et al., 1990; Nielsen et al., 1993), e de intervenções que envolvem eletroestimulação e até mesmo pré-condicionamento isquêmico (Quadrado et al., 2020). Os mecanismos envolvidos nessas adaptações têm sido estudados utilizando paradigmas experimentais que incluem estímulos condicionantes para avaliar vias inibitórias envolvidas na modulação da excitabilidade reflexa.

Um dos mecanismos mais importantes envolvidos na modulação reflexa é a inibição pré-sináptica (IPS), caracterizada por uma sinapse axo-axônica sobre os terminais das aferentes Ia que partem dos fusos neuromusculares (Rudomin e Schmidt, 1999; Stein, 1995). Um paradigma condicionante-teste (C-T) pode ser utilizado para se estudar esta via inibitória. Este paradigma consiste na estimulação de aferentes Ia dos fusos neuromusculares de um dado músculo (p.ex., que trafegam pelo nervo fibular comum que supre o músculo tibial anterior) seguida de estimulação do nervo do antagonista (p.ex., nervo tibial que inerva o músculo sóleo) (Mezzarane et al., 2015; Frigon et al., 2004). A estimulação do nervo tibial, após um

estímulo condicionante aplicado 100 ms antes no nervo fibular comum (FIB), induz uma redução na amplitude da resposta reflexa no músculo sóleo (SO), que é a resposta condicionada pela IPS. Usando procedimento semelhante, é possível aumentar a excitabilidade reflexa induzindo diminuição na excitabilidade da via da IPS por meio de aplicação de estímulo condicionante cutâneo (Demaire et al., 1989; Iles, 1996). Estes paradigmas permitem identificar qual o mecanismo envolvido na modulação reflexa em resposta a diferentes intervenções (Frigon et al., 2004; Nakajima et al., 2014) (veja detalhes nas seções subsequentes).

### **1.1. ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE CONTÍNUA (ECC)**

Este tipo de estimulação é normalmente sublimiar, ou seja, o participante não sente a corrente aplicada, pois a intensidade é muito baixa (Nitsche et al., 2003). Portanto, é possível se estabelecer um protocolo experimental para evitar qualquer efeito psicológico (efeito placebo). Tipicamente, dois experimentos são conduzidos: um com o estímulo real (aplicação da corrente elétrica contínua) e outro com uma corrente SHAM (inicialmente aplica-se a corrente, e em seguida desliga-se o aparelho sem o participante perceber). A aplicação mais difundida da técnica de ECC é transcraniana (Nitsche et al., 2003; Nitsche e Paulus, 2011). A Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) permite atuação direta na transmissão sináptica (Nitsche et al., 2003) por meio de alterações no potencial de membrana dos neurônios corticais (Fritsch et al., 2010; Bhadra e Kilgore, 2004). Os recentes estudos sobre ETCC demonstram efeitos polaridade-dependente (Jackson et al., 2016), ou seja, a estimulação anódica (íons saindo do anodo em direção ao catodo) tende a aumentar a excitabilidade neuronal por despolarizar a célula enquanto que a catódica (íons saindo do catodo em direção ao anodo) tende a realizar o efeito contrário (Bhadra e Kilgore, 2004). Tais efeitos podem variar conforme o posicionamento dos eletrodos e a corrente aplicada na região do escalpo (veja a figura 1) (Jackson et al, 2016; Bhadra e Kilgore, 2004; Bolzoni e Jankowska, 2015).



**Figura 1.** Equipamento de Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC). Nesta foto, encontra-se o posicionamento dos eletrodos referentes a estimulação anódica, ou seja, com o anodo localizado sobre o córtex motor primário e o catodo sobre a região da testa contralateral. Na estimulação catódica este posicionamento é invertido.

A ETCC é utilizada como um adjunto em diversos tratamentos. O uso da técnica demonstrou melhorias no aprendizado motor em pacientes pós AVC (Fregni et al., 2005; Gomez et al., 2013), portadores da doença de Parkinson (Benninger et al., 2010) e em indivíduos saudáveis (Fritsch et al., 2010). Também atua nos aspectos cognitivos, como memória (Fregni et al., 2005) e tempo de reação em pacientes pós AVC (Monti et al., 2008). Alguns destes efeitos chegam a durar mais de uma hora, tornando o potencial de membrana mais positivo (despolarizado) com estímulos anódicos e mais negativo (gerando uma hiperpolarização) com estímulos catódicos (Nitsche e Paulus, 2011).

Apesar do estímulo ser comumente aplicado no escalpo, seus efeitos não são limitados às regiões subjacentes (como o córtex) (Cogiamanian et al., 2011; Bolzoni et al., 2017). A estimulação anódica também provoca mudanças na excitabilidade dos circuitos neuronais espinhais (Roche et al., 2011). Roche et al. (2011) verificaram aumento na inibição recorrente nos motoneurônios (MN) alfa após 20 minutos de estimulação anódica sobre o córtex motor primário.

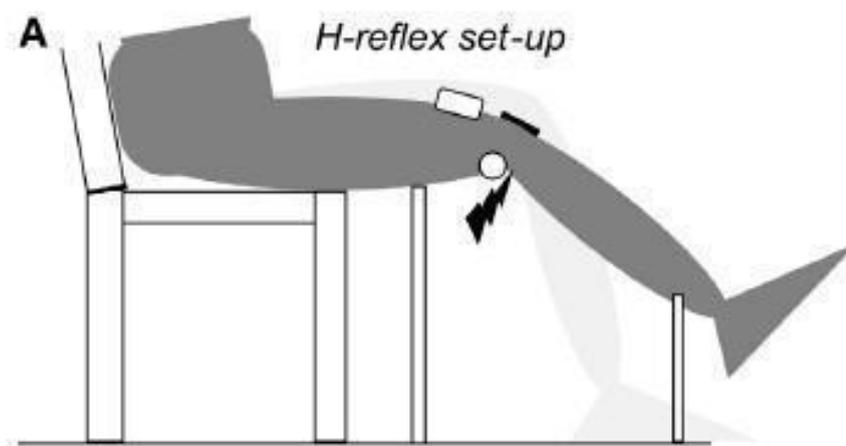
Outro local de ECC que tem sido recentemente investigado com crescente interesse é a medula espinhal. Este tipo de estimulação tem mostrado resultados práticos de longa duração. Por exemplo, as estimulações na medula espinhal apresentaram efeitos analgésicos (Cogiamanian et al., 2011) e aumentaram a

amplitude dos movimentos articulares de pacientes com lesões medulares (Yamagushi et al., 2015).

Recentemente, a aplicação de corrente contínua diretamente no nervo mostrou efeitos diferenciados na resposta reflexa (reflexo H) e na resposta direta (onda M) (Bolzoni et al., 2017). Bolzoni et al. (2017) foram um dos pioneiros a testar a estimulação diretamente no nervo de membro inferior de humanos (figura 3) para investigar: 1) a modulação da excitabilidade de fibras sensoriais e/ou motoras; 2) se esta modulação é polaridade-dependente; 3) se os efeitos persistem ao longo do tempo. Os autores obtiveram resultados que sugerem hiperpolarização neuronal durante a estimulação anódica e uma despolarização ao utilizar a catódica na fossa poplítea (figuras 2 e 3). Tais efeitos perduraram até 30 minutos após a estimulação.



**Figura 2.** Região da fossa poplítea, localizada na parte posterior do joelho.



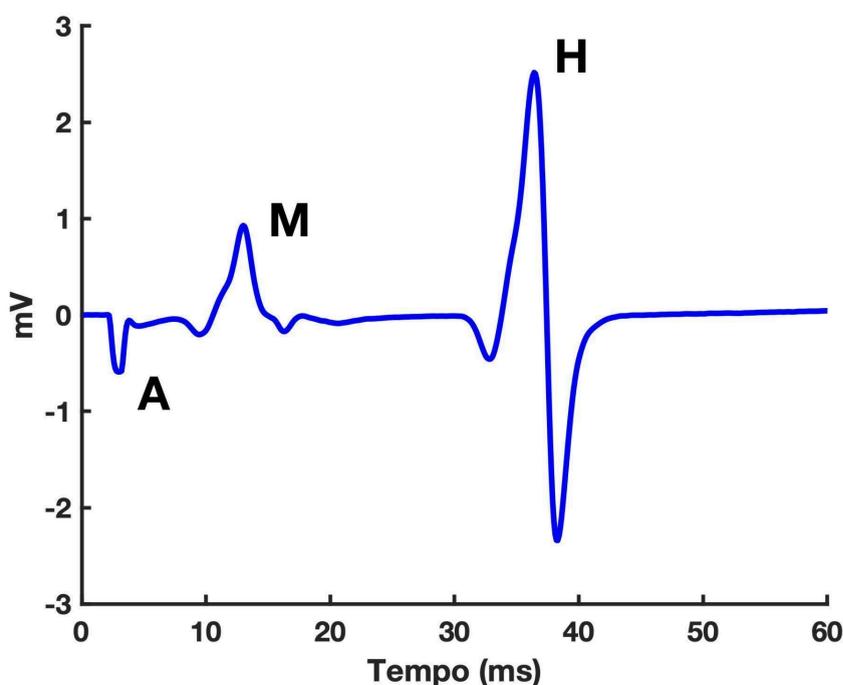
**Figura 3.** Locais de estimulação por corrente contínua representados pelo círculo e retângulo brancos; Estimulação do reflexo H representado pelo raio preto; Ponto de fixação do eletrodo terra representado pelo retângulo preto. Modificado de Bolzoni et al. (2017).

## 1.2. REFLEXO H

O reflexo H é considerado um homólogo do reflexo de estiramento e é utilizado como parâmetro para análise de alterações na excitabilidade desta via reflexa. Para obter o reflexo H, um estímulo elétrico é aplicado no nervo que dispara seletivamente potenciais de ação (PAs) nas aferentes Ia dos fusos neuromusculares, seguindo até a medula espinhal. Os PAs gerados nos MN (alfa) medulares são conduzidos pelos respectivos axônios motores (fibras eferentes) para o músculo, gerando PAs nas fibras musculares. A soma destes PAs (potencial de ação composto) é captada à distância pelos eletrodos de eletromiografia de superfície, sendo denominada reflexo H. Entretanto, ao aumentar a intensidade de estimulação, são também deflagrados PAs nas fibras eferentes. Esses potenciais seguem diretamente para o músculo (sem passar pela medula) e chegam aos terminais axonais onde são liberadas as moléculas de neurotransmissores (acetilcolina), que se ligam aos receptores de placa motora gerando o PA nas fibras musculares. Neste caso, o potencial de ação composto gerado nas fibras musculares e captado no músculo com eletrodos de superfície denomina-se onda M (ou resposta direta), que apresenta uma latência menor do que a do reflexo H.

Alterações na intensidade de estímulo, permitem ao pesquisador obter diferentes amplitudes da resposta reflexa, como o H limiar ( $H_{lim}$ ) que é caracterizado

como a medida de uma resposta reflexa mínima (evocada com baixas intensidades de estimulação), o reflexo H máximo (Hmax) (figura 4) que é a medida da resposta reflexa máxima e a onda M máxima, sendo a resposta muscular máxima representando o recrutamento de todas as fibras (pela aplicação de um estímulo supramáximo) (traçado inferior da figura 5). O reflexo H pode ser utilizado para inferir a interação entre diferentes elementos da medula espinhal em diversas condições, como: lesões musculoesqueléticas, fadiga após treinamento físico, durante a realização de tarefas dinâmicas, etc (Palmieri et al., 2004). Esta técnica é usualmente aplicada ao músculo SO, pelo acesso ao nervo tibial (o eletrodo de estimulação é fixado na fossa poplítea) e facilidade de se evocar a resposta.

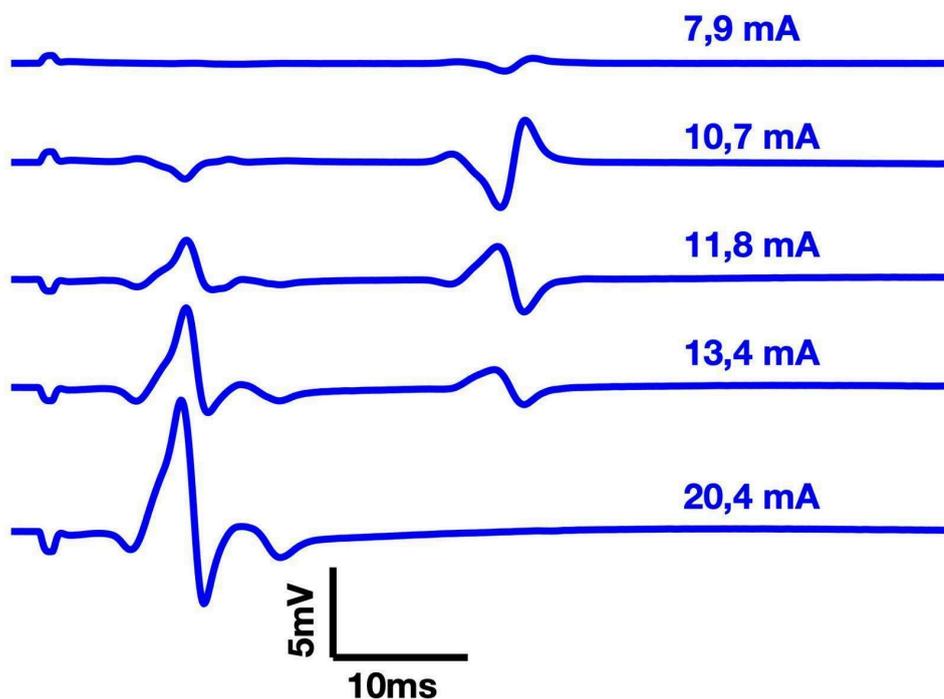


**Figura 4.** Registro eletromiográfico (EMG) do músculo sóleo mostrando o Hmax obtido por meio de estímulo elétrico aplicado na fossa poplítea (a intensidade de estimulação foi de 10,7 mA). **A:** Artefato de estímulo; **M:** onda M; **H:** reflexo H. A latência para surgimento do reflexo H é de aproximadamente 30ms. E para onda M de ~10ms. (veja o texto para detalhes) (dado do autor).

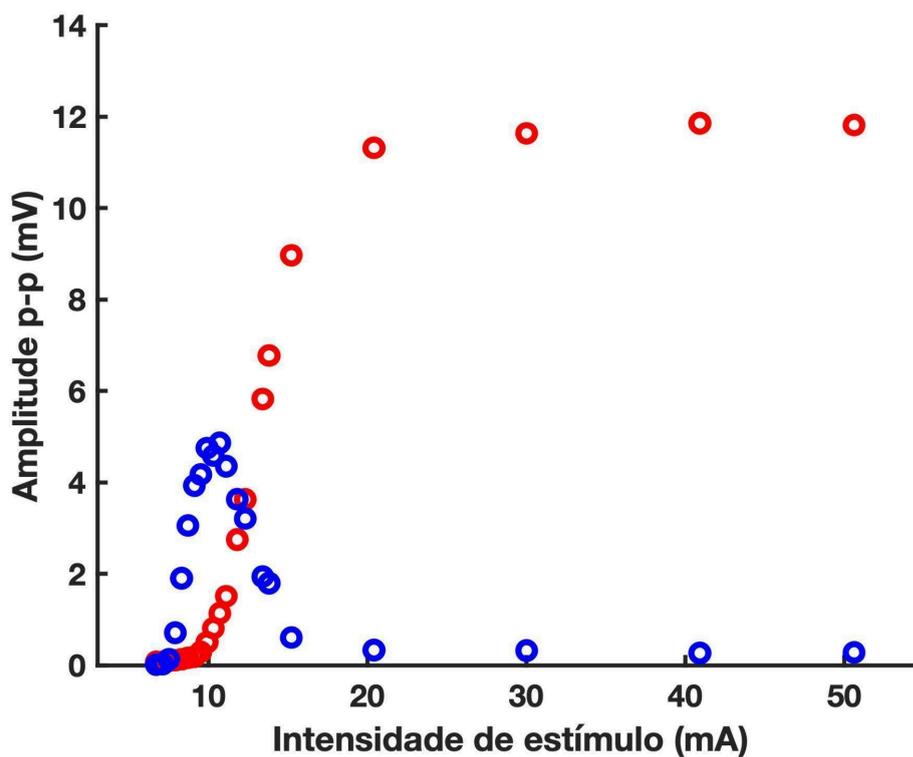
A relação entre intensidade de estimulação e a amplitude do reflexo H não é linear (figura 5). A curva de recrutamento (CR) do reflexo H é definida como o gráfico que apresenta a amplitude pico-a-pico do reflexo H na ordenada e a intensidade de estímulo aplicado ao nervo na abscissa (figura 6). Tem-se sugerido que a curva logística (sigmóide) é a que melhor se ajusta aos dados da CR (Klimstra e Zehr, 2008). A partir de ajustes sigmoidais da CR, são obtidos parâmetros da alça

ascendente que refletem as respostas reflexas de diferentes amplitudes (Mezzarane et al., 2011; Vila-Cha et al., 2012) (figura 6).

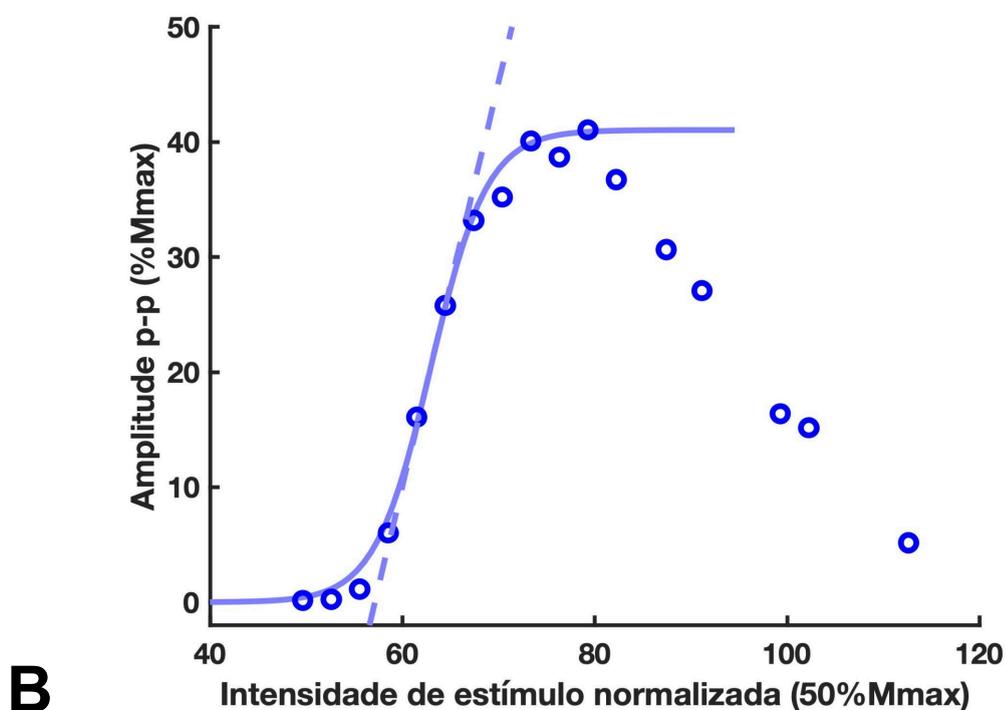
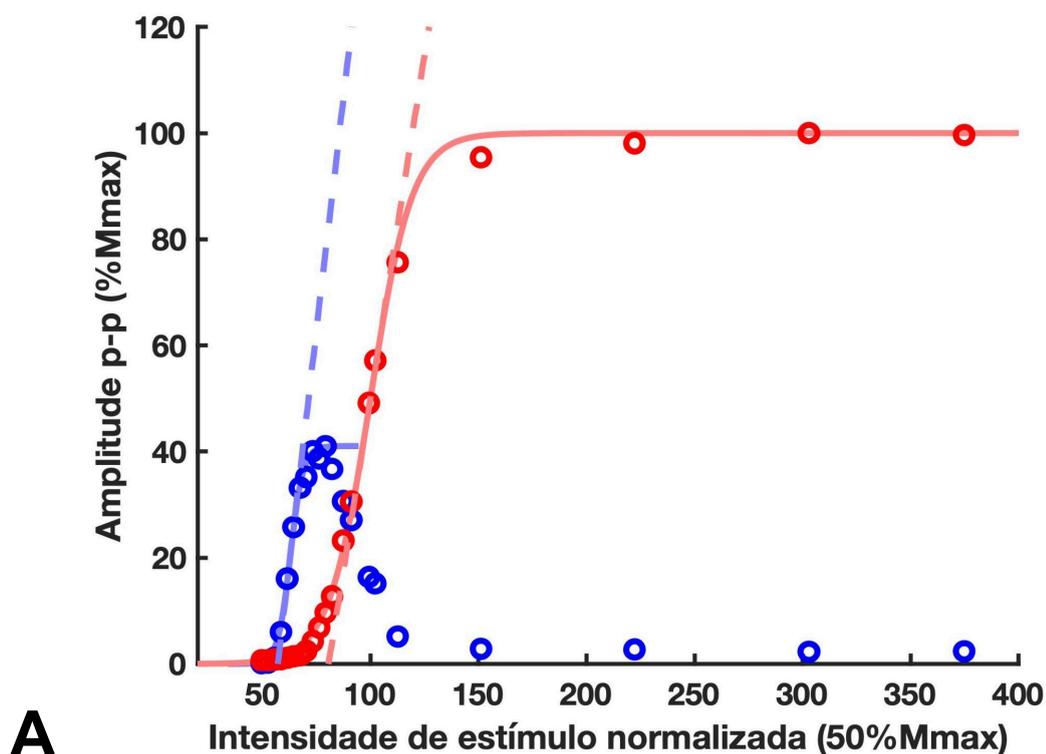
Um dos parâmetros que podem ser extraídos da curva é a inclinação da reta ou “slope”, que indica o ganho do recrutamento e é caracterizada pela reta que tangencia o ponto de maior inflexão da curva (onde a derivada é máxima), equivalente à metade do Hmax ou Mmax (Kimikou, 2008) (figura 7). Portanto, o Hlim é o limiar de amplitude do reflexo H, H50 corresponde a 50% da Hmax, H100 é a amplitude de referência da sigmóide que representa as maiores amplitudes (a diferença entre H100 e Hmax é o fato de ser possível obter a corrente que evoca H100), Hslp é a inclinação da reta que tangencia o ponto de maior inflexão da curva do reflexo H e Mslp é inclinação da reta que tangencia o ponto de maior inflexão da curva da onda M (figura 8). A CR é um método efetivo por abranger todos os valores de H e onda M. Muitos estudos avaliam apenas Hlim, ou H50, ou H100 e dificulta a comparação dependendo do protocolo utilizado. Por isso, a CR permite a comparação com um número maior de estudos e facilita a explicação dos mecanismos de acordo com a resposta H abordada.



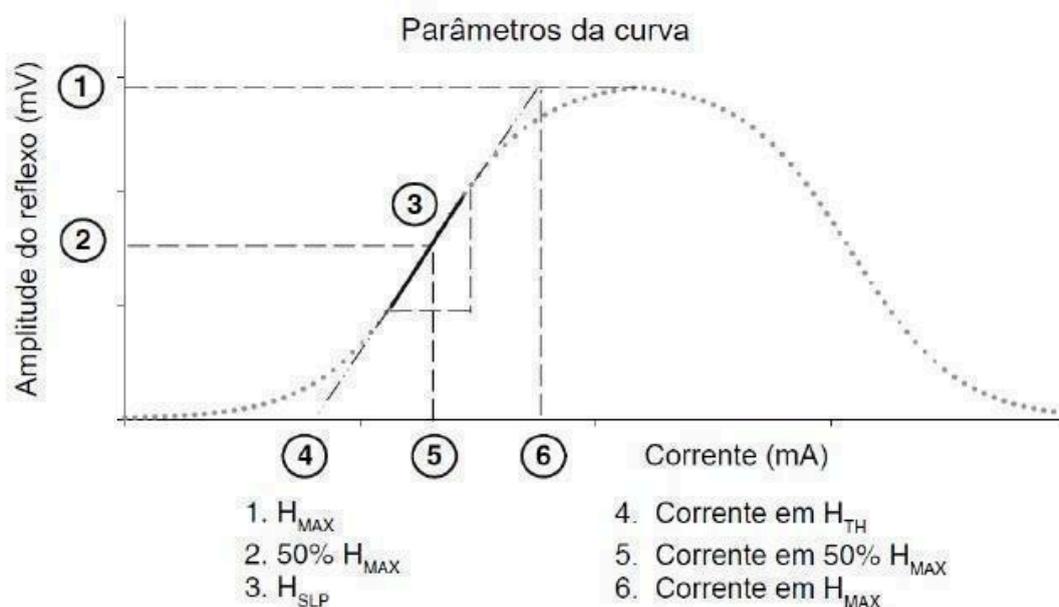
**Figura 5.** Registros eletromiográficos (EMG) mostrando a onda M e o reflexo H em resposta a algumas das várias intensidades de estimulação (em mA mostradas sobre a porção direita do EMG) utilizadas para construir a CR. O segundo EMG de cima para baixo corresponde ao mesmo dado apresentado na figura 4 e mostra a resposta H máxima (Hmax). O último EMG (registro mais abaixo) mostra a onda Mmax. Note que os EMGs correspondentes às intensidades maiores mostram reflexos H menores devido à colisão de PAs (detalhes no texto) (dados do autor).



**Figura 6. Curva de recrutamento sem normalização de um participante.** Cada ponto representa a média de cinco valores de amplitude pico-a-pico do reflexo H (e da onda M). Com o aumento da intensidade de estimulação ocorre aumento da amplitude do reflexo H até um platô. Em seguida, observa-se diminuição na amplitude do reflexo H devido ao fenômeno de aniquilação. O ponto que corresponde à maior amplitude do reflexo H (Hmax) (referente à intensidade de 10,7 mA) foi calculado a partir do dado da figura 4 (dados do autor).



**Figura 7.** Os mesmos dados da figura 6 apresentando os valores normalizados para se proceder com os ajustes sigmoidais. **A)** A curva em azul é o ajuste da alça ascendente da CR do reflexo H, e a vermelha ao ajuste feito na CR da onda M. A inclinação das retas pontilhadas indica o ganho de recrutamento (dados do autor). **B)** Zoom nos dados apresentados em **A** para enfatizar a alça ascendente da CR com o ajuste sigmoidal (a CR da onda M não está representada para facilitar a visualização).



**Figura 8.** Parâmetros da curva de recrutamento. 1-  $H_{max}$ , 2- 50% de  $H_{max}$ , 3- Inclinação (slope –  $H_{slp}$ ) da reta ajustada à alça ascendente, 4- Corrente Limiar do H lim ( $H_{th}$ ), 5- Corrente à 50% de  $H_{max}$  ( $H_{50}$ ), 6- Corrente à 100% de  $H_{max}$  (mapeando o  $H_{100}$  na curva ajustada). Modificado de Klimstra & Zehr (2008).

Após as devidas normalizações (das amplitudes e das correntes), os parâmetros desta sigmóide podem ser comparados aos parâmetros obtidos da sigmóide ajustada à CR levantada em um momento pós-intervenção (em nosso caso, pós aplicação da ECC). Desta forma, usando os mesmos valores de corrente relativa que gerou uma dada resposta reflexa (por exemplo,  $H_{50}$ ), pode-se mapear a nova resposta do momento pós-intervenção e verificar se houve aumento ou diminuição na excitabilidade reflexa para uma determinada subpopulação de unidades motoras que compõem a rede de MN do SO.

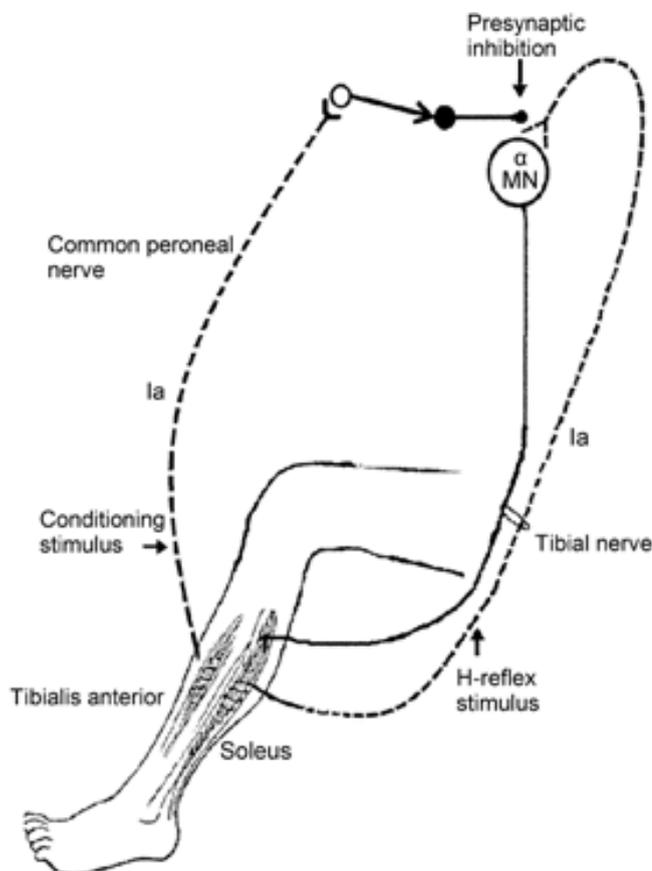
### 1.3. INIBIÇÃO PRÉ-SINÁPTICA (IPS)

O reflexo H também sofre interferência de vias inibitórias que atuam diretamente na excitabilidade reflexa. Dois circuitos inibitórios e de organização recíproca são bem importantes em estudos da neurofisiologia da medula espinhal em humanos: a inibição recíproca e inibição pré-sináptica (IPS). A primeira é caracterizada pela sinapse das fibras Ia do músculo antagonista com um interneurônio inibitório, gerando uma hiperpolarização nos MN do músculo agonista (Crone, 1993). A segunda é controlada por comandos espinhais e supraespinhais

que modulam influências periféricas por meio de neurotransmissores (ácido gama-aminobutírico: GABA) secretados por interneurônios inibitórios de última ordem no terminal axônico das aferentes Ia (Stein, 1995), ou seja, é uma via inibitória que controla o influxo de informação das fibras aferentes do fuso neuromuscular sobre os MN. Uma maneira de se acessar a excitabilidade desta via que atua no SO, por exemplo, pode ser por meio de estímulos nas aferentes do músculo antagonista (FIB) (Frigon et al., 2004; Iles, 1996).

Hultborn et al. (1987) e Guissard et al. (2001) descrevem que o sistema de controle da medula espinhal pode ser parcialmente mediado pelo mecanismo de IPS das aferentes Ia. Os autores observaram uma depressão na amplitude do reflexo H do músculo SO após uma dorsiflexão passiva do tornozelo, supondo que a inibição era resultado da ativação das aferentes Ia (Iles, 1996; Abbruzzese et al., 1998).

Algumas aferentes cutâneas podem diminuir a excitabilidade da IPS sobre o músculo (Demaire et al., 1989; Iles, 1996; Frigon et al., 2004;). Por exemplo, no repouso, observa-se uma facilitação significativa do reflexo H quando um estímulo cutâneo condicionante é aplicado 100 ms antes do estímulo teste (que evoca o reflexo H condicionado) (Nakajima et al., 2013; Suzuki et al., 2014) Efeito contrário ocorre quando se aplica o estímulo condicionante no mesmo intervalo sobre o FIB (figura 9).



**Figura 9. Inibição pré-sináptica das aferentes Ia evocadas por um estímulo condicionante no nervo fibular comum.** A figura ilustra a circuitaria espinhal durante a aplicação de um estímulo condicionante com intensidade de 1,1 vezes o limiar motor com intervalo de 10ms para avaliar inibição D1 e 100ms para avaliar inibição D2. (figura e texto retirados de Agostinucci, 2013)

Contudo, há uma incerteza se a população de MN suscetíveis à inibição é a mesma que é facilitada pelo estímulo cutâneo, ou seja, se uma população “A” de MN sofre inibição, não é possível afirmar se é a mesma população “A” que sofrerá facilitação ou se será uma população “A+B”, uma vez que existem diferenças biofísicas entre aferentes cutâneas e MN alfa (Bostock et al. 1998).

Existem também outros problemas: 1) Não há linearidade na relação input/output (estímulo/resposta) mesma quando expressa como percentual da Mmax (Crone et al. 1990); 2) Os efeitos dos estímulos não são homogêneos no reflexo H, afetando de forma diferente MN de menores limiares e de maiores limiares de ativação (Garnett e Stephens, 1981); 3) Há mudanças no ganho input/output da rede de MN implementando um estímulo que produz uma resposta modificada mesmo com os mesmos MN ativos (El Basiouny et al., 2010).

Agostinucci (2013) afirma que toda ação motora, até as mais simples, é controlada pelo recrutamento preciso de populações de MN. Portanto, é importante avaliar todo processo que pode influenciar a excitabilidade dos MN, se assegurando sempre de estar trabalhando com a mesma população.

Um método alternativo para contornar os problemas apresentados é o *threshold tracking* (THTR) (Burke et al., 2001; Bostock et al., 1998). Esta técnica consiste em variar a intensidade de estimulação teste para que a amplitude do reflexo H permaneça constante apesar das mudanças na excitabilidade das vias reflexas. Com isso, a mesma população de MN pode ser estudada ainda que haja mudanças de excitabilidade da rede (Howells et al., 2020).

A técnica de THTR tem inúmeras vantagens, como o tempo de aplicação (~60% do tempo comparado ao método de estímulo C-T), a possibilidade de utilizar outras estimulações como ETCC, e seus resultados são semelhantes aos de outras técnicas (Samusyte et al., 2018; Matamala et al., 2018). Além disso, o THTR resolve o principal problema do paradigma C-T do reflexo H que é saber se a mesma população de MN é a afetada pelo teste. Suas únicas desvantagens são o tempo de treinamento do avaliador para conseguir alterar de forma correta as intensidades, o equipamento utilizado e, geralmente, só conseguir ser utilizado com voluntários de reflexo H de amplitudes médias para altas (Howells et al., 2020).

Bolzoni et al., (2017) deixa em aberto uma possibilidade de efeito da ECC no SNC. Um dos principais mecanismos que regulam o ganho da via reflexa na medula é a IPS (Hultborn et al., 1987 e Guissard et al., 2001). A IPS pode ser medida por meio do protocolo C-T (Frigon et al., 2004) e por meio da técnica do THTR (Bostock et al., 1998). Por isso, ambas as técnicas foram utilizadas no presente trabalho para um melhor resultado.

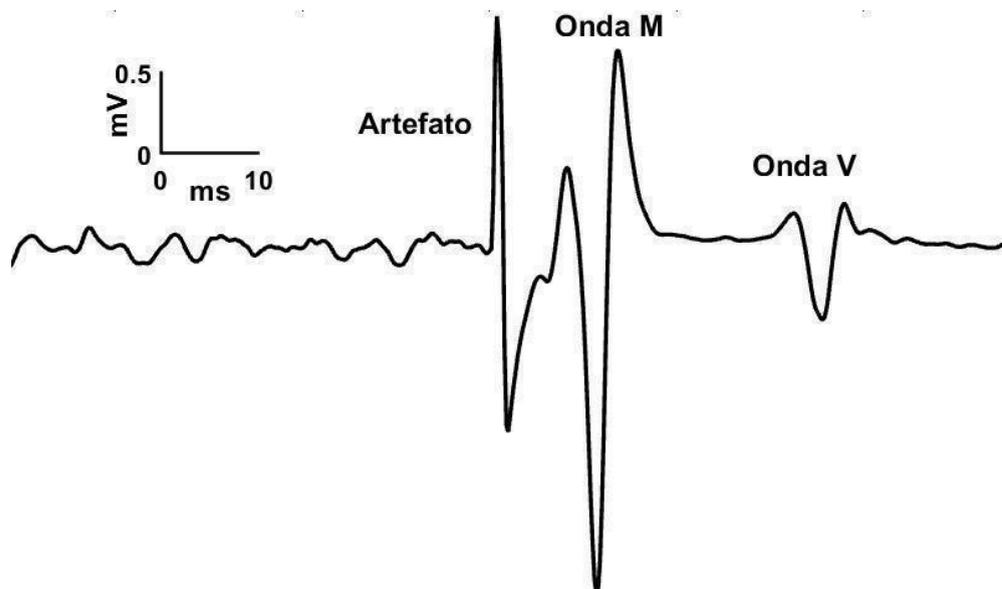
#### **1.4. ONDA V**

Além da IPS, o presente estudo busca avaliar a excitabilidade da via descendente utilizando um procedimento eletrofisiológico semelhante para obtenção do reflexo H. O reflexo H foi avaliado em repouso, portanto, alterações em vias inibitórias poderiam não ser manifestadas na amplitude reflexa por não haver uma atividade motora. Neste contexto, passa a ser interessante investigar a amplitude do

reflexo H durante a contração voluntária. Contudo, durante a contração voluntária máxima (e aplicando uma intensidade de estimulação supra-máxima) o reflexo H obtido passa a se denominar onda V (Aagard et al, 2002).

A hipótese para a utilização deste protocolo é que as aferentes do FIB podem estar sendo mais ativadas que as aferentes do tibial, alterando seletivamente as propriedades biofísicas da membrana das aferentes do FIB, implicando em alterações na IPS. Um fenômeno adicional poderia envolver alterações na transmissão das sinapses das aferentes do FIB com interneurônios que intermediam o fluxo de informação da periferia para os centros superiores (p.ex., trato espinocerebelar). Como postulado por Bolzoni et al. (2017): “*DC could be applied either to compensate an altered peripheral excitability or to modulate the afferent transmission to spinal and supraspinal structures*”. Ou seja, este fluxo de informação pode, por sua vez, alterar processos mais rostrais e talvez a excitabilidade de vias descendentes, conseqüentemente alterando a amplitude da onda V (Figura 10).

Na CR, altas intensidades de eletroestimulação promovem o desaparecimento do reflexo H no registro de EMG devido ao fenômeno de aniquilação. Porém, ao realizar uma contração isométrica voluntária máxima (CIVM), os PAs de origem descendente colidem com os potenciais de origem antidrômica nas vias eferentes do nervo misto que foi estimulado. Com isso, os PAs que trafegam pelos axônios aferentes eletroestimulados (ou seja, de origem reflexa), têm “passagem livre” para ativar uma população de MNs dado que já houve colisão de entre os PAs de origem descendente com os PAs antidrômicos nas eferentes. A despolarização desses MNs que sofreram colisão (PAs do comando descendente e os PAs antidrômicos), irá gerar uma resposta reflexa no músculo denominada de onda V, que mede justamente a excitabilidade da via descendente. Por exemplo, quanto maior e mais intenso for o comando descendente, maior será a colisão, portanto, maior será o recrutamento reflexo dos MNs. Conseqüentemente, a amplitude da onda V fica maior. (Aagard et al, 2002).



**Figura 10.** Registro dos sinais EMG do SO após estimulação elétrica supramáxima do nervo tibial (150% da intensidade necessária para se evocar uma onda Mmax) durante CIVM dos flexores plantares do tornozelo. A onda Mmax surge logo após o artefato, como consequência da estimulação de 100% dos axônios motores, e a onda V surge em cerca de 30 ms. Registro coletado no LACOMOT e não publicado.

## 1.5. MOTIVAÇÃO E HIPÓTESE DO ESTUDO

Bolzoni et al. (2017) revelaram que a ECC anódica aplicada no membro inferior gerou uma inibição no reflexo H e sugeriram algumas hipóteses para explicar o fenômeno (alterações dos níveis de mielinização que acompanham variações no alinhamento das fibras, mudanças nas proteínas reguladoras dos canais de sódio e potássio, alterações na excitabilidade motoneuronal, etc). Nenhuma destas hipóteses foi testada diretamente no trabalho dos autores (Bolzoni et al., 2017).

Como a IPS é um mecanismo de modulação reflexa e plasticidade medular relativamente comum, acreditamos que seja necessário conduzir uma investigação desta via inibitória. Portanto, a hipótese do presente estudo é que a ECC anódica altere a excitabilidade de uma via inibitória responsável pela modulação do reflexo de estiramento muscular. Ou seja, considerando que a ECC transcutânea altera de maneira indiscriminada as propriedades biofísicas dos axônios motores e sensoriais (Bolzoni et al., 2017), as aferentes do músculo antagonista poderiam também ser afetadas resultando em uma alteração na excitabilidade da via da IPS. Se isto for verdade, será possível observar alterações no nível de IPS durante, e talvez após, a ECC.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da ECC no membro inferior sobre a excitabilidade reflexa e possíveis mecanismos de modulação.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos inibitórios da ECC anódica sobre a amplitude da onda V;
- Verificar se os efeitos inibitórios da ECC anódica sobre o reflexo H e onda V não se devem a um efeito placebo (protocolo SHAM);
- Identificar possíveis alterações nos parâmetros relativos à curva de recrutamento do reflexo H (Hslp/Mslp, Hlim, H50, H100 e seus respectivos valores de corrente) durante e após a ECC;
- Investigar se a ECC altera o nível de um mecanismo de modulação da excitabilidade reflexa, a IPS, por meio de dois protocolos distintos: paradigma C-T e *threshold tracking*.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. AMOSTRA

Para a realização deste estudo, foram recrutados 11 voluntários saudáveis, sendo 9 homens e duas mulheres ( $24,36 \pm 1,86$  anos) sem histórico de doenças neurológicas ou ortopédicas, que não fizessem uso de substâncias que interferiam no SNC e, para as mulheres, que tivessem ciclo menstrual regulado (Hoffman et al., 2018). Os participantes foram recrutados por meio de convites verbais na própria instituição onde o estudo foi realizado e divulgado nas redes sociais.

Os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (FS/UnB) (CAAE: 39794820.9.0000.0030).

As coletas foram realizadas no Laboratório de Processamento de Sinais Biológicos e Controle Motor localizado na Faculdade de Educação Física da Universidade de Brasília (FEF/UnB).

### 3.2. INSTRUMENTAÇÃO

O sistema de captação de sinais eletrofisiológicos e estimulação elétrica utilizado chama-se Neuropack X1 MEB 2300 (Nihon-Kohden, Japão). Este equipamento possui resolução de 18 bits, amplificadores de 12 canais e quatro canais de estimulação (figura 11). A taxa de amostragem foi de 5kHz, com um filtro passa banda de 10Hz à 1kHz.

O aparelho de estimulação de corrente contínua foi o Soterix Medical 1x1 (Soterix Medical, New York) com 2 esponjas 5x7cm que cobrem os eletrodos de estimulação (Figura 12). A intensidade da corrente foi de 2mA, com duração de 20 minutos de estimulação anódica.



**Figura 11.** Neuropack X1 MEB 2300.



**Figura 12.** Soterix Medical 1x1.

### 3.3. PREPARO DO PARTICIPANTE

Ao chegar no laboratório, o pesquisador preparou a pele do voluntário nos seguintes pontos: processo estilóide do rádio direito, fossa poplíteia da perna direita, 5 cm acima da fossa poplíteia direita, 5 cm acima da patela direita, um raio de 2 cm ao redor da cabeça da fíbula e no ventre dos músculos SO e fibular longo. Esta preparação foi feita com algodão e álcool, realizando uma abrasão na pele para diminuir a impedância entre a pele e o eletrodo (abaixo de  $10M\Omega$ ).

Após a limpeza, foram posicionados eletrodos de captação bipolares (1 cm de diâmetro) 4 cm abaixo do encontro das duas cabeças do gastrocnêmio, acima da aponeurose do músculo SO, mantendo 2 cm de distância entre eles (Zehr et al., 1998). Os mesmos eletrodos de captação foram utilizados no ventre do músculo fibular longo com distância de 2 cm entre eles. Um eletrodo de aterramento (3 cm de diâmetro) foi posicionado sobre o processo estilóide do rádio direito. Um eletrodo de estimulação de corrente contínua (4X4 cm, Soterix Medical, New York) anódico foi posicionado logo acima da fossa poplíteia direita e catódico acima da patela direita (Bolzoni et al., 2017) (Figura 3). Por fim, o voluntário sentou-se em uma posição confortável em um suporte confeccionado especialmente para experimentos com reflexo H com o quadril a  $110^\circ$ , joelhos a  $110^\circ$  e tornozelos a  $90^\circ$  para o

posicionamento do eletrodo de estimulação bipolar na fossa poplíteia e ao redor da cabeça da fíbula (figuras 13 e 14).



**Figura 13.** Suporte instrumentalizado para experimentos com reflexo H.



**Figura 14. Voluntário durante o teste.** Locais de fixação dos eletrodos de ECC (fita azul). Os eletrodos de estimulação para se evocar o reflexo H foram fixados pela fita de velcro cinza envolvendo a fossa poplíteia. Estimulação cutânea do FIB representado pela fita que cruza a cabeça da fíbula e perna. Eletrodo terra posicionado no punho sobre o processo estilóide.

### 3.4. AQUISIÇÃO DO REFLEXO H E ONDA M

A resposta reflexa foi evocada por estímulos elétricos aplicados no nervo tibial por meio dos eletrodos (conectados ao sistema MEB 2300) localizados na fossa poplíteia. Pelo monitoramento do eletromiograma, foi possível encontrar o melhor posicionamento do eletrodo de estimulação, ou seja, o local onde o reflexo H é evocado sem a presença de onda M e com a menor corrente (intensidade de estímulo).

Ao posicionar o eletrodo, obteve-se a amplitude mínima ( $H_{limiar}$ ) e máxima ( $H_{max}$ ) do H e amplitude máxima da M ( $M_{max}$ ). Isto foi feito por meio de incrementos de intensidade de estímulo e anotando quais intensidades geraram o  $H_{limiar}$ , o  $H_{max}$  e a  $M_{max}$  nas situações antes da ECC (PRE), durante ECC (DUR) e após ECC (POS).

Foi então obtida a intensidade necessária para gerar uma amplitude de reflexo H referente a 50% do Hmax (Bolzoni et al., 2017). Foram evocadas 60 respostas com intervalos de 5 segundos entre elas nos momentos: antes (Hpre), durante (Hdur) e imediatamente após (Hpos) a ECC anódica, sendo que o Hdur é a resposta do reflexo condicionado pela estimulação do FIB. Portanto, o teste foi dividido em três partes, com 20 estímulos cada: 1) reflexo H controle; 2) reflexo H utilizando técnica C-T; 3) reflexo H utilizando a técnica de threshold tracking, na qual o pesquisador foi modificando a intensidade de estímulo para manter uma resposta H condicionada de amplitude semelhante à resposta H controle. Para análise, no primeiro e no último bloco de 20 estímulos, as 5 primeiras respostas foram descartadas pois o avaliador as utilizava para ajustar a amplitude do reflexo H referente a 50% do Hmax. Além disso, foi adquirida a CR nas situações Hpre, Hpos e Hdur.

A obtenção da CR foi realizada em três momentos: antes, durante e após estimulação (anódica ou SHAM). O intervalo entre os valores de corrente limiar do reflexo H e os associados à Hmax foi dividido em 11 intensidades de estimulação de igual espaçamento para obtenção da alça ascendente da CR. Como o reflexo H varia mesmo mantendo a intensidade constante, para cada uma das 11 intensidades foram aplicados 5 estímulos com intervalos aleatórios (entre 5 e 7 segundos), permitindo obter a média do reflexo H. Foram obtidos dois pontos para cada intensidade da fase descendente da CR até obter a onda Mmax (com estimulação supramáxima). Com este método foi possível identificar as variáveis Hlim, H50 e H100. Além disso, mapear as intensidades de corrente necessárias para se evocar o Hlim (Cor\_Hlim), H50 (Cor\_H50), Cor\_H100)

### **3.5. ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE ELÉTRICA CONTÍNUA**

O estímulo condicionante ECC consiste na aplicação de 20 minutos de corrente elétrica com 2 mA, com a intensidade de corrente aumentando progressivamente de 0,3 a 2 mA ao longo de 20 segundos, e se mantendo em 2 mA por 20 minutos (REAL). O estímulo placebo (SHAM) consiste em 40 segundos de estimulação, com a corrente aumentando progressivamente de 0,3 a 2 mA por 20 segundos e depois diminuindo de 2 mA a 0 mA por mais 20 segundos, se mantendo em 0 mA por 20 minutos a fim de induzir o efeito placebo (vide seção 1.1).

### 3.6. PARADIGMA C-T

O estímulo do FIB foi aplicado com um pulso único de 1 ms de duração com intensidade referente a 1,5 vezes o limiar motor. Este é definido como a menor intensidade necessária para se provocar uma resposta direta (onda M) no músculo tibial anterior. O intervalo C-T para os estímulos foi de 100 ms (Suzuki et al., 2014) nas duas condições de ECC: REAL e SHAM.

### 3.7. PROTOCOLO DE *THRESHOLD TRACKING* (THTR)

A primeira parte do protocolo de 60 respostas era a aquisição de 20 respostas H controle. A segunda parte condiz com a coleta de 20 respostas H sob influência inibitória causada pelo estímulo condicionante no FIB; Durante a terceira parte (vide seção 3.4), ou seja, da resposta 41 à 60, o voluntário continuava recebendo estímulos no FIB enquanto o avaliador modificava a intensidade de corrente elétrica para atingir um reflexo H condicionado de amplitude semelhante a do reflexo H controle. Para análise, as 5 primeiras respostas de cada protocolo de 20 respostas eram descartadas. Com este método, é possível mensurar a alteração de corrente (Cor\_THTR) necessária para obter um reflexo H com 50% do Hmax

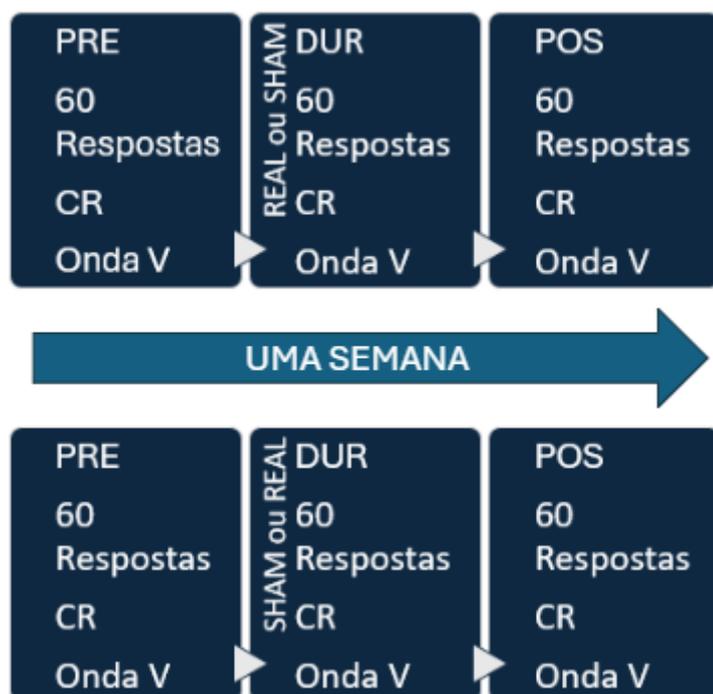
### 3.8. PROTOCOLO DE ONDA V

A onda V foi evocada após a definição da intensidade de corrente elétrica necessária para se evocar a onda Mmax. Utilizou-se 150% deste valor de corrente para estimular o nervo tibial durante uma CVM do indivíduo avaliado (Aagaard et al, 2002; Vila-Chã et al, 2012). O procedimento foi repetido três vezes com intervalos de 5 minutos entre as tentativas para a obtenção da maior amplitude de onda V.

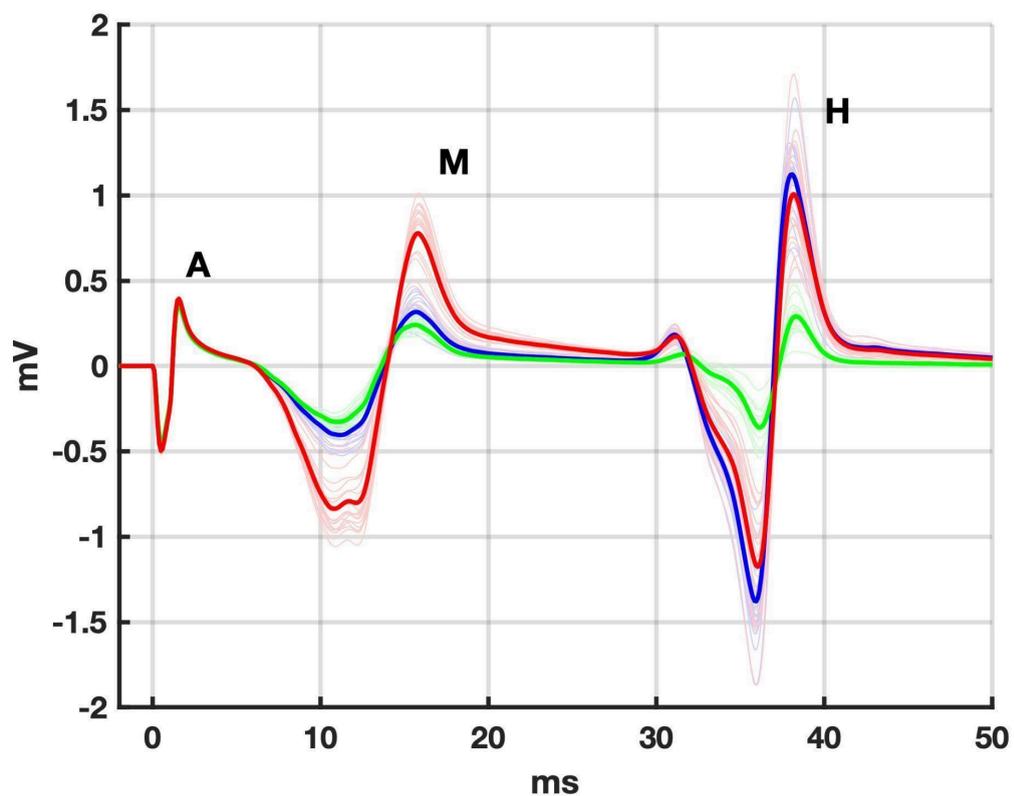
Foi solicitado que os voluntários realizassem uma CVM dos flexores plantares durante 7 segundos. Ao atingir uma força pico constante (3 segundos no mesmo valor), o estímulo na fossa poplíteia era aplicado e registrava-se a onda V. Para auxiliar o participante, um monitor com o programa Labview foi alocado em frente ao suporte onde ele estava sentado proporcionando um *feedback* visual da força exercida. Sempre era realizada uma tentativa de teste para o avaliador marcar o valor da CVM máxima na tela e o voluntário saber seu nível de força alvo.

### 3.9. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

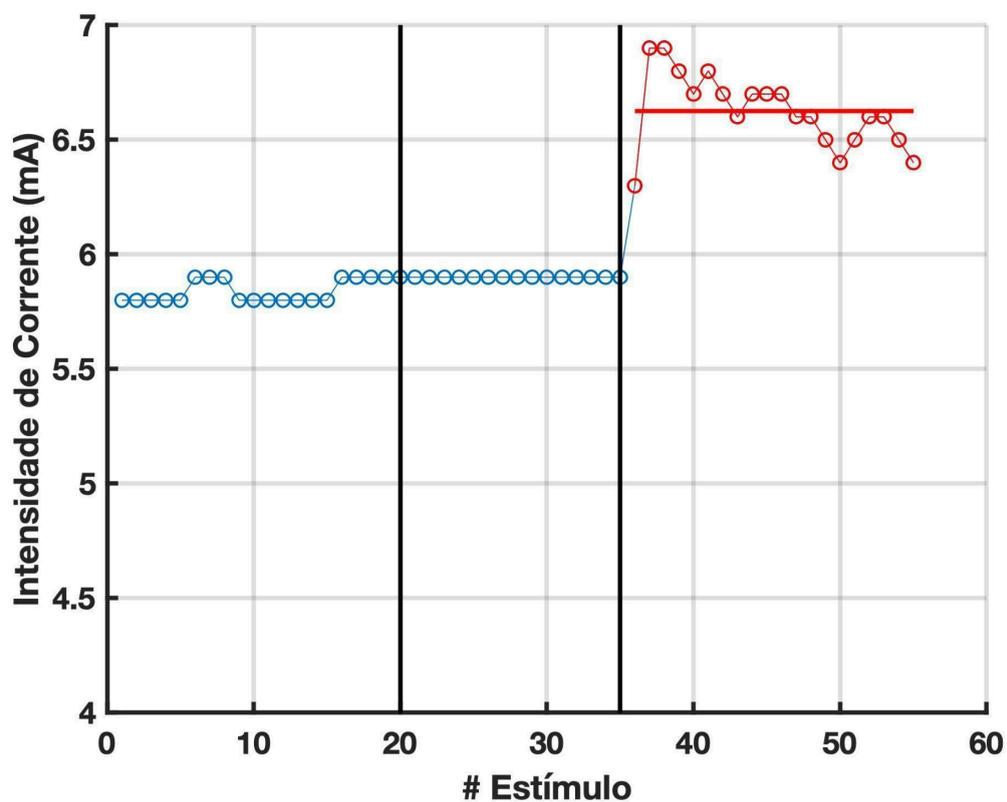
Os voluntários compareceram ao laboratório em 2 visitas, com um intervalo de 1 semana entre elas (Figura 15). Na primeira visita, assinaram o TCLE para iniciar a pesquisa. Todos os dias foram feitas as medidas do reflexo H antes, durante estimulação de corrente contínua e/ou cutânea (para obter 20 respostas controle, 20 respostas utilizando técnica C-T e 20 respostas utilizando a técnica de threshold trackin durante a ECC) (figuras 16, 17 e 18). A curva de recrutamento foi obtida logo após a aquisição das 60 respostas; O protocolo de onda V se iniciou imediatamente após a curva de recrutamento. Para cada visita foram testadas as seguintes condições apresentadas na figura 15:



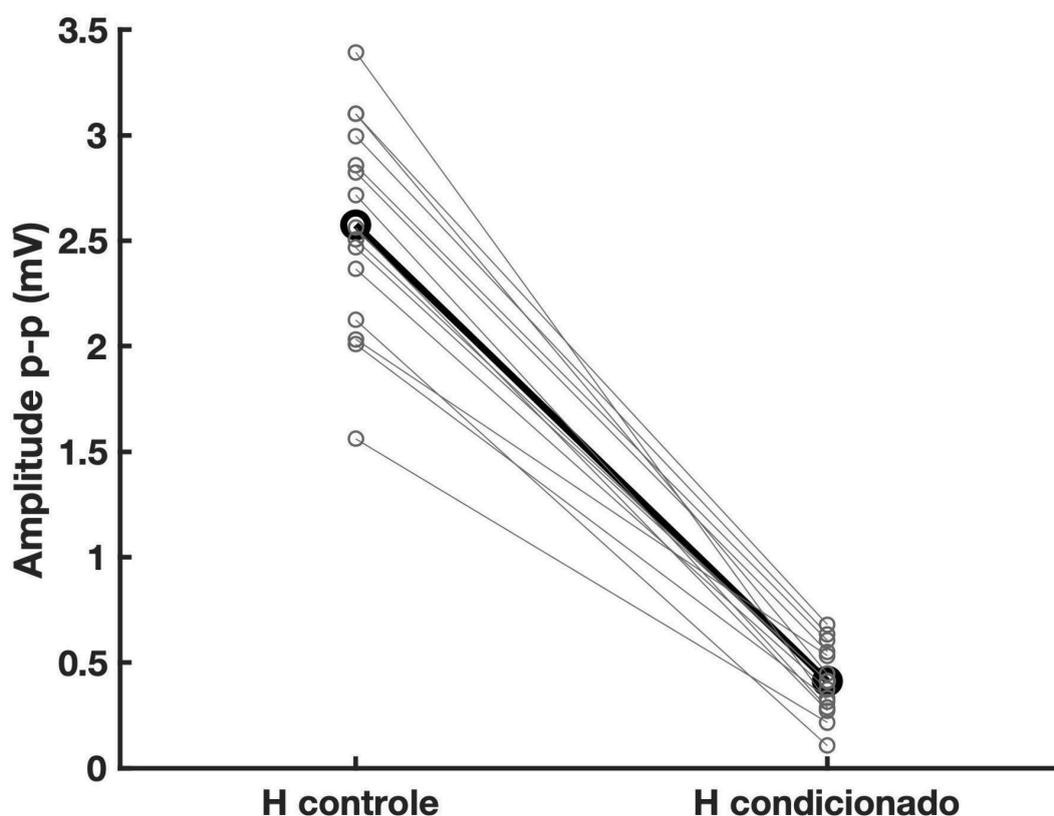
**Figura 15. Desenho experimental das coletas.** Cada voluntário visitou o laboratório duas vezes, com o mesmo protocolo, sendo que a única diferença entre os dias era o tipo de estimulação aplicada no momento DUR. Durante o PRE, o protocolo era coletar 60 respostas (20 Controle/20 C-T/ 20 THTR), realizar uma curva de recrutamento e três aquisições de onda V; Durante o DUR, o protocolo era semelhante ao PRE, mas o aparelho de ECC era montado no voluntário e aplicava-se a estimulação por corrente contínua, ou seja, durante as 60 respostas (ECC anódica (REAL) ou SHAM + 20 Controle/20 C-T/20 THTR), realizar uma curva de recrutamento e três aquisições de onda V; No POS, o aparelho de estimulação por corrente contínua era removido e o protocolo era idêntico ao do PRE.



**Figura 16. EMGs do músculo SO com o artefato de estímulo (A), onda M (M) e reflexo H (H).** Cada registro com traçado mais espesso representa uma média síncrona (promediação) dos 15 traçados mais finos. O traçado em azul é o reflexo H controle, o traçado verde é o reflexo H condicionado, e o traçado vermelho é o reflexo condicionado evocado com maior estimulação.



**Figura 17.** Intensidades de corrente para evocar a resposta controle (primeiros 20 estímulos), seguidas das intensidades de corrente para se evocar as respostas condicionadas (15 estímulos) e, por último, os estímulos necessários para se evocar um reflexo H condicionado com amplitude igual a do controle (20 últimos estímulos). O traçado horizontal em vermelho representa a média das quinze últimas respostas.



**Figura 18.** Valores de amplitude pico-a-pico (p-p) do reflexo H controle e condicionado pelo estímulo no FIB. Dados obtidos a partir dos registros apresentados na figura 16. Os círculos maiores conectados com a linha mais espessa representam a média das 15 medidas em cada situação (controle e condicionada). Houve diferença significativa entre os valores de amplitude ( $p < 0,05$ ).

### 3.10. PROCESSAMENTO DE SINAIS

Os valores de amplitude pico a pico do reflexo H e da onda M foram calculados por meio de uma rotina escrita em ambiente Matlab (versão 7.0, MathWorks, Inc.). Em seguida, foi elaborada a CR. Os valores de amplitude e de corrente foram normalizados, respectivamente, pela onda Mmax e pela corrente necessária para se evocar uma onda M com amplitude equivalente a 50% da Mmax em cada situação experimental (PRE, DUR e POS a ECC com e sem condicionamento). Os parâmetros associados à alça ascendente da CR do reflexo H foram estimados por meio de um ajuste sigmoidal para cada participante como descrito detalhadamente por Klismstra e Zehr (2008) de acordo com a equação Eq 1:

Eq 1:

$$H(s) = \frac{H_{max}}{1 + e^{-m(s-s_{50})}}$$

Em que Hmax é a resposta H máxima (limite superior da curva), “m” é o coeficiente da curva estimado utilizando a técnica dos mínimos quadrados iterativos (função *nlinfit* do Matlab),  $s_{50}$  é a intensidade de estímulo necessária para se evocar 50% do Hmax, e H(s) é a amplitude reflexa para um determinado estímulo.

Após os ajustes sigmoidais, as variáveis Hlimiar, H50 e H100 foram obtidas correspondentes à situação pré-estimulação e comparadas aos parâmetros das curvas durante e pós-estimulação. Os parâmetros obtidos das curvas durante e após são indicados com um “@”, ou seja, o valor da amplitude “na” (ou “at” em inglês) corrente que gerou o reflexo H ou onda M em cada situação. Desta forma, tem-se as comparações: Hlimiar x H@limiar (durante e pós); H50 x H@50 (durante e pós); H100 x H@100 (durante e pós) (figura 19). A inclinação das curvas do reflexo H (Hslp) e da onda M (Mslp) foi calculada usando as equações 2 e 3:

Eq 2:

$$Hslp = m \frac{H_{max}}{4}$$

Eq 3:

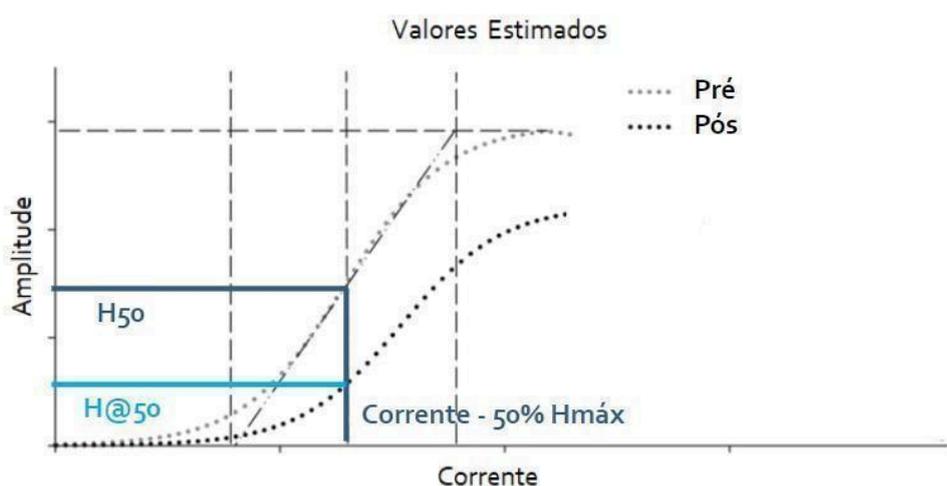
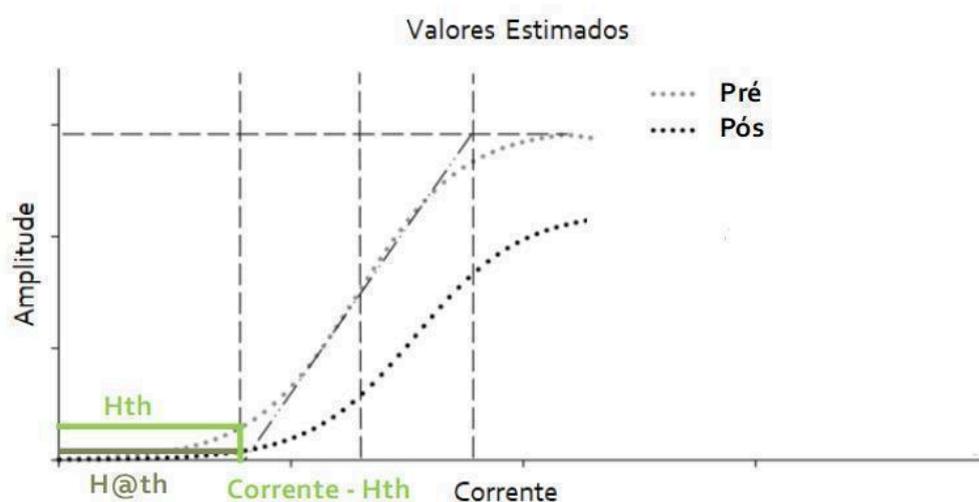
$$Mslp = m \frac{M_{max}}{4}$$

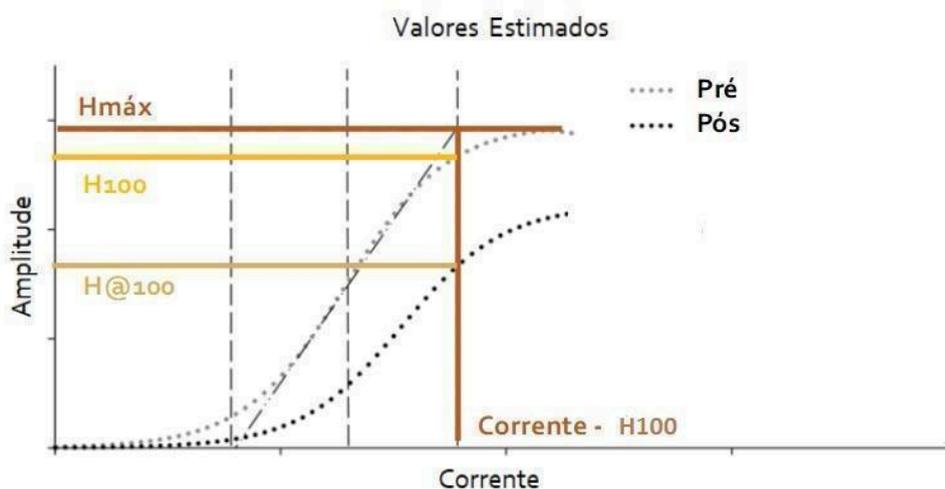
O grau de inibição pré-sináptica (GIPS) em porcentagem foi obtido a partir da subtração das amplitudes do reflexo H (normalizadas pela Mmax) calculadas como valores pico-a-pico dos reflexos H controle (Hcont), e dos valores dos reflexos H condicionados (Hcond) divididos pelo reflexo H controle, segundo a equação 4 (Eq 4):

Eq 4:

$$GIPS = \frac{H_{cont} - H_{cond}}{H_{cont}} \times 100$$

As três ondas V decorrentes da eletroestimulação do nervo tibial durante a CIVM tiveram suas amplitudes pico-a-pico mensuradas. Optou-se pelo maior valor para se atribuir como onda V máxima registrada no SO. As eletroestimulações também produziram ondas Mmax, que tiveram suas amplitudes mensuradas. Com o conhecimento de ambos os valores, a razão  $V_{max}/M_{max}$  foi a variável utilizada para o teste estatístico associada à excitabilidade do comando descendente.





**Figura 19.** Comparação das variáveis  $H_{lim}$  (representado por  $H_{th}$ ) e  $H_{@lim}$  (representado por  $H_{@th}$ ) nos momentos antes e após uma intervenção;  $H_{50}$  e  $H_{@50}$  nos momentos antes e após uma intervenção;  $H_{100}$  e  $H_{@100}$  nos momentos antes e após uma intervenção; Note que todos possuem as respectivas correntes (corrente limiar para o  $H_{lim}$ , corrente a 50% do  $H_{max}$  para o  $H_{50}$  e corrente 100% para o  $H_{100}$ ) para serem evocados. Modificado de Klimstra & Zehr (2008).

### 3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar os dados, foi utilizado o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*, EUA). As variáveis dependentes foram:  $H_{slp}/M_{slp}$ ;  $H_{lim}$ ;  $H_{@lim}$ ;  $H_{50}$ ;  $H_{@50}$ ;  $H_{100}$ ;  $H_{@100}$ ;  $H_{max}/M_{max}$ ;  $Cor_{H_{lim}}$ ;  $Cor_{H_{50}}$ ;  $Cor_{H_{100}}$ ; GIPS (grau de inibição pré-sináptica); THTR (corrente utilizada para rastreo da resposta H); onda V e Onda M. Estas foram aplicadas às 2 condições do teste REAL e SHAM. Os parâmetros @ correspondem aos momentos DUR e POS.

Inicialmente, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. Os dados se constatarem como normais, sendo aplicada uma ANOVA de uma via de medidas repetidas para detectar diferenças entre os momentos PRE X DUR X POS (Bolzoni *et al.* 2017). O teste post hoc LSD foi utilizado para detectar diferenças entre os momentos. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PROTOCOLO DE CURVA DE RECRUTAMENTO

Os resultados das ANOVAs são expressos nas tabelas 1 e 2. A Tabela 1 apresenta os parâmetros H Limiar, H 50, H 100, HMax, Mmax e Slope H/M nas condições REAL e SHAM em três momentos: antes da estimulação com corrente elétrica contínua (PRE), durante estimulação com corrente elétrica contínua (DUR) e após estimulação com corrente elétrica contínua (POS). A tabela 2 apresenta os valores de corrente utilizados para evocar os parâmetros publicados na tabela 1. Estes valores de corrente foram divididos em Cor\_Hlim, Corr\_H50 e Corr\_H100.

#### 4.1.1. ECC REAL (PARÂMETROS DA CURVA)

Não houve diferenças significativas entre os momentos para o parâmetro Hlim ( $F_{2,20}=0,304$ ,  $p=0,741$ ). PRE comparado ao Hlim DUR ( $p= 0.666$ ). Entre Hlim PRE comparado ao Hlim POS ( $p= 0.489$ ). Ou entre Hlim DUR comparado ao Hlim POS ( $p= 0.727$ ) (Figura 20).

Quando comparado o parâmetro H50, não houve diferença entre os momentos ( $F_{2,20}=0,079$ ,  $p=0,924$ ). Entre H50 PRE e H50 DUR ( $p= 0.744$ ). Entre H50 PRE e H50 POS ( $p= 0.725$ ). E também entre H50 DUR e H50 POS ( $p= 0.995$ ) (Figura 21).

Sobre o parâmetro H100, a diferença não foi significativa entre os momentos ( $F_{2,20}=1,120$ ,  $p=0,346$ ). Entre H100 PRE e H100 DUR ( $p= 0.367$ ). Entre H100 PRE e H100 POS ( $p= 0.189$ ). Além dos momentos H100 DUR e H100 POS ( $p= 0.596$ ) (Figura 22).

Em relação ao Hmax, não houve diferença entre os momentos ( $F_{2,20}=1,075$ ,  $p=0,360$ ). PRE comparada ao DUR ( $p= 0.532$ ). Entre PRE comparada ao POS ( $p= 0.254$ ). E entre DUR comparado ao POS ( $p= 0.254$ ) (Figura 23).

A respeito do parâmetro Mmax, não houve diferenças quando comparados os momentos ( $F_{2,20}=0,049$ ,  $p=0,952$ ). Entre PRE e DUR ( $p= 0.833$ ). Entre PRE e POS ( $p= 0.826$ ). E entre DUR e POS ( $p= 0.944$ ).

Ao comparar a variável Hslp/Mslp, não houve diferenças entre os momentos ( $F_{2,20}=0,485$ ,  $p=0,623$ ). PRE comparado a DUR ( $p= 0.665$ ). Entre PRE e POS ( $p= 0.600$ ). Além dos momentos DUR e POS ( $p= 0.342$ ) (Figura 24).

#### 4.1.2. ECC SHAM (PARÂMETROS DA CURVA)

Em relação ao parâmetro Hlim, não houve diferenças significativas quando comparados os momentos ( $F_{2,20}=0,559$ ,  $p=0,580$ ). Entre PRE e DUR ( $p= 0.353$ ). Entre PRE e POS ( $p= 0.356$ ). E entre DUR e POS ( $p= 0.795$ ) (Figura 20).

Sobre o parâmetro H50, a diferença não foi significativa entre os momentos ( $F_{2,20}=0,190$ ,  $p=0,828$ ). Entre H50 PRE e H50 DUR ( $p= 0.728$ ). Entre H50 PRE e H50 POS ( $0.804$ ). Além dos momentos H50 DUR e H50 POS ( $0.572$ ) (Figura 21).

Não houve diferenças significativas entre os momentos para o parâmetro H100 ( $F_{2,20}=1,770$ ,  $p=0,196$ ). PRE comparado ao H100 DUR ( $p= 0.163$ ). Entre H100 PRE comparado ao H100 POS ( $p= 0.869$ ). Ou entre H100 DUR comparado ao H100 POS ( $p= 0.085$ ) (Figura 22).

Ao comparar a variável Hmax, não houve diferenças entre os momentos ( $F_{2,20}=1,406$ ,  $p=0,268$ ). PRE comparado a DUR ( $p= 0.411$ ). Entre PRE e POS ( $p= 0.476$ ). Além dos momentos DUR e POS ( $p= 0.084$ ) (Figura 23).

A respeito do Mmax, não houve diferenças entre os momentos ( $F_{2,20}=1,148$ ,  $p=0,337$ ). PRE comparada ao DUR ( $p= 0.214$ ). Entre PRE comparada ao POS ( $p= 0.456$ ). E entre DUR comparado ao POS ( $p= 0.198$ ).

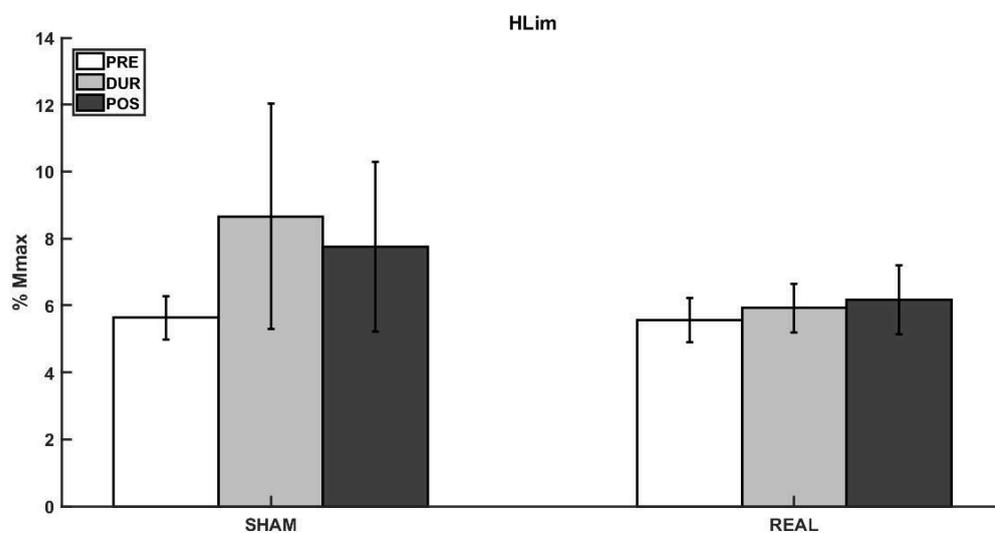
Quando comparado o Hslp/Mslp, não houve diferenças entre os momentos para este parâmetro ( $F_{2,20}=1,348$ ,  $p=0,282$ ). Entre os momentos PRE e DUR ( $p= 0.240$ ). Entre PRE e POS ( $p= 0.345$ ). E também entre DUR e POS ( $p= 0.118$ ).

A tabela 1 mostra os resultados da ANOVA de uma via utilizada para os parâmetros da curva nas condições REAL e SHAM.

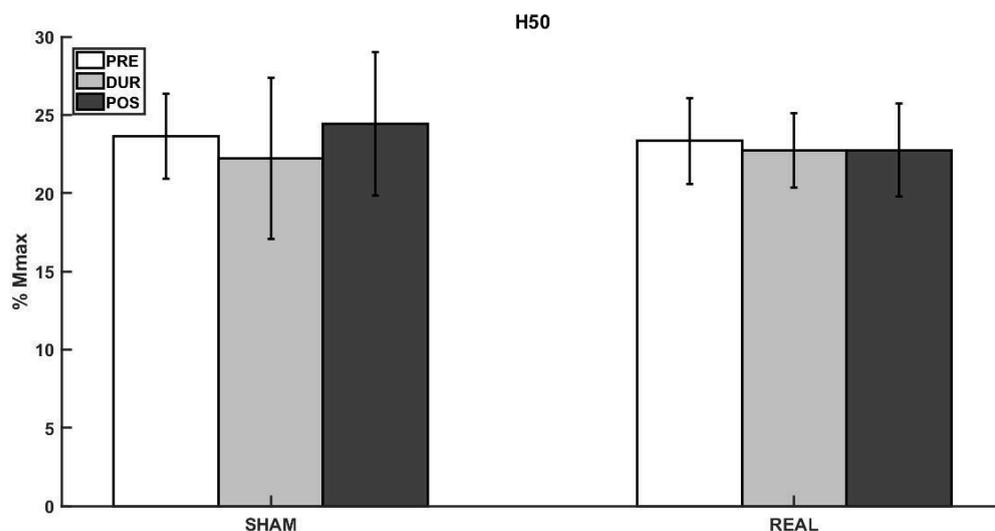
Tabela 1. Parâmetros da curva de recrutamento

<b>Parâmetros</b>	<b>N</b>	<b>Condição</b>	<b>Sig. PRE x DUR</b>	<b>Sig. PRE x POS</b>	<b>Sig. DUR x POS</b>
Hlim	11	REAL	0.666	0.489	0.727
		SHAM	0.353	0.356	0.795
H50	11	REAL	0.744	0.725	0.995
		SHAM	0.728	0.804	0.572
H100	11	REAL	0.367	0.189	0.596
		SHAM	0.163	0.869	0.085
Hmax	11	REAL	0.532	0.254	0.254
		SHAM	0.411	0.476	0.084
Mmax	11	REAL	0.833	0.826	0.944
		SHAM	0.214	0.456	0.198
Hslp/Mslp	11	REAL	0.665	0.600	0.342
		SHAM	0.240	0.345	0.118

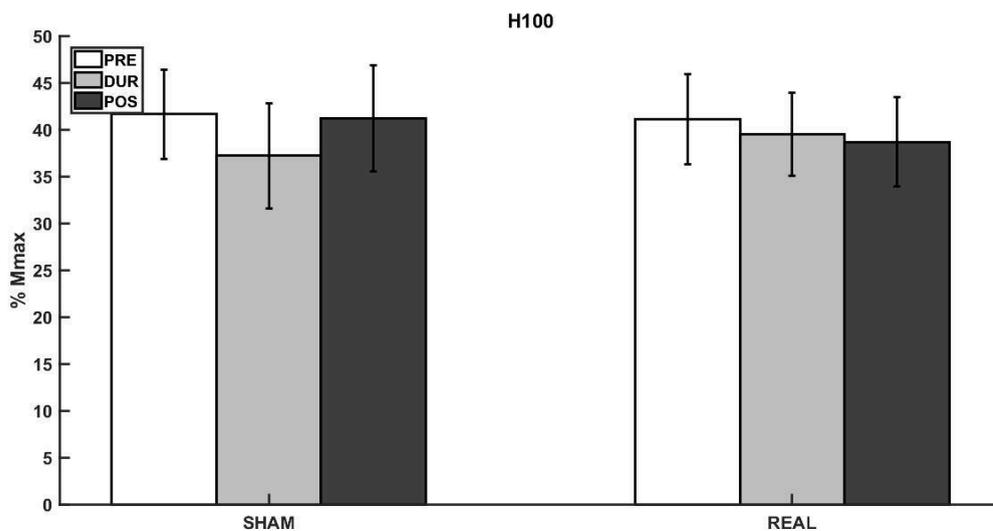
N: número de voluntários; sig.: valor de p após ANOVA de uma via; PRE: antes da estimulação com corrente elétrica contínua; DUR: durante estimulação com corrente elétrica contínua; POS: após estimulação com corrente elétrica contínua.



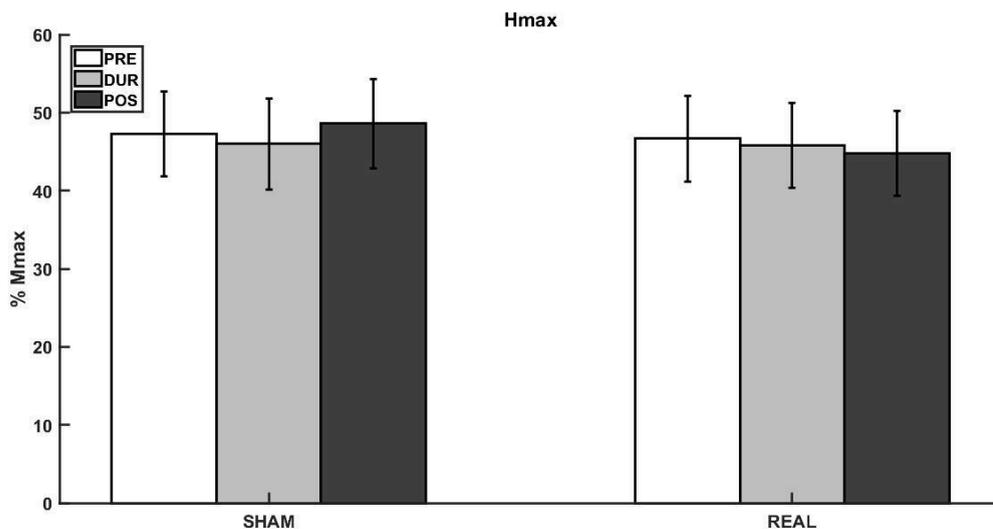
**Figura 20. Valores de H Limiar antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de H limiar de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados pela Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.



**Figura 21. Valores de H50 antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de H50 de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da onda Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.



**Figura 22. Valores de H100 antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de H100 de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da onda Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.



**Figura 23. Valores de H Máx antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de H Máx de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da onda Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

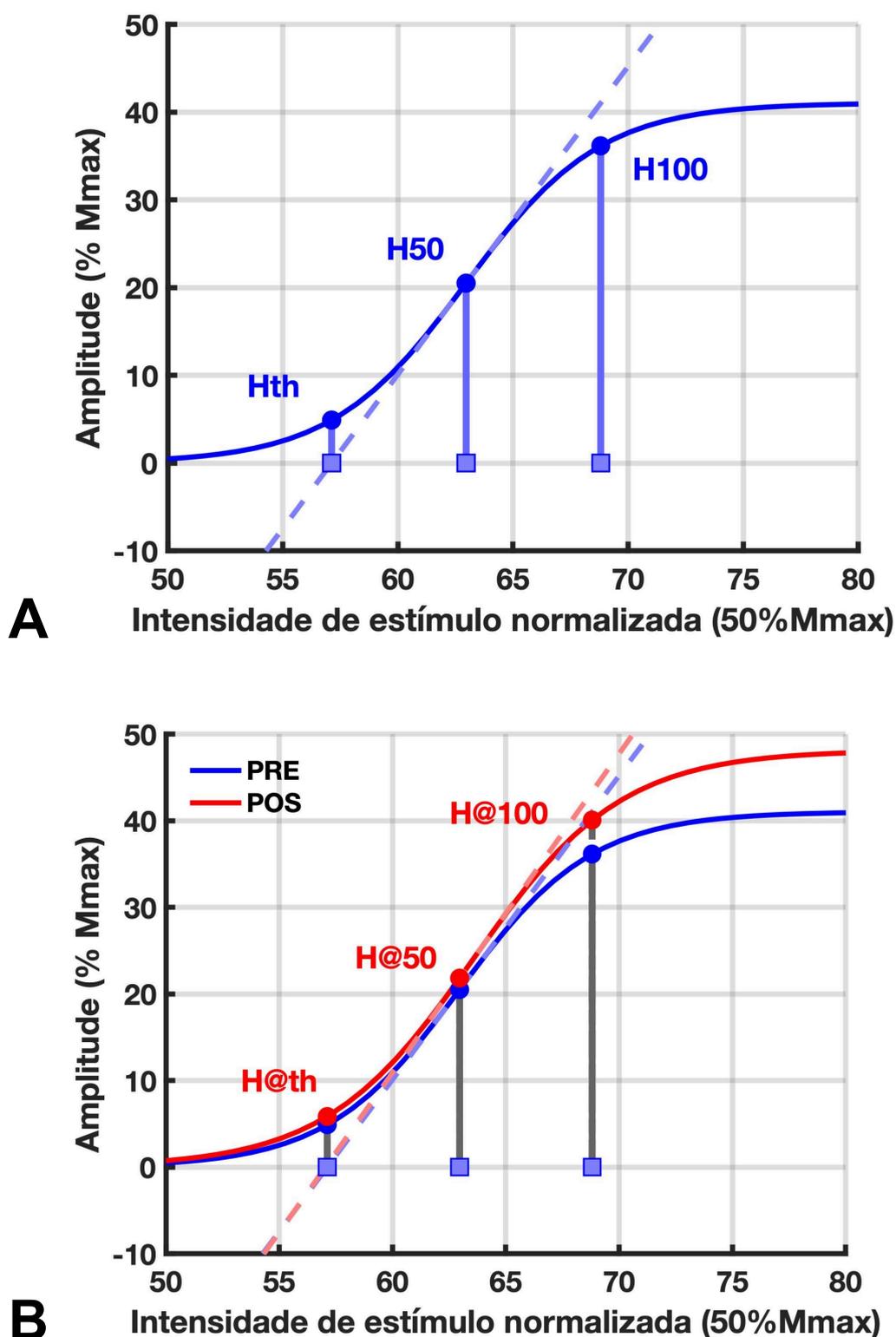


Figura 24. Curva de recrutamento de um participante PRE e POS estimulação por corrente elétrica contínua na situação REAL. A) Ajuste sigmoidal da CR do reflexo H na situação PRE. São apresentados os valores de Hth, H50 e H100 e suas respectivas correntes elétricas para comparação com o POS. B) CR do reflexo H antes (PRE, azul escuro) e depois (POS, vermelho) da ECC. Há três círculos vermelhos mostrando os parâmetros H@th, H@50 e H@100, encontrados na curva pós usando como referência a corrente normalizada (que são os quadrados da abscissa). As retas pontilhadas azul e vermelha condizem com o Hslp PRE e o Hslp POS, respectivamente.

#### 4.1.3. CONDIÇÃO REAL (CORRENTES)

Para a Cor\_Hlim ( $F_{2,20}=0,938$ ,  $p=0,408$ ), entre as situações PRE e DUR, não houve diferença significativa entre os momentos ( $p=0,287$ ). Entre PRE e POS também não ( $p=0,312$ ). Entre DUR e POS, o resultado foi semelhante ( $p=0,792$ ) (Figura 25).

Para a Cor\_H50, todas as comparações não resultaram em uma diferença significativa ( $F_{2,20}=0,484$ ,  $p=0,623$ ). Entre PRE e DUR ( $p=0,348$ ); Entre PRE e POS ( $p=0,570$ ); Entre DUR e POS ( $p=0,693$ ) (Figura 26).

Quando comparada a Cor\_H100 em diferentes momentos, o resultado foi semelhante às demais correntes por não apresentar valores significativos ( $F_{2,20}=0,300$ ,  $p=0,744$ ). PRE e DUR ( $p=0,628$ ). PRE e POS ( $p=0,679$ ). DUR e POS ( $p=0,543$ ) (Figura 27).

#### 4.1.4. CONDIÇÃO SHAM (CORRENTES)

A Cor\_Hlim ( $F_{2,20}=0,483$ ,  $p=0,624$ ) não apresentou diferenças significativas nos momentos PRE comparada com DUR ( $p=0,492$ ). PRE comparado com POS ( $p=0,882$ ). DUR comparado ao POS ( $p=0,386$ ) (Figura 25)

Ao utilizar a Cor\_H50, os valores de comparação entre as três situações não foram significativos ( $F_{2,20}=1,415$ ,  $p=0,266$ ). Entre PRE e DUR ( $p=0,195$ ); Entre PRE e POS ( $p=0,360$ ); Entre DUR e POS ( $p=0,359$ ). (Figura 26)

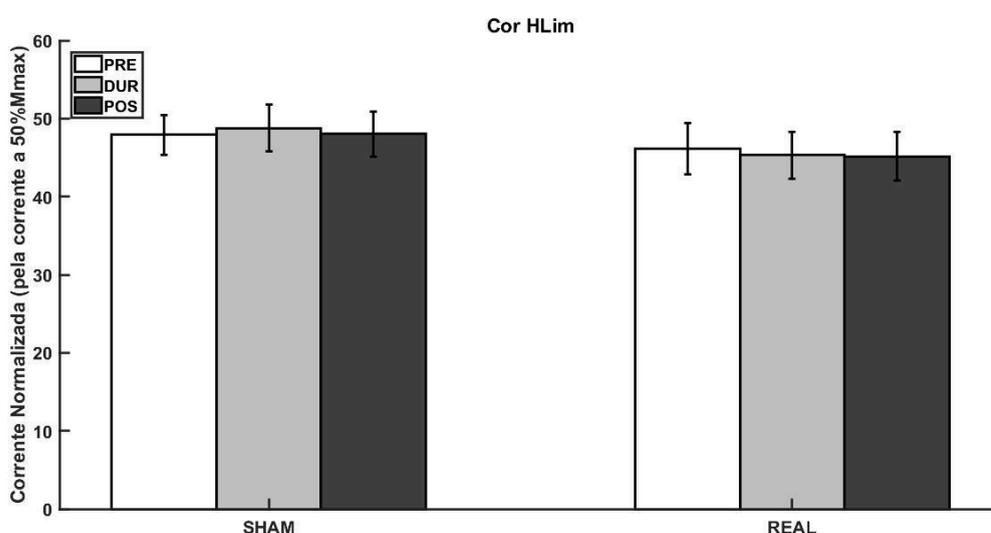
Os valores de Cor\_H100 ( $F_{2,20}=1,943$ ,  $p=0,169$ ) não foram significativos entre os momentos PRE e DUR ( $p=0,120$ ); Entre os momentos PRE e POS ( $p=0,255$ ); Ou entre DUR e POS ( $p=0,410$ ) (Figura 27).

A tabela 2 mostra os resultados da ANOVA de uma via para as correntes utilizadas nas condições REAL e SHAM.

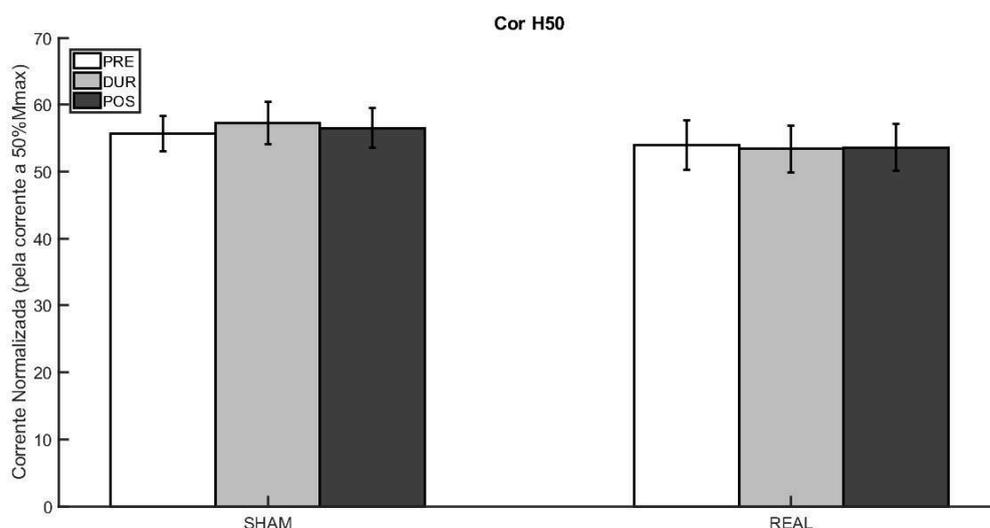
Tabela 2. Correntes utilizadas para obtenção dos parâmetros da curva de recrutamento.

Parâmetros	N	Condição	Sig.	Sig.	Sig.
			PRE x DUR	PRE x POS	DUR x POS
Cor_Hlim	11	REAL	0.287	0.312	0.792
		SHAM	0.492	0.882	0.386
Cor_H50	11	REAL	0.348	0.570	0.693
		SHAM	0.195	0.360	0.359
Cor_H100	11	REAL	0.628	0.679	0.543
		SHAM	0.120	0.255	0.410

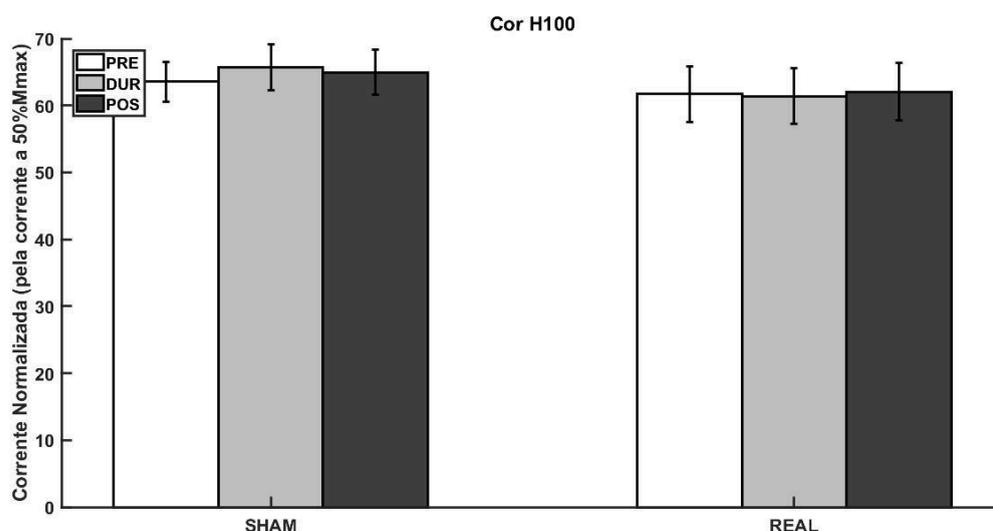
N: número de voluntários; sig.: valor de p após ANOVA de uma via; PRE: antes da estimulação com corrente elétrica contínua; DUR: durante estimulação com corrente elétrica contínua; POS: após estimulação com corrente elétrica contínua.



**Figura 25. Valores de Corrente H Limiar antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de corrente Hlim de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da corrente a 50% Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.



**Figura 26. Valores de Corrente H50 antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de corrente H50 de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da corrente a 50% Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.



**Figura 27. Valores de Corrente H100 antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de corrente H100 de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da corrente a 50% Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

#### 4.2. PROTOCOLO DE INIBIÇÃO PRÉ SINÁPTICA (IPS)

Os resultados das ANOVAs são expressos na tabela 3. O GIPS é referente a porcentagem de inibição aplicada ao reflexo H nas condições REAL e SHAM em três

momentos: antes da estimulação com corrente elétrica contínua (PRE), durante estimulação com corrente elétrica contínua (DUR) e após estimulação com corrente elétrica contínua (POS). A Cor\_THTR é referente à mudança de corrente ao utilizar a técnica de THTR para rastreamento da resposta H nos mesmos três momentos e condições da IPS. Os resultados percentuais de mudança da GIPS e da Cor\_THTR são expressos na tabela 4.

#### **4.2.1. CONDIÇÃO REAL (IPS E THTR)**

O GIPS não apresentou diferença significativa entre os momentos PRE e DUR ( $p=0.631$ ). Foi identificada diferença significativa entre os momentos PRE e POS ( $p=0.032$ ), com um aumento nos valores de GIPS na situação POS comparada à PRE (+21,48%) ( $F_{2,16}= 4,583$ ,  $p=0,27$ ). Não foi obtida diferença entre DUR e POS ( $p=0.060$ ) (Figura 28).

A Cor\_THTR não foi significativamente diferente quando comparado PRE e DUR ( $p=0.429$ ). Houve diferença significativa entre PRE e POS ( $p=0.038$ ), com um aumento da variação de corrente do POS comparado ao PRE (+65,16%) ( $F_{2,16}=5,191$ ,  $p=0,018$ ). Também foi significativa a comparação entre os momentos DUR e POS ( $p=0.039$ ), apresentando uma maior variação de corrente no POS comparado ao DUR (+46,23%) (Figura 29).

#### **4.2.2. CONDIÇÃO SHAM (IPS E THTR)**

Para o GIPS, não houve diferença significativa entre nenhuma das comparações ( $F_{2,16}=0,620$ ,  $p=0,550$ ). PRE e DUR ( $p=0.377$ ). PRE e POS ( $p=0.522$ ). DUR e POS ( $p=0.608$ ) (Figura 28).

Ao avaliar Cor\_THTR, a ANOVA não obteve resultados significativos em nenhuma das relações ( $F_{2,16}=0,652$ ,  $p=0,534$ ). PRE e DUR ( $p=0.480$ ). PRE e POS ( $p=0.399$ ). DUR e POS ( $p=0.578$ ) (Figura 29).

A tabela 3 mostra os resultados da ANOVA de uma via para o GIPS e Cor\_THTR nas condições REAL e SHAM.

Tabela 3. Protocolo de inibição pré sináptica e rastreo da resposta H (*threshold tracking*)

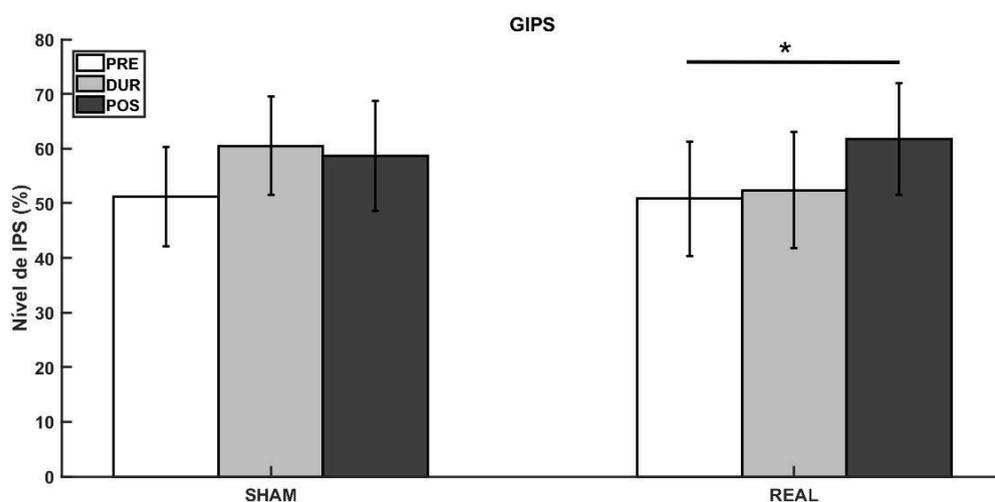
Parâmetro	N	Condição	Sig.	Sig.	Sig.
			PRE x DUR	PRE x POS	DUR x POS
GIPS	9	REAL	0.631	0.032*	0.060
		SHAM	0.377	0.522	0.608
Cor_THTR	9	REAL	0.429	0.038*	0.039*
		SHAM	0.480	0.399	0.578

N: número de voluntários; sig.: valor de p após ANOVA de uma via; PRE: antes da estimulação com corrente elétrica contínua; DUR: durante estimulação com corrente elétrica contínua; POS: após estimulação com corrente elétrica contínua; GIPS: Grau de Inibição Pré-Sináptica; *Threshold Tracking* ou rastreo da resposta H.

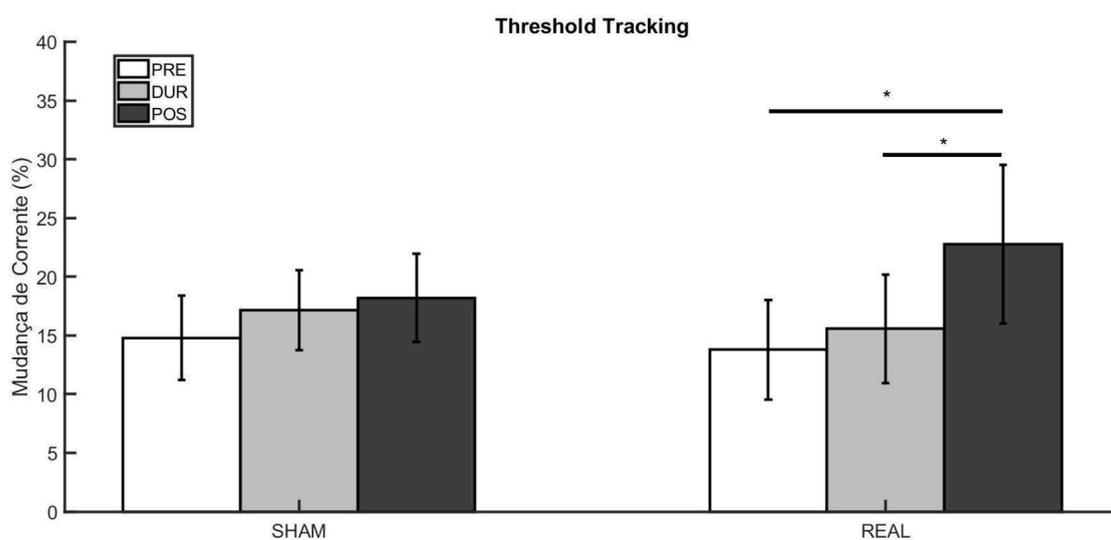
Tabela 4. Percentuais de mudança da GIPS e Cor\_THTR.

Parâmetro	Condição	Percentual de Mudança		
		DUR X PRE	POS X PRE	POS X DUR
GIPS	REAL	+3,03%	+21,48%*	+17,90%
	SHAM	+18,08%	+14,50%	-3,03%
Cor_THTR	REAL	+12,95%	+65,16%*	+46,23%*
	SHAM	+15,94%	+23,05%	+6,14%

PRE: antes da estimulação com corrente elétrica contínua; DUR: durante estimulação com corrente elétrica contínua; POS: após estimulação com corrente elétrica contínua; GIPS: Grau de Inibição Pré-Sináptica; Cor\_THTR: Mudança de corrente para rastreo do reflexo H.



**Figura 28. Valores de GIPS antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de GIPS de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as situações.



**Figura 29. Valores de corrente antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de Cor\_THTR de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as situações.

### 4.3. ONDA V

Os resultados das ANOVAs são expressos na tabela 5 deste tópico. A onda V é referente a uma resposta neurofisiológica após aplicação de um estímulo elétrico supramáximo nas condições REAL e SHAM em três momentos: antes da estimulação com corrente elétrica contínua (PRE), durante estimulação com corrente

elétrica contínua (DUR) e após estimulação com corrente elétrica contínua (POS). A onda M é a resposta motora nos mesmos três momentos e condições da onda V.

#### 4.3.1. CONDIÇÃO REAL (ONDA V E ONDA M)

Para a onda V, as diferenças não foram significativas em nenhuma das comparações ( $F_{2,20}=1,842$ ,  $p=0,184$ ). PRE e DUR ( $p=0.770$ ). PRE e POS ( $p=0.119$ ). DUR e POS ( $p=0.115$ ) (Figura 30).

Para a onda M, a ANOVA de uma via não identificou diferenças significativas entre nenhuma das comparações ( $F_{2,20}=1,445$ ,  $p=0,259$ ). PRE e DUR ( $p=0.480$ ). PRE e POS ( $p=0.235$ ). DUR e POS ( $p=0.124$ ).

#### 4.3.2. CONDIÇÃO SHAM (ONDA V E ONDA M)

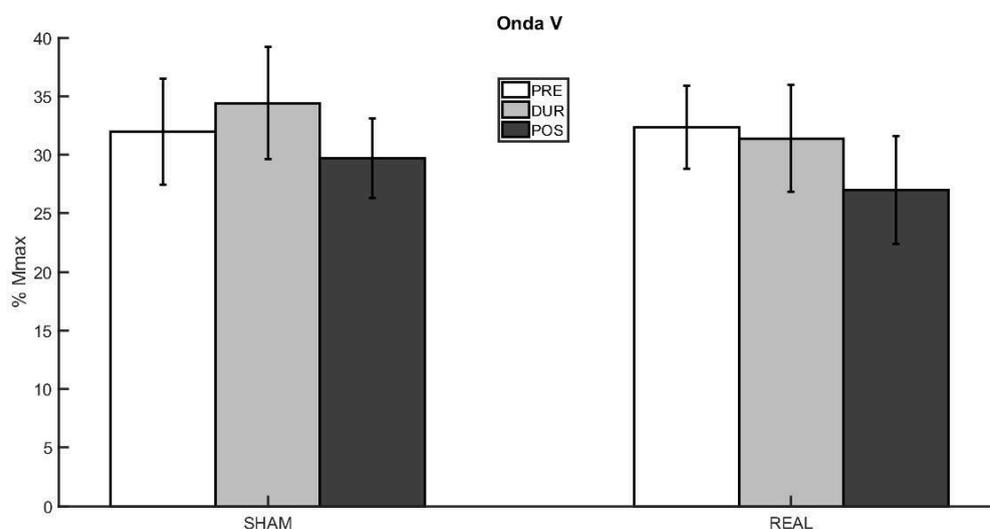
Em relação a onda V, nenhuma das comparações realizadas manifestou diferença estatística significativa ( $F_{2,20}=0,388$ ,  $p=0,684$ ). PRE e DUR ( $p=0.711$ ). PRE e POS ( $p=0.654$ ). DUR e POS ( $p=0.324$ ) (Figura 30).

Ao comparar a onda M, não foram encontradas diferenças significativas em nenhuma das relações ( $F_{2,20}=1,834$ ,  $p=0,186$ ). PRE e DUR ( $p=0.174$ ). PRE e POS ( $p=0.236$ ). DUR e POS ( $p=0.369$ ).

A tabela 4 mostra os resultados da ANOVA de uma via para a onda V e onda M nas condições REAL e SHAM.

Tabela 5. Parâmetros do protocolo de Onda V

Parâmetro	N	Condição	Sig.	Sig.	Sig.
			PRE x DUR	PRE x POS	DUR x POS
Onda V	11	REAL	0.770	0.119	0.115
		SHAM	0.711	0.654	0.324
Onda M	11	REAL	0.480	0.235	0.124
		SHAM	0.174	0.236	0.369



**Figura 30. Valores de onda V antes, durante e após estimulação nas condições REAL e SHAM.** Média e desvio padrão dos dados de onda V de todos os sujeitos, extraídos nos momentos PRE (antes da estimulação com corrente elétrica contínua), DUR (durante estimulação com corrente elétrica contínua) e POS (após estimulação com corrente elétrica contínua). Todos os dados foram normalizados como uma razão da onda Mmax. Não houve mudança significativa em todos os parâmetros avaliados.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo se baseou no artigo de Bolzoni et al. (2017) que reportou redução da amplitude do reflexo H durante e após a ECC anódica aplicada em membros inferiores. O objetivo do presente estudo foi o de investigar o mecanismo responsável por esta inibição. Os resultados do presente estudo não apontam diferenças significativas das condições REAL e SHAM para os parâmetros da curva de recrutamento (incluindo H50 utilizado por Bolzoni), correntes utilizadas para gerar estes parâmetros, ganho de recrutamento (Hisp/Mslp) e onda V. Entretanto, foram observados resultados significativos para GIPS REAL e Cor\_THTR REAL. Os efeitos destes resultados e suas possíveis explicações serão comentados nas seções a seguir.

### 5.1. CURVA DE RECRUTAMENTO (CR) DO REFLEXO H

Primeiramente, é importante destacar que o início da ECC é acompanhado por uma sensação de formigamento devido a ativação de aferentes cutâneas sob os eletrodos. É sabido que tanto a estimulação transcraniana quanto a periférica podem influenciar na amplitude do reflexo H (Ghanim et al., 2009; Klakowicz et al., 2006; Lagerquist and Collins, 2010). Entretanto, a possibilidade de que a sensação de

formigamento pode interferir no protocolo deve ser desconsiderada pois, assim como no estudo de Lamy et al. (2012), nenhum dos sujeitos foi capaz de diferenciar as condições REAL e SHAM. Este fato leva a crer que a percepção cutânea foi similar entre ambas as condições, sem interferência cognitiva (Ambrus et al., 2011).

Outro ponto a ser ressaltado é o tempo de experimento. A amplitude do reflexo H é alterada ao longo do experimento (Crone et al. 1999). Como neste teste, cada intervenção durava aproximadamente uma hora e vinte minutos, se poderia inferir que quaisquer alterações no reflexo H após estimulação anodal seriam advindas do tempo. Porém, esta hipótese pode ser descartada por dois motivos: 1) O comportamento dos parâmetros da curva foi semelhante nas condições REAL e SHAM; 2) Crone et al. (1999) demonstraram uma diminuição na amplitude da resposta H ao longo do tempo e, neste estudo, o H não teve um padrão de comportamento definido.

Por serem técnicas muito novas, tanto a ETCC quanto a ECC não apresentam referências bem estabelecidas de como elas impactam nas funções e excitabilidades das vias medulares (McCane et al., 2023).

Estudos recentes reportam um aumento na amplitude do reflexo H após ETCC de caráter excitatório direcionada para membros inferiores aplicada no córtex de pessoas em repouso (Grospretre et al., 2021; Quiles et al., 2022). Ademais, alguns estudos apontam uma diminuição da resposta H quatro segundos após ETCC inibitória direcionada aos membros inferiores (Nitsche e Paulus, 2000; Winkler et al. 2010). Em contraponto a estes, existem estudos que não demonstraram interferências de estímulos excitatórios ou inibitórios no reflexo H de indivíduos sentados (Nitsche et al., 2003; Roche et al., 2011; Grospretre et al., 2021).

McCane et al. (2023) observaram um aumento de amplitude do reflexo H submáximo no primeiro minuto de ETCC REAL aplicada na área do córtex motor referente aos membros inferiores. Porém, este efeito foi dissipado no minuto 4 de intervenção, produzindo um reflexo H de amplitude semelhante ao período pré estímulo. Apesar de serem estímulos aplicados em regiões diferentes, o direcionamento aos membros inferiores era semelhante. Este achado pode corroborar com a falta de diferenças no presente estudo, pois, após iniciar a estimulação, se levava até 5 minutos para encontrar todos os valores de H necessários para iniciar o protocolo. Além disso, os valores de H foram semelhantes

ao pré em todas as aquisições realizadas até meia hora após início da estimulação, podendo corroborar com os achados de McCane et al. (2023).

Lamy et al. (2012) não encontraram diferenças significativas nos parâmetros Hslp/Mslp da curva de recrutamento em três tipos de ECC: REAL anódica, REAL catódica e SHAM. A razão Hmax/Mmax, não foi afetada por nenhum dos 3 tipos de estimulação. Mesmo com ECC sendo aplicada no tórax, os autores avaliaram sua interferência no reflexo H do músculo sóleo. Assim como foi reportado por outros pesquisadores que utilizaram a ETCC no crânio (Winkler et al. 2010; Cogiamanian et al., 2011), é possível que estes achados corroborem com o presente estudo pela falta de alterações entre os parâmetros Hslp/Mslp e Hmax/Mmax ao utilizar ECC.

Além disso, a estimulação anodal não alterou o ganho de recrutamento do reflexo H (parâmetro slope), que prevê a mudança de excitabilidade da via reflexa e da rede de motoneurônios após um aumento na intensidade de corrente necessária para estimular esta rede (Lamy et al., 2012).

Possivelmente, a ausência de efeitos da ECC sobre o reflexo H observada no presente estudo possa estar associada a algumas diferenças metodológicas entre o corrente protocolo e o adotado por Bolzoni et al (2017), como discutido na próxima seção (5.2).

## **5.2. EFEITOS DA ECC SOBRE A IPS**

Bolzoni et al. em (2017) demonstram uma diminuição na amplitude do reflexo H durante estimulação anódica em membros inferiores. Tal diminuição perdurou mesmo após a suspensão da ECC, corroborando com os achados de Jankowska (2017) que, após estimular as fibras aferentes de ratos anestesiados, observou efeitos da ECC até mais de uma hora após término do protocolo. Resultados diferentes dos encontrados no presente trabalho.

A ECC do tipo anódica reduz a excitabilidade da membrana agindo nos canais transmembranares específicos para potássio, os mantendo abertos por mais tempo e hiperpolarizando a célula (Kiernan & Bostock, 2000). A alteração na amplitude do reflexo observada por Bolzoni et al. (2017) pode ser atribuída ao posicionamento dos eletrodos que interfere diretamente na amplitude da resposta, ou seja, se uma corrente atinge diretamente a região de um axônio, a eficácia de

estimulação é maior, pois compartimentos maiores e mais distantes da membrana são homoganeamente polarizados (Radman et al., 2007).

Ademais, a eficácia e o direcionamento dos efeitos dependem da orientação que o neurônio estimulado se encontra com relação à estimulação aplicada (Radman et al., 2007). Quando o nervo se encontra paralelo a corrente aplicada, seus neurônios são afetados de forma antagônica à polarização, ou seja, a estimulação anódica que costuma excitar neurônios corticais terá um efeito inibitório quando aplicada nos membros inferiores (Kabakov et al., 2012). Esta pode ser uma das explicações da resposta ECC ser diferente da ETCC, pois a arquitetura neurofisiológica dos membros é diferente da cortical.

Stagg et al. (2018) ressalta que a ECC aplicada em intensidades normais (1mA-2mA) altera pouco os potenciais de repouso de membrana. É sabido que o potencial de membrana está próximo aos -70mV e a ECC altera de 0,2-0,5 mV (Radman et al., 2009; Opitz et al., 2016 ). A partir destes valores, a alteração do potencial elétrico de membrana é relativamente baixa, mas é efetiva porque mesmo a mudança sendo pequena, esta é capaz de gerar amplificação de efeitos, seja por alterações no número de disparos de PAs em MN e/ou aumentar a quantidade de PAs, tornando a via mais excitada (Anastassiou et al., 2010).

A ECC afeta tanto o músculo agonista quanto o antagonista (devido a sua inespecificidade), mas não necessariamente de forma semelhante (Radman et al., 2007). Esta ativação leva a um influxo de íons de Cálcio ( $Ca^{2+}$ ). O  $Ca^{2+}$  intracelular controla tanto a potencialização quanto a depressão de longo prazo, sendo que baixas taxas de  $Ca^{2+}$  têm uma tendência a depressão e altas taxas têm uma tendência a potencialização. Entretanto, entre as zonas de excitação e inibição existe uma zona de transição que pode não sofrer qualquer alteração pela ECC (Kronberg et al., 2017). Ademais, a estimulação anodal tende a aumentar a liberação de glutamato (que na medula espinhal é um neurotransmissor excitatório), aumentando a eficiência na transmissão sináptica das aferentes do nervo fibular, podendo aumentar a excitabilidade da via de IPS (Stagg et al., 2009; Clark et al., 2011). Este aumento na eficiência de transmissão do impulso nervoso poderia ocorrer já na sinapse Ia e o interneurônio de primeira ordem que participa da via de IPS. O resultado final seria um aumento na excitabilidade desta via inibitória. Por outro lado, o mesmo efeito facilitatório não ocorreria nos axônios das aferentes do nervo tibial. O resultado final dessa facilitação diferencial seria ausência de efeitos

sobre a amplitude do reflexo H, mas aumento na excitabilidade da via de IPS. Adicionalmente, como a CR é evocada no repouso, é possível que efeitos pré-sinápticos não se manifestem como deveriam, ou seja, mesmo que a excitabilidade das aferentes do fibular esteja aumentada (aumentando a via da IPS), não significa que a via do reflexo H será afetada com a consequente diminuição da amplitude reflexa. Entretanto, estas últimas explicações são hipóteses que ainda devem ser melhor testadas.

Outros pontos a serem comentados foram as diferenças no presente protocolo comparado ao de Bolzoni et al. (2017). Houve duas diferenças que podem ter influenciado nos resultados encontrados por estes autores quando comparados ao nosso estudo. 1) Área dos eletrodos utilizada durante a ECC. A do presente estudo foi 4cm<sup>2</sup>, enquanto a área do eletrodo utilizada por Bolzoni et al. (2017) foi de 10cm<sup>2</sup>. Alam et al. (2016) afirmam que tamanhos de eletrodos maiores diminuem a qualidade focal de estimulação (densidade de corrente), talvez por esta razão que a amplitude do reflexo H foi alterada no estudo de Bolzoni et al. (2017), enquanto que no presente estudo isso não ocorreu. Talvez o eletrodo com área menor (adotado no presente estudo), que apresenta uma qualidade focal maior, tenha afetado mais as aferentes do nervo fibular. 2) Os autores utilizam um tempo de estimulação de 10 minutos justificando que um tempo mais longo causa lesão cerebral em ratos (Liebetanz et al., 2009). No entanto, é sabido que estimulações acima de 10 minutos são seguras e não geram as mesmas lesões em seres humanos. Ademais, o tempo ideal de estimulação recomendado para seres humanos é de 15-30 minutos para se observar efeitos significativos (Nitsche e Paulus, 2011). Por isso, nosso estudo se baseou no tempo de 20 minutos. Talvez um tempo menor de ECC resulte em efeitos diferenciais sobre axônios de aferentes de diferentes origens (Kronberg et al., 2017).

Neste estudo, a via da IPS foi mais afetada pela ECC que a via do reflexo H. A mudança significativa na Cor\_THTR dos momentos DUR e POS demonstra, de forma clara, a necessidade de uma intensidade de estimulação sobre o nervo tibial maior para se recrutar aproximadamente a mesma quantidade de motoneurônios e obter uma resposta H50 semelhante ao momento PRE.

A mudança nos valores de corrente ao utilizar a técnica de THTR pode estar associada à estimulação no nervo fibular e à via da IPS. A hipótese de uma inibição recorrente afetando as correntes é descartada, pois não há este tipo de inibição entre antagonistas puros como tibial anterior e sóleo (Wilson et al., 1960; Hultborn et

al., 1971). Além disso, a inibição recorrente geralmente é associada quantitativamente à excitação heterônima das aferentes Ia, o que não ocorre entre tibial anterior e sóleo (Pierrot-Deseilligny and Burke, 2012).

Howells et al. (2020) utilizando a técnica de do THTR, estudaram dois tipos de inibição (D1 e D2). Foram fornecidas evidências que a D2 pode gerar uma inibição maior que a D1. Além disso, a D2 possui um efeito cumulativo inibitório que perdura por um certo tempo mesmo após o fim da estimulação. Entretanto, trabalhar com THTR utilizando o tipo de inibição D2 é relativamente mais difícil por alterar a excitabilidade das aferentes Ia de forma mais desordenada quando comparada a D1, levando o pesquisador ou o computador a ajustar mais vezes a intensidade de corrente a fim de continuar trabalhando com a mesma população de MNs.

Futuros estudos podem ser realizados para avaliar novas técnicas de estimulação como facilitação heterônoma (Hultborn et al., 1971) e inibição do tipo D1 (Howells et al., 2020).

### **5.3. PROTOCOLO DE ONDA V**

Como a CR é evocada no repouso, é possível que efeitos pré-sinápticos não se manifestem como deveriam, ou seja, mesmo que a excitabilidade das aferentes do FIB esteja aumentada (aumentando a via da IPS), não significa que a via do reflexo H irá diminuir. A ECC aplicado nos membros inferiores altera a excitabilidade das vias aferentes (possivelmente mais as do FIB). Este fato pode não ter efeitos centrais em nível medular, mas pode ter efeito central em níveis suprasegmentares. Por isso, a onda V foi utilizada para avaliar se a ECC pode repercutir nos centros supramedulares.

A ECC não demonstrou interferências na onda V. As regiões do SNC, bem como os mecanismos responsáveis por adaptações neurais podem ser investigados a partir de respostas como reflexo H e onda V (Aagaard et al., 2002).

Geralmente, a onda V é associada a protocolos com intervenções de treinamento e tem seus resultados de acordo com a população alvo e com o tipo de metodologia utilizada, geralmente com treinamentos longitudinais obtém-se mais efeitos que sessões únicas (Fimland et al., 2009; Ekblom, 2010). Entretanto, já foram observadas mudanças na amplitude da onda V em uma única sessão de quiropraxia capaz de aliviar tensão entre discos intervertebrais e articulações (Holt et al., 2019).

A onda V é resultado de um estímulo elétrico supramáximo aplicado no nervo enquanto o músculo realiza uma contração. Este estímulo recruta todos os axônios das aferentes Ia, além dos axônios motores. Nestes últimos, os potenciais de ação seguem para o músculo gerando uma onda M e, antidromicamente, seguem em direção à medula espinhal. Os potenciais antidrômicos irão colidir com os ortodrômicos gerados pelas vias descendentes, resultando no cancelamento entre os potenciais e permitindo a passagem do reflexo H para o músculo, onde será captada a onda V. Conseqüentemente, um aumento na amplitude da onda V reflete o aumento da ativação supraespinhal, ou seja, alteração no drive descendente (Vila-Cha et al., 2012).

A amplitude da onda V também pode ser afetada por outros mecanismos como 1) responsividade da rede de motoneurônios; 2) eficácia da transmissão sináptica nas aferentes Ia por meio da IPS; 3) inibição pós-sináptica. Entretanto, estes mecanismos também contribuem na via do reflexo H, levando a crer que as explicações para a não observação de mudanças da onda V no presente estudo sejam semelhantes às do reflexo H (Pierrot-Deseilligny e Burke, 2005).

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo complementa os resultados obtidos por meio de uma nova forma de estimulação por corrente contínua, aplicada diretamente no membro (ECC) que, possivelmente, altera as propriedades biofísicas dos axônios sensoriais e motores e conseqüente amplitude do reflexo H e onda M, respectivamente. A atual investigação confirmou os efeitos da ECC sobre uma via inibitória que atua na modulação da excitabilidade do reflexo de estiramento muscular. Ou seja, foram observadas pela primeira vez mudanças significativas na via de IPS, mas não houve mudanças na onda V ou parâmetros da curva de recrutamento.

O aumento na excitabilidade da via de IPS pode beneficiar pessoas com espasmos ou problemas de mobilidade motora, além de auxiliar no controle da resposta reflexa.

Os mecanismos por trás de tais mudanças ainda devem ser melhor pesquisados e avaliados para descobrir como a ECC afeta as aferentes Ia.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Tahayori B, Koceja DM. Activity-dependent plasticity of spinal circuits in the developing and mature spinal cord. *Neural plasticity*. 2012;2012:964843.
2. Warlton C, Cafarelli E. Caffeine increases spinal excitability in humans. *Muscle Nerve* 28: 359–364, 2003.
3. Macdonell RA, Talalla A, Swash M. Intrathecal baclofen and the H-reflex. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 52:1110-1112, 1989.
4. Roche N, Lackmy A, Achache V, Bussel B, Katz R. Effects of anodal transcranial direct current stimulation over the leg motor area on lumbar spinal network excitability in healthy subjects. *The Journal of physiology*. 589(11):2813-26, 2011.
5. Brunoni AR, Nitsche MA, Bolognini N, Bikson M, Wagner T, Merabet L, Edwards DJ, Valero-Cabre. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS), challenges and future directions. *Brain Stimul*. 5: 175–195, 2012.
6. Burke D, Pierrot-Deseilligny E. *The Circuitry of the Human Spinal Cord: Its Role in Motor Control and Movement Disorders*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.
7. Avelar BP, Costa JN de A, Safons MP, et al. Balance Exercises Circuit improves muscle strength, balance, and functional performance in older women. *Age*. 38(1):14, 2016.
8. Loadman PM., Zehr EP. Rhythmic arm cycling produces a non-specific signal that suppresses Soleus H-reflex amplitude in stationary legs. *Exp. Brain Res*.179, 199–208, 2007.
9. Casabona A, Polizzi M, Perciavalle V. Differences in H-reflex between athletes trained for explosive contractions and non-trained subjects. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 61(1-2):26-32, 1990.
10. Nielsen J, Crone C, Hultborn H. H-reflexes are smaller in dancers from The Royal Danish Ballet than in well-trained athletes. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 66(2):116-21, 1993.

11. Quadrado IC, Cândia RB, Silva BM, Vianna LC, Mezzarane RA. Modulation of stretch reflex pathway excitability following remote limb ischemic preconditioning in healthy young men. Submetido.
12. Rudomin P, Schmidt, RF. Presynaptic inhibition in the vertebral spinal cord revisited. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale.* 129. 1-37, 1999.
13. Stein RB. Presynaptic inhibition in humans. *Prog Neurobiol.* 47:533-44, 1995.
14. Mezzarane RA, Magalhães FH, Chaud VM, Elias LA, Kohn AF. Enhanced D1 and D2 inhibitions induced by low-frequency trains of conditioning stimuli: differential effects on H- and T-reflexes and possible mechanisms. *PLoS One*, v. 10(3): e0121496. 2015.
15. Frigon A, Collins DF, Zehr EP Effect of rhythmic arm movement on reflexes in the legs: modulation of soleus H-reflexes and somatosensory conditioning. *J Neurophysiol.* 91:1516–1523, 2004.
16. Demaire C, Honore J, Lebizec J, and Coquery JM. Specific modulation of the Hoffmann reflex cutaneous facilitation during a reaction-time-task. *Exp Brain Res.* 74: 592–602, 1989.
17. Iles JF. Evidence for cutaneous and corticospinal modulation of presynaptic inhibition of Ia afferents from the human lower limb. *J Physiol* 491:197–207, 1996.
18. Nakajima T, Mezzarane, RA, Hundza SR, Komiyama T, Zehr EP. Convergence in Reflex Pathways from Multiple Cutaneous Nerves Innervating the Foot Depends upon the Number of Rhythmically Active Limbs during Locomotion. *Plos One*, v. 9, p. e104910, 2014.
19. Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, Henning S, Tergau F. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J. Physiol.*, 553, 293–301, 2003.

20. Fritsch, B., Reis, J., Lu, B. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron*, 66, 198–204, 2010.
21. Bhadra N, Kilgore KL. Direct current electrical conduction block of peripheral nerve. *IEEE T. Neur. Sys. Reh.* 12, 313–324, 2004.
22. Jackson, MP, Bikson M. Animal models of transcranial direct current stimulation: methods and mechanisms. *Clin. Neurophysiol.* 127, 3425–3454, 2016.
23. AGOSTINUCCI, James. Circumferential pressure's inhibitory effects on soleus H-reflex. *Translational Neuroscience*, v. 4, p. 251-259, 2013.
24. Bolzoni F, Jankowska E. Presynaptic and postsynaptic effects of local cathodal DC polarization within the spinal cord in anaesthetized animal preparations. *J. Physiol.* 593, 947–966, 2015.
25. Fregni F, Boggio P, Pascual-Leone A. Transcranial direct current stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neuro Report* 16(14): 1551-1555, 2005.
26. Gomez Palacio Schjetnan A, Faraji J, Metz GA, Tatsuno M, Luczak A. Transcranial direct current stimulation in stroke rehabilitation: a review of recent advancements. *Stroke research and treatment.* 2013;2013.
27. Benninger DH, Lomarev M, Lopez G, Wassermann EM, Li X, Considine E, et al. Transcranial direct current stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81(10):1105-11, 2010.
28. Fregni F, Boggio P, Pascual-Leone A. Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Exp. Brain Res.* 166(1):23-30, 2005.
29. Monti A, Cogiamanian F, Marceglia S. Improved naming after transcranial direct current stimulation in aphasia *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 79:451-453, 2008.
30. Nitsche, M.A. & Paulus, W. Transcranial direct current stimulation-update 2011. *Restor. Neurol. Neuros.* 29: 463–492, 2011.

31. Cogiமானian F, Vergari M, Priori A. Transcutaneous spinal cord direct current stimulation inhibits the lower limb nociceptive flexion reflex in human beings. *Pain* 152(2):370-375, 2011.
32. Bolzoni F, Esposti R, Bruttini C, Zenoni G, Jankowska E, Cavallari P. Direct current stimulation modulates the excitability of the sensory and motor fibres in the human posterior tibial nerve, with a long-lasting effect on the H-reflex. *Eur. J. Neur.* 46:2499-2506,2017.
33. Yamaguchi T, Fujiwara T, Liu M. The effects of anodal transcranial direct current stimulation and patterned electrical stimulation on spinal inhibitory interneurons and motor function in patients with spinal cord injury. *Exp. Brain Res.* 234(6):1469-1478, 2016.
34. Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA. The Hoffmann reflex: methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *Journal of Athletic Training.* 39(3):268, 2004.
35. Klimstra M, Zehr EP. A sigmoid function is the best fit for the ascending limb of the Hoffmann reflex recruitment curve. *Experimental brain research.*186(1):93- 105, 2008.
36. Mezzarane RA, Klimstra M, Lewis A, Hundza SR, Zehr EP. Interlimb coupling from the arms to legs is differentially specified for populations of motor units comprising the compound H-reflex during “reduced” human locomotion. *Experimental brain research.* 208(2):157-68, 2011.
37. Vila-Cha C, Falla D, Correia M V., Farina D. Changes in H reflex and V wave following short-term endurance and strength training. *J Appl Physiol.* 112(1):54–63, 2012.
38. Knikou M. The H-reflex as a probe: pathways and pitfalls. *Journal of neuroscience methods.* 171(1):1-12, 2008.
39. Crone C. Reciprocal inhibition in man. *Dan Med Bull.* 40:571-81, 1993.

40. Nakajima T, Mezzarane RA, Klarner T, Barss TS, Hundza SR, Komiyama T, Zehr EP. Neural mechanisms influencing interlimb coordination during locomotion in humans: presynaptic modulation of forearm H-reflexes during leg cycling. 2013.
41. Suzuki S, Nakajima T, Mezzarane RA, Ohtsuka H, Futatsubashi G, Komiyama T. Differential regulation of crossed cutaneous effects on the soleus H-reflex during standing and walking in humans. *Exp Brain Res* 232:3069–3078, 2014.
42. Hoffman, MA, Doeringer, JR, Norcross, MF, Johnson, ST, Chappell, PE. Presynaptic inhibition decreases when estrogen level rises. *Scand J Med Sci Sports*. 28: 2009– 2015, 2018.
43. Zehr EP, Stein RB, and Komiyama T. Function of sural nerve reflexes during human walking. *J Physiol* 507: 305–314, 1998.
44. Fournier E, Katz R, Pierrot-Deseilligny E. A re-evaluation of the pattern of group I fibre projections in the human lower limb on using randomly alternated stimulations. *Exp Brain Res*. Springer-Verlag. 56(1):193–5, 1984.
45. Demairé C, Honoré J, Coquery M. Specific modulation of the Hoffmann reflex cutaneous facilitation during a reaction-time task. *Exp. Brain Res*. 74(3):592-602,1989.
46. Ahmed Z. Trans-spinal direct current stimulation modifies spinal cord excitability through synaptic and axonal mechanisms. *Physiol. Rep.*, 2, 2014.
47. Radman T, Ramos RL, Brumberg JC, Bikson M. Role of cortical cell type and morphology in subthreshold and suprathreshold uniform electric field stimulation in vitro. *Brain Stimul.*, 2, 215–228, 2009.
48. Demair C, Honor J, Le Bizec J, Coquery JM . Specific modulation of the Hoffmann reflex cutaneous facilitation during a reaction-time task. *Exp Brain Res* 74:592-602, 1989.
49. Zehr PE. Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *European journal of applied physiology*. 86(6):455-68, 2002.

50. Holtermann A, Roeleveld K, Engstrøm M, Sand T. Enhanced H-reflex with resistance training is related to increased rate of force development. *European journal of applied physiology*. 101(3):301-12, 2007.
51. Mezzarane RA.; Kohn AF. A method to estimate EMG crosstalk between two muscles based on the silent period following an H-reflex. *Medical Engineering & Physics*. 31(10):1331-6, 2009.
52. Bostock H, Cikurel K, Burke D. Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. *Muscle and Nerve*. 1998;21:137–158.
53. Crone C, Hultborn H, Mazières L, Morin C, Nielsen J, Pierrot-Deseilligny E. Sensitivity of monosynaptic test reflexes to facilitation and inhibition as a function of the test reflex size: a study in man and the cat. *Exp Brain Res* 1990;81:35–45.
- 54.. Garnett R, Stephens JA. Changes in the recruitment threshold of motor units produced by cutaneous stimulation in man. *J Physiol* 1981;311:463–73.
55. Kiernan MC, Mogyoros I, Burke D. Differences in the recovery of excitability in sensory and motor axons of human median nerve. *Brain*. 1996;119:1099–1105.
56. Bostock H, Rothwell JC. Latent addition in motor and sensory fibres of human peripheral nerve. *Journal of Physiology*. 1997;498:277–294.
57. ElBasiouny SM, Schuster JE, Heckman CJ. Persistent inward currents in spinal motoneurons: important for normal function but potentially harmful after spinal cord injury and in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 2010;121:1669–79.
58. Burke D, Kiernan MC, Bostock H. Excitability of human axons. *Clin Neurophysiol* 2001;112:1575–85.
59. Howells, J., Sangari, S., Matamala, J. M., Kiernan, M. C., Marchand-Pauvert, V., & Burke, D. (2020). Interrogating interneurone function using threshold tracking of the H reflex in healthy subjects and patients with motor neurone disease. *Clinical Neurophysiology*.

60. MCCANE, Lynn M.; WOLPAW, Jonathan R.; THOMPSON, Aiko K. Effects of active and sham tDCS on the soleus H-reflex during standing. *Experimental Brain Research*, v. 241, n. 6, p. 1611-1622, 2023.
61. NIAZI, Imran Khan et al. Changes in H-reflex and V-waves following spinal manipulation. *Experimental brain research*, v. 233, p. 1165-1173, 2015.
62. Abbruzzese M., Reni L., Minatel C., Favale E., Presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying H-reflex changes produced by a selective voluntary contraction, *Muscle Nerve*, 1998, 21, 439-453
63. Hultborn H., Meunier S., Morin M. C., Pierrot-Deseilligny E., Assessing changes in presynaptic inhibition of Ia fibres: a study in man and the cat, *J. Physiol.*, 1987, 389, 757-772.
64. Guissard N., Duchateau J., Hainaut K., Mechanisms of decreased motoneuron excitation during passive muscle stretching, *Exp. Brain Res.*, 2001, 137, 163-169.
65. Ghanim Z, Lamy JC, Lackmy A, Achache V, Roche N, Penicaud A, Meunier S, Katz R. Effects of galvanic mastoid stimulation in seated human subjects. *J Appl Physiol* 106: 893–903, 2009.
66. Hultborn H, Illert M, Nielsen J, Paul A, Ballegaard M, Wiese H. On the mechanism of the post-activation depression of the H-reflex in human subjects. *Exp Brain Res* 108: 450–462, 1996.
67. Klakowicz PM, Baldwin ER, Collins DF. Contribution of M-waves and H-reflexes to contractions evoked by tetanic nerve stimulation in humans. *J Neurophysiol* 96: 1293–1302, 2006.
68. Lagerquist O, Collins DF. Influence of stimulus pulse width on M-waves, H-reflexes, and torque during tetanic low-intensity neuromuscular stimulation. *Muscle Nerve* 42: 886–893, 2010.
69. LAMY, Jean-Charles et al. Modulation of soleus H reflex by spinal DC stimulation in humans. *Journal of neurophysiology*, v. 108, n. 3, p. 906-914, 2012.

70. Ambrus GG, Antal A, Paulus W. Comparing cutaneous perception induced by electrical stimulation using rectangular and round shaped electrodes. *Clin Neurophysiol* 122: 803–807, 2011.
71. Crone C, Johnsen LL, Hultborn H, Orsnes GB. Amplitude of the maximum motor response (Mmax) in human muscles typically decreases during the course of an experiment. *Exp Brain Res* 124: 265–270, 1999.
72. Grospretre S, Grandperrin Y, Nicolier M Effect of transcranial direct current stimulation on the psychomotor, cognitive, and motor performances of power athletes. *Sci Rep* 11:9731., 2021.
73. Quiles V, Ferrero L, Iáñez E, Ortiz M, Azorín JM Review of tDCS configurations for stimulation of the lower-limb area of motor cortex and cerebellum. *Brain Sci.*, 2022.
74. Winkler T, Hering P, Straube A. Spinal DC stimulation in humans modulates post-activation depression of the H-reflex depending on current polarity. *Clin Neurophysiol* 121: 957–961, 2010.
75. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol* 527:633–639, 2000.
76. Jankowska, E., Kaczmarek, D., Bolzoni, F. & Hammar, D. Longlasting increase in axonal excitability following epidurally applied DC. *J. Neurophysiol.*, 118, 1210–1220, 2017.
77. Kiernan, M.C. & Bostock, H. Effects of membrane polarization and ischaemia on the excitability properties of human motor axons. *Brain*, 12, 2542–2451, 2000
78. Radman T, Su Y, An JH, et al. Spike timing amplifies the effect of electric fields on neurons: implications for endogenous field effects. *J Neurosci.* ;27:3030–3036, 2007
79. Kronberg, G., Bridi, M., Abel, T., Bikson, M., & Parra, L. C. . Direct Current Stimulation Modulates LTP and LTD: Activity Dependence and Dendritic Effects. *Brain Stimulation*, 10(1), 51–58, 2017.

80. Kabakov AY, Muller PA, Pascual-Leone A, et al. Contribution of axonal orientation to pathway-dependent modulation of excitatory transmission by direct current stimulation in isolated rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 2012;107:1881–1889.
81. Stagg, Charlotte J.; Antal, Andrea; Nitsche, Michael A. . *Physiology of Transcranial Direct Current Stimulation.* The Journal of ECT, 2018.
82. Stagg CJ, Best JG, Stephenson MC, et al. Polarity-sensitive modulation of cortical neurotransmitters by transcranial stimulation. *J Neurosci.* ; 29:5202–5206, 2009.
83. Clark VP, Coffman BA, Trumbo MC, et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) produces localized and specific alterations in neurochemistry: a 1 H magnetic resonance spectroscopy study. *Neurosci Lett.* ;500:67–71, 2011.
84. Opitz A, Falchier A, Yan CG, et al. Spatiotemporal structure of intracranial electric fields induced by transcranial electric stimulation in humans and nonhuman primates. *Sci Rep.* ;6:31236, 2016.
85. Anastassiou CA, Montgomery SM, Barahona M, et al. The effect of spatially inhomogeneous extracellular electric fields on neurons. *J Neurosci.* ;30:1925–1936, 2010
86. Liebetanz, D., Koch, R., Mayenfels, S., Konig, F., Paulus, W. & Nitsche, M.A. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin. Neurophysiol.*, 120, 1161–1167, 2009.
87. Wilson VJ, Talbot WH, Diecke FP. Distribution of recurrent facilitation and inhibition in cat spinal cord. *J Neurophysiol* ;23:144–53, 1960.
88. Hultborn H, Jankowska E, Lindström S. Relative contribution from different nerves to recurrent depression of Ia IPSPs in motoneurons. *J Physiol* ;215:637–64., 1971.
89. Aagaard P , Simonsen EB , Andersen JL , Magnusson P , Dyhre-Poulsen P. Neural adaptation to resistance training: changes in evoked V-wave and H-reflex responses. *J Appl Physiol* 92: 2309–2318, 2002.

90. Fimland MS , Helgerud J , Gruber M , Leivseth G , Hoff J. Functional maximal strength training induces neural transfer to single-joint tasks. *Eur J Appl Physiol* 107: 21–29, 2009.

91. Ekblom MM. Improvements in dynamic plantar flexor strength after resistance training are associated with increased voluntary activation and V-to-M ratio. *J Appl Physiol* 109: 19–26, 2010.

92. DUCLAY, Julien; MARTIN, Alain. Evoked H-reflex and V-wave responses during maximal isometric, concentric, and eccentric muscle contraction. *Journal of neurophysiology*, v. 94, n. 5, p. 3555-3562, 2005.

