

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA



Estudo de Sinais de Matrizes
Multieletrodo (MEAs) em Termos do
Janelamento

Rodrigo Ribeiro Cardoso

Agosto de 2010

Estudo de Sinais de Matrizes Multieletrodo (MEAs) em Termos do Janelamento

Rodrigo Ribeiro Cardoso[‡]

Texto da dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Prof. João Batista Destro Filho, Dr.

Orientador

Prof. Alexandre Cardoso, Dr.

Coordenador do curso de Pós-Graduação

[‡] A bolsa de estudo para esta pesquisa foi concedida pela CAPES, Brasil.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU – MG, Brasil

C268e Cardoso, Rodrigo Ribeiro, 1984-
 Estudos de sinais de matrizes multieletrodo (MEAs) em termos do
 janelamento [manuscrito] / Rodrigo Ribeiro Cardoso. - 2010.
 79 f. : il.

Orientador: João Batista Destro Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia biomédica - Teses. 2. Processamento de sinais - Teses.
3. Eletrocencefalografia - Teses. I. Destro Filho, João Batista. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

CDU: 62:61

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Estudo de Sinais de Matrizes Multieletrodo (MEAs) em Termos do Janelamento

Rodrigo Ribeiro Cardoso[§]

Texto da dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, perante a banca de examinadores abaixo, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Aprovada em 16 de agosto de 2010.

Banca Examinadora:

Prof. João Batista Destro Filho, Dr. - Orientador (UFU)

Prof.^a Andrea Antunes Pereira, Dr.^a (UFU)

Prof. José Hiroki Saito, Dr. (UFSCar)

Prof.^a Renata Graciele Zanon, Dr.^a - Suplente (UFU)

Prof. Shigueo Nomura, Dr. - Suplente (UFU)

[§] A bolsa de estudo para esta pesquisa foi concedida pela CAPES, Brasil.

*“Todos que se envolvem na busca da ciência acabam se convencendo de
que um espírito se manifesta nas leis do universo – um espírito muito
superior ao do homem”*

Albert Einstein

*Aos meus pais, Pedro Iris e Wildima
Ao meu irmão e companheiro, Rogério*

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, acima de tudo, pela **Vida**. Graças a **Deus** temos um mundo cheio de encantos e mistérios que impulsionam as ciências, os românticos, os filósofos, os curiosos, etc. Enfim, impulsionam a nós todos pela busca de conhecimento e pela realização de um bem maior.

Agradeço aos **meus amados pais e irmão**, pela educação, carinho e amor que tenho recebido e pela pessoa que sou hoje; a **toda a minha família**, tios, tias, avós, primos e primas (Cardosos e Ribeiros), que, aliás, tenho como irmãos e irmãs, e se fosse aqui listar os nomes de todos e justificar o porquê desse agradecimento, daria um livro! (Ró, me desculpa, mas eu tive que copiar esse trecho da sua dissertação! Os nossos sentimentos acerca de nossa família são muito parecidos, e não conseguiria descrever com outras palavras!) Agradeço, em especial, a **meu Vovô Dadá** e **meu Tio Robério**, que partiram antes que eu pudesse compartilhar com eles a alegria de mais uma etapa concluída, mas sei que eles estiveram me auxiliando, de uma forma ou de outra. Agradeço também aos meus amigos de luta e trabalho: **Diogo, Geisarin, Doug, ZéJo, Nanny, Pio, Nagô, amigos do Integrarte e do Iluminarte**, e **meu Anjo Katryn**, pelo carinho, força e inspiração nessa jornada. Vocês não imaginam o quanto são importantes para mim! Agradeço, claro, a **todos os meus amigos e amigas**: obrigado mesmo!

Obrigado também aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Engenharia Biomédica (Biolab): **Prof. Adriano Alves, Prof. Adriano Oliveira, Prof. Eduardo, Prof. Alcimar, Ailton, Ângela, Éder, Bruno Calil, Bruno Mulina, Laíse (Maninha), Guilherme Cunha, Guilherme Cavalheiro, Iraídes, Daniel, Maria Fernanda**,

Alessandro, Débora, Aline, LÍlian, Tatiane, Nayara, Jeovane, Kheline, Amanda (Cabe gente nesse laboratório, viu!!!). Por favor, me desculpem se esqueci de algum nome, mas são tantas as pessoas que formam a família Biolab... Obrigado pelo apoio e auxílio nos momentos mais complicados do desenvolvimento desse trabalho. E claro, as festas de aniversário!!! Vão fazer muita falta!

Obrigado à **Cinara**, pelo carinho, dedicação e paciência em nos auxiliar; a **todos os funcionários** da Faculdade e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia.

Agradeço também ao **Prof. João Batista Destro Filho**, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Foram horas de reuniões e discussões, mas finalmente conseguimos! Obrigado pelos puxões de orelha, que decerto me auxiliaram muito nessa caminhada, e ainda hão de me ajudar bastante.

Obrigado à **CAPES** pelo apoio financeiro no desenvolvimento da pesquisa.

Enfim, agradeço também àqueles que eu não citei, mas que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante essa jornada. Sem todos vocês eu não poderia ter chegado aqui e vencido mais esta etapa!

Resumo

CARDOSO, Rodrigo Ribeiro. *Estudo de Sinais de Matrizes Multieletrodo (MEAs) em Termos do Janelamento*. Uberlândia: FEELT-UFU, 2010, 79 f.

Este trabalho se dedica ao estudo de uma ferramenta de segmentação para aplicação em sinais de matrizes multieletrodo (MEAs). Os estudos de sinais de culturas neuronais através da MEA têm aberto amplo campo de pesquisa. Entretanto, ferramentas clássicas de análise desse tipo de sinal focam na detecção de *spikes* e nas séries temporais entre intervalos de *spikes* (ISI). A busca de novas ferramentas para análise e segmentação dos sinais pode impulsionar as pesquisas e suas aplicações. Ainda assim, há espaço para ferramentas matemáticas clássicas, como a autocorrelação. São apresentados resultados e discussões sobre aplicação dessa técnica em sinais de matrizes multieletrodo. Esta ferramenta apresenta um grande potencial para aplicação em identificação de inatividade celular. É apresentado, também, um algoritmo para aplicação da técnica de segmentação através do SEM (*Spectral Error Measurement*). Os resultados não são conclusivos, porém, novas possibilidades são abertas para futuras investigações dessa e de outras técnicas de segmentação de sinais para aplicação na MEA. São feitos também comparativos das aplicações das ferramentas desenvolvidas em sinais eletroencefalográficos (EEG).

Palavras-chave: matriz multieletrodo, MEA, eletroencefalografia, EEG, segmentação, SEM, autocorrelação.

Abstract

CARDOSO, Rodrigo Ribeiro. *Study of Multielectrode Arrays (MEAs) Signals in Terms of Windowing*. Uberlândia: FEELT-UFU, 2010, 79 f.

This work studies a segmentation tool for application to multielectrode arrays (MEAs) signals. Studies of neuronal cultures signals by means of MEA have opened a wide research field. However, classical tools for analyzing these kinds of signals have focused on spikes detection and on time series intervals between spikes (ISI). The search for new tools on signal analysis and segmentation can boost investigations and their applications. There is opportunity for classical mathematical tools such as autocorrelation yet. Results and discussions on application of this technique in multielectrode array signals are presented. The application of this tool in cellular inactivity identification has great potential. An algorithm applying the segmentation technique by SEM (Spectral Error Measurement) is also presented. The results are not conclusive; however, new possibilities are opened for future investigation on this technique and others techniques of signals segmentation for applying on MEA signals. Finally, comparative applications of the developed tools in electroencephalographic signals (EEG) are presented.

Key-words: multielectrode array, MEA, electroencephalography, EEG, segmentation, SEM, autocorrelation.

Conteúdo

Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1 Motivação	2
1.2 Objetivo	3
1.3 Estrutura da dissertação	4
Capítulo 2 – Mecanismos de Propagação dos Potenciais Elétricos e a Eletroencefalografia (EEG).....	5
2.1 Introdução	5
2.2 Fisiologia da Sinapse de um Neurônio	6
2.3 Eletroencefalografia (EEG)	9
Capítulo 3 – Matriz Multieletrodo (MEA) e seu Sinal	12
3.1 Introdução	12
3.2 Histórico da MEA.....	13
3.3 MEA: Visão Geral	15
3.3.1 Gravação Extracelular com a MEA.....	15
3.3.2 Projeto e Produção da MEA.....	16
3.3.3 Eletrodos, Trilhas e Isolamento	17
3.4 Tipos de MEAs e Layouts	17
3.4.1 Standard MEAs	18
3.4.2 Thin MEAs.....	18

3.4.3	<i>High-Density MEAs</i>	18
3.4.4	<i>Outros Tipos de MEAs</i>	19
3.4.5	<i>MEA60 System</i>	19
3.5	Coleta de Sinal e Ruído	20
3.5.1	<i>Coleta de Sinais em MEAs</i>	20
3.5.2	<i>Ruído em Medidas Eletrofisiológicas</i>	21
3.5.2.1	<i>Ruído Térmico</i>	22
3.5.2.2	<i>Ruído de Disparo</i>	22
3.5.2.3	<i>Ruído de Dielétrico</i>	22
3.5.2.4	<i>Ruído de Excesso</i>	22
3.5.2.5	<i>Fontes Externas de Ruído</i>	22
3.5.2.6	<i>Ruído de Quantização</i>	23
3.5.3	<i>Ruído de Canais Iônicos</i>	23
3.5.4	<i>Performance Geral da MEA: Nível de Ruído</i>	25
3.6	Spikes e Bursts	25
3.6.1	<i>Spikes</i>	26
3.6.2	<i>Bursts</i>	28
Capítulo 4 – Processos Estocásticos e a Autocorrelação		30
4.1	Introdução	30
4.2	Processos Estocásticos	30
4.3	Correlação	31
4.4	Autocorrelação	32
4.4.1	<i>Propriedades da Autocorrelação</i>	32
4.4.2	<i>Densidade Espectral de Potência</i>	33
4.4.3	<i>Estimador da Autocorrelação</i>	33
4.5	Metodologia	35
4.6	Aplicação da Autocorrelação	36
4.6.1	<i>Sinais da MEA</i>	36
4.6.2	<i>Sinais da MEA: Spikes, Bursts e Ruído Biológico</i>	41

4.6.3	<i>Sinais de EEG</i>	44
4.7	Conclusões	46
Capítulo 5 – Segmentação do Sinal da MEA.....		50
5.1	Introdução	50
5.2	Predição Linear	51
5.2.1	<i>Predição Linear Futura</i>	51
5.2.2	<i>Filtro de Erro de Predição Futura</i>	51
5.2.3	<i>Algoritmo de Levinson-Durbin</i>	52
5.2.3.1	<i>Exemplo de Resolução do Algoritmo de Levinson-Durbin.....</i>	53
5.3	Técnica de Segmentação pelo SEM	56
5.3.1	<i>Algoritmo da Segmentação</i>	56
5.3.2	<i>Escolha de Parâmetros</i>	58
5.4	Avaliação da Técnica de Segmentação	60
5.4.1	<i>Resultados para Sinais EEG</i>	60
5.4.2	<i>Resultados para Sinais MEA.....</i>	64
5.5	Conclusões	68
Capítulo 6 – Conclusões e Trabalhos Futuros		70
6.1	Trabalhos futuros	71
Referências Bibliográficas.....		72
Anexo 1 – Estudo de Protocolo de Cultura de Neurônios em Ratos		76
1	Preparação da Pré-Cultura.....	76
2	Dissecação	77
3	Dissociação de Células	77
4	Manutenção da Cultura.....	78
5	Tempo Necessário	78
Anexo 2 – Interpretação dos Parâmetros κ_m e Δ_{m-1}		79

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Neurônio: partes funcionais importantes (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).	6
Figura 2.2 – Neurônio motor típico do SNC (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).	8
Figura 2.3 – Anatomia fisiológica de uma sinapse (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).	9
Figura 2.4 – Estrutura do córtex cerebral (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).	10
Figura 2.5 – Sistema Internacional 10/20 (Modificado (Cardoso, 2005)).	11
 Figura 3.1 – Fotografia de uma MEA. À esquerda, embalagem de uma MEA 200/30. À direita, a mesma MEA segurada na palma da mão.	13
Figura 3.2 – Modelo padrão de posicionamento dos eletrodos (Modificado de (Systems, 2005)).	15
Figura 3.3 – Posicionamento e dimensão dos eletrodos de uma MEA padrão (Modificado de (Systems, 2005)).	16
Figura 3.4 – High-Density MEA (Modificado de (Taketani & Baudry, 2006)).	19
Figura 3.5 – Esquema de Cadeia de Markov para canais iônicos voltagem-dependentes. (Modificado de (Steinmetz, Manwani, Koch, London, & Segev, 2000)).	24
Figura 3.6 – Nível padrão de ruído de uma MEA (Modificado de (Systems, 2005)).	25

Figura 3.7 – Registro de um canal de uma MEA. Ruído biológico e spikes (picos).	26
Figura 3.8 – Identificação de um Spike (Modificado de (Chiappalone, 2003)).	27
Figura 3.9 – Intensidade e Intervalo entre Bursts (Modificado de (Chiappalone, 2003)).	28
Figura 4.1 – Espaço amostral de um processo estocástico (Modificado de (Roger, 2009)).	31
Figura 4.2 – Autocorrelação para o Sinal 01_NoNeurons_01_12 : janelas de (A) 2 s, (B) 1 s, (C) 0,2 s e (D) 0,1 s.	39
Figura 4.3 – Autocorrelação para o Sinal Exp2_01_DIV41_nbasal1_1_12 : janelas de (A) 2 s, (B) 1 s, (C) 0,2 s e (D) 0,1 s.	40
Figura 4.4 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Ruído Biológico: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.	42
Figura 4.5 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Bursts: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.	42
Figura 4.6 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Spikes: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.	43
Figura 4.7 – Sinal EEG Com Evidência de Crise Epiléptica (Eletrodos F7-C3): janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.	45
Figura 4.8 – Sinal EEG Com Atividade Normal (Eletrodos F7-C3): janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.	45
Figura 4.9 – Sinal da MEA: trecho com sequência de spikes que formam um burst modulado por uma senóide de 2 Hz.	48
Figura 5.1 – Processo de segmentação. (a) Sinal EEG bruto. A barra indica a seção onde o filtro de predição linear é adaptado. (b) Resultado do erro de predição. A função de autocorrelação do erro de predição inicial é computada a partir da janela fixa; a função de autocorrelação corrente	

corresponde à janela móvel. (c) Limiar de segmentação. (d) SEM. (Modificado de (Bodenstein & Praetorius, 1977))	57
Figura 5.2 – Janela de entrada de dados do programa de segmentação do sinal da MEA.	59
Figura 5.3 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epiléptica. Eletrodos T5-C1, com duração de 10 s (Teste 1).	61
Figura 5.4 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epiléptica. Eletrodos T5-C1, com duração de 10 s (Teste 2).	62
Figura 5.5 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epiléptica. Eletrodos T6-C2, com duração de 10 s. O ajuste de parâmetros não conseguiu identificar a presença de uma alteração (nesse caso uma espícula) entre as amostras 850 e 1000, aproximadamente.	63
Figura 5.6 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epiléptica. Eletrodos T6-C2, com duração de 10 s. Uma pequena alteração no valor de Θ é suficiente para identificar a espícula e segmentar o sinal de forma mais eficiente.	64
Figura 5.7 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com ruído biológico. Imprecisão no ajuste dos parâmetros não permite segmentar de forma correta o sinal.	65
Figura 5.8 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com ruído biológico. Apesar de não ser possível identificar as mudanças no sinal, o programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos.	66
Figura 5.9 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com spikes isolados. O programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos, entretanto, não é possível perceber alterações que justifiquem determinados segmentos.	67
Figura 5.10 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com bursts. O programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos, entretanto, outros segmentos não conseguiram ser identificados.	68

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 – Sinal 01_Nbasal1_1_12: janela de 2 s.	38
Tabela 4.2 – Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: Todos os Sinais da MEA.	40
Tabela 4.3 – Variância do Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: Todos os Sinais da MEA. Unidades em s^2 .	41
Tabela 4.4 – Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: Ruído Biológico, Bursts e Spikes.	43
Tabela 4.5 – Variância do Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: Ruído Biológico, Bursts e Spikes. Unidades em s^2 .	43
Tabela 4.6 – Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: EEG Com Evidência de Crise Epiléptica.	46
Tabela 4.7 – Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: EEG Com Atividade Normal.	46
Tabela 5.1 – Valores de parâmetros para cada teste em sinal EEG.	60
Tabela 5.2 – Valores de parâmetros para cada teste em sinal MEA.	65

Lista de Acrônimos

ACF	<i>Autocorrelation Function</i> (Função de Autocorrelação)
ADC	<i>Analog to Digital Converter</i> (Conversor Analógico-Digital)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de Adenosina ou Adenosina trifosfato)
CRT	<i>Cathode Ray Tube</i> (Tubo de Raios Catódicos)
DIBE	<i>Department of Biophysical and Electronic Engineering</i>
EEG	Eletroencefalografia, Eletroencefalograma ou Eletroencefalográfico(a)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro Fetal Bovino)
GLR	<i>Generalized Likelihood Ratio</i> (Razão de Verossimilhança Generalizada)
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i> (Solução Salina Balanceada de Hank)
IBI	<i>Interbursts Interval</i> (Intervalo entre <i>Bursts</i>)
ISI	<i>Interspikes Interval</i> (Intervalo entre <i>Spikes</i>)
ITO	Óxido de Índio-Estanho
MATLAB	MATrix LABoratory [®]
MCS	Multi Channel Systems [®]
MEA	Matriz Multieletrodo
NBT	<i>Neuroengineering and Bio-nanoTechnology Group</i>
NLEO	<i>Non-Linear Energy Operator</i> (Operador de Energia Não-Linear)

PCI	<i>Peripheral Component Interconnect</i> (Interconector de Componentes Periféricos)
PDL	Poli-D-Lisina
PEVCD	Nitrito de Silício
PSD	<i>Power Spectral Density</i> (Densidade Espectral de Potência)
RMS	<i>Root Mean Square</i> (Valor Quadrático Médio, ou Valor Eficaz)
SEM	<i>Spectral Error Measurement</i> (Medida de Erro Espectral)
SNC	Sistema Nervoso Central
TiN	Nitrito de Titânio
TTX	Tetradotoxina

Capítulo 1

Introdução

Ao longo da história das ciências a Humanidade tem buscado compreender os mecanismos que envolvem a Natureza e as criaturas vivas. Não sendo suficiente observar e descrever os seres vivos, o Homem ainda se interessa por investigar as bases que fundamentam esses seres, suas estruturas e seu funcionamento.

Graças à curiosidade inata ao Ser Humano, as ciências se desenvolveram, permitindo que respostas fossem encontradas, mas que, principalmente, novos questionamentos surgissem. Os avanços tecnológicos permitiram incríveis resultados. Desde as suposições e postulados astronômicos de Aristóteles, tendo por base a geometria e a matemática, passando pela investigação espacial dos telescópios de Galileu Galilei, e chegando às viagens espaciais, o Homem sempre esteve em busca do *conhecer*.

Entretanto, um dos campos que mais intrigam os Homens são os próprios Seres Humanos. Como uma magnífica estrutura composta de carbono, hidrogênio e outros elementos químicos pode formar um corpo capaz de pensar, agir, locomover e questionar sobre si mesmo?

Seria muita pretensão discutirmos todos os aspectos que envolvem o Ser Humano: seu corpo, sua psique, sua ligação com algo superior chamado Deus, etc.

Este trabalho busca trazer uma ferramenta que possa contribuir com as pesquisas científicas desenvolvidas no ramo da investigação de sinais eletro-químicos de culturas de células neuronais.

Desde Franz Anton Mesmer (1734 – 1815), com seus estudos sobre o magnetismo animal (1779), passando por Luigi Galvani (1737 – 1798), com a eletricidade animal (1790), a *bioeletricidade* tornou-se um grande foco de interesse na pesquisa científica. Estudos de padrões elétricos do cérebro através da eletroencefalografia (EEG) implicaram em avanços nos campos das ciências e da medicina.

Estudos mais avançados do mecanismo neuronal, bem como da transmissão dos impulsos nervosos através dos neurônios, foram possíveis devido a técnicas mais avançadas como o *Patch-Clamp*, que permite o estudo de correntes em canais iônicos da membrana dessas células.

As matrizes multieletrodo (MEAs) vieram contribuir para este campo de estudo das ciências biológicas. Aliando conhecimentos biológicos a técnicas matemáticas e computacionais, este dispositivo permite estudos avançados sobre padrões de comportamento de culturas de neurônios (*in vitro*) e de tecidos biológicos, sendo que este pode ser feito diretamente sobre o tecido *in vivo*.

Os sinais captados pelas matrizes, bem como quaisquer tipos de sinais estudados pelas ciências exatas, exigem análise com base em ferramentas matemáticas e computacionais.

Entretanto, as ferramentas descritas nesta dissertação não têm a pretensão de encerrar o assunto acerca da segmentação de sinais de MEAs, mas sim abrir caminho para que novos trabalhos e novas ferramentas sejam desenvolvidos.

1.1 Motivação

É interessante pensar que as ciências exatas possam andar ao lado das ciências biológicas, e que as informações tratadas em uma possam ser de interesse a outra.

Poder contribuir para que este campo novo de estudo – o das culturas celulares através de matrizes multieletrodo – possa se desenvolver e gerar mecanismos de

instrumentação clínica que possibilitem ao Ser Humano resgatar sua saúde física, seja através de neuroimplantes ou de monitoramento, é o que nos impulsiona no desenvolvimento deste trabalho.

O campo é bastante extenso e são necessários conhecimentos das áreas das ciências biológicas (culturas celulares, mecanismos de geração e transmissão de impulsos nos neurônios, etc.) e exatas (fundamentação matemática e computacional, processamento de sinais, etc.) para que a pesquisa avance e encontre resultados satisfatórios.

Os sinais da MEA são geralmente bastantes extensos, chegando a registros de 20 minutos, com taxa de amostragem de 10 kHz. Isto implica em uma grande quantidade de informação. Porém, nem sempre é possível a análise de todo este volume de informação de uma única vez, sendo necessário segmentar o sinal para análise. Mas, como segmentar um sinal biológico sem que se perca informação útil e relevante?

Neste ponto, torna-se necessário o estudo sobre ferramentas matemáticas e computacionais que permitam a análise e a segmentação deste tipo de sinal.

1.2 Objetivo

Este trabalho objetiva o desenvolvimento de uma ferramenta computacional capaz de segmentar os sinais de matrizes multieletrodo (MEAs).

Para atingir este objetivo proposto, realizaram-se os seguintes passos:

- Estudar os processos fisiológicos que envolvem a geração de sinais em neurônios;
- Selecionar na literatura as principais técnicas matemáticas associadas à segmentação de sinais;
- Estabelecer critérios para o uso de ferramentas matemáticas associadas à segmentação de sinais através de testes computacionais;
- Desenvolver uma ferramenta computacional para segmentação dos sinais da matriz multieletrodo;
- Avaliar o aplicativo desenvolvido.

1.3 Estrutura da dissertação

Os capítulos desta dissertação estão organizados de forma que se possa perceber o caminho seguido para se atingir o objetivo proposto.

O Capítulo 2 apresenta uma breve descrição das bases fisiológicas dos mecanismos que envolvem as sinapses, a propagação dos sinais pelos neurônios e como estes sinais são captados no córtex cerebral, através da eletroencefalografia (EEG). No Capítulo 3 é apresentada uma visão geral sobre a matriz multieletrodo (MEA), além de informações sobre culturas, coleta de sinais. Há, também, uma breve explicação a respeito do processo de detecção de *spikes* e *bursts*. Apresentados os sinais de interesse, temos no Capítulo 4 uma breve descrição de processos estocásticos e da ferramenta matemática de autocorrelação. São apresentados, ainda nesse capítulo, resultados para aplicação da autocorrelação em sinais EEG e MEA. No Capítulo 5 temos a apresentação da técnica de segmentação através do SEM (*Spectral Error Measurement*) e informações importantes sobre as ferramentas que o compõem. São apresentados, também, resultados para a segmentação de sinais EEG e MEA. Por fim, no Capítulo 6 são analisadas as contribuições deste trabalho e são apresentadas sugestões para trabalhos futuros que poderão ser realizados a partir desta dissertação.

Capítulo 2

Mecanismos de Propagação dos Potenciais Elétricos e a Eletroencefalografia (EEG)

O objetivo deste capítulo é fazer uma breve descrição de como as sinapses são capazes de transmitir os sinais pelos neurônios e como se podem captar sinais de atividade elétrica do córtex cerebral através da eletroencefalografia.

2.1 Introdução

O sistema nervoso recebe milhões de bits de informação de diferentes nervos e órgãos sensoriais a todo instante. É a partir daí que determinadas respostas são tomadas pelo corpo (Guyton & Hall, 2006).

As informações, propriamente ditas, não são facilmente acessíveis, porém, ao se transmitir informações através de redes de neurônios, estes geram alterações nos campos elétricos em regiões próximas que podem ser captados por eletrodos bem posicionados. Seguindo este princípio, diversos cientistas estudaram formas de captar esta atividade elétrica e associar esta atividade com as informações transmitidas aí (Cardoso, 2005).

2.2 Fisiologia da Sinapse de um Neurônio

Em um neurônio (unidade básica funcional do sistema nervoso central), as informações chegam através de sinapses, a maioria localizada nos dendritos, mas também no corpo celular. Uma característica importante da maioria das sinapses é que o sinal normalmente viaja em uma única direção (*“forward direction”*) (Guyton & Hall, 2006).

A Figura 2.1 ilustra a estrutura de um neurônio cerebral, mostrando suas partes funcionais importantes.

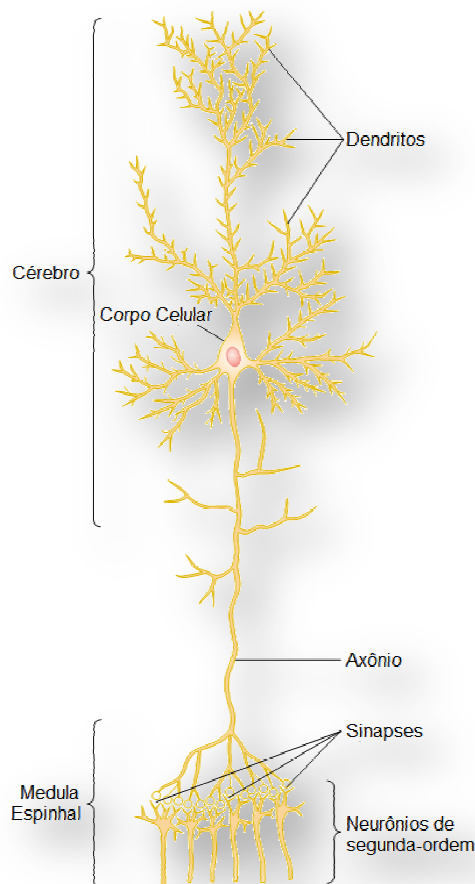


Figura 2.1 – Neurônio: partes funcionais importantes (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).

O processo de transmissão de informação através das sinapses é também responsável pela memória. Segundo (Guyton & Hall, 2006), cada vez que certos tipos de sinais

sensoriais passam através de uma sequência de sinapses, elas se tornam mais capazes de transmitir esse mesmo tipo de sinal na próxima vez. Esse processo é chamado de facilitação. Isso permite que os sinais gerados dentro do cérebro possam, eles mesmos, causarem transmissão de impulsos através das mesmas sequências de sinapses, gerando a percepção de experimentar a sensação original.

No sistema nervoso central (SNC), a informação é transmitida principalmente por potenciais de ação dos nervos (impulsos nervosos), através de uma sucessão de neurônios (Guyton & Hall, 2006). Cada impulso pode ser:

- Bloqueado em sua transmissão de um neurônio para outro;
- Mudado de um simples impulso para impulsos repetitivos;
- Integrado com impulsos de outros neurônios para causar padrões de impulsos altamente complexos em neurônios sucessivos.

As sinapses podem ser de origem elétrica ou química. Quase todas as sinapses do SNC são sinapses químicas (Guyton & Hall, 2006). Num neurônio motor anterior típico (Figura 2.2) temos as seguintes estruturas:

- *Soma*, ou corpo do neurônio;
- Axônio único, que sai do corpo indo em direção a um nervo periférico;
- Dendritos, que são ramos projetados do corpo do neurônio que circunda a região do neurônio.

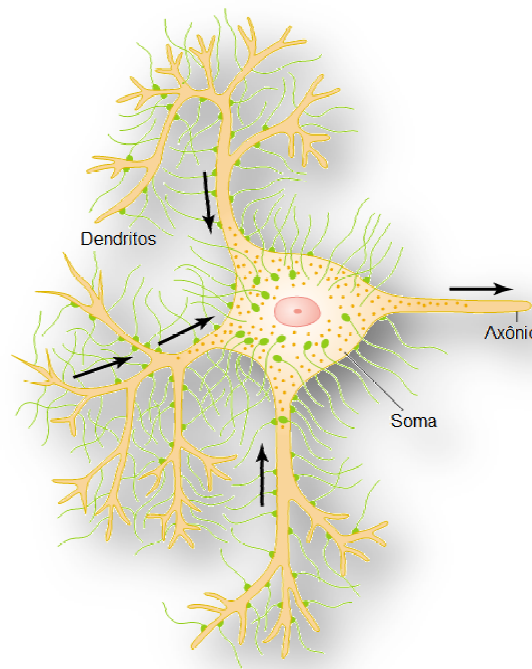


Figura 2.2 – Neurônio motor típico do SNC (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).

Uma quantidade de 10 mil a 200 mil botões sinápticos chamados de “terminais pré-sinápticos” jazem nas superfícies dos dendritos e soma do neurônio motor (Guyton & Hall, 2006). São terminações de fibrilas nervosas provenientes de muitos outros neurônios, e podem ser excitatórias ou inibitórias.

Os terminais pré-sinápticos (Figura 2.3) têm a forma de um botão oval, e é separado do corpo neuronal pós-sináptico por uma “fenda sináptica” (cerca de 200 a 330 Å). O terminal possui duas estruturas importantes para as funções excitatórias ou inibitórias:

- Vesículas transmissoras: são responsáveis por armazenar substâncias transmissoras, que podem inibir ou excitar a membrana pós-sináptica, dependendo da existência de receptores inibitórios ou excitatórios, respectivamente;
- Mitocôndrias: produzem ATP (adenosina tri-fosfato), que é a energia necessária para sintetizar novas substâncias transmissoras.

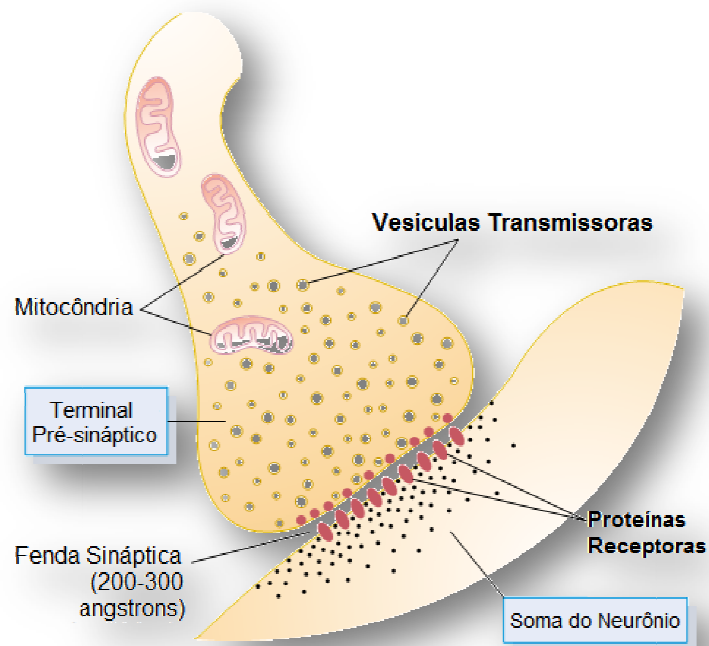


Figura 2.3 – Anatomia fisiológica de uma sinapse (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).

Quando um potencial de ação se espalha até um terminal pré-sináptico, a despolarização desta membrana causa um esvaziamento de um pequeno número de vesículas na fenda. O transmissor liberado causa uma mudança imediata na característica permeável da membrana neuronal pós-sináptica, dependendo das características do receptor neuronal. Se essa mudança gerar abertura de canais iônicos específicos, o neurônio pós-sináptico poderá propagar um novo pulso de potencial de ação para outro neurônio, ou simplesmente impedir a propagação do pulso.

2.3 Eletroencefalografia (EEG)

“O termo ‘eletroencefalograma’ é aplicado a potenciais do cérebro quando captados diretamente do córtex” (Windhorst & Johansson, 1999) através de eletrodos posicionados no escalpo (Yamaguchi, 2003). O que é registrado no EEG é o resultado da soma de potenciais derivados da mistura de correntes extracelulares geradas por

grupos de neurônios. As fontes de potenciais do escalpo são as células piramidais das camadas corticais III e V (Guyton & Hall, 2006).

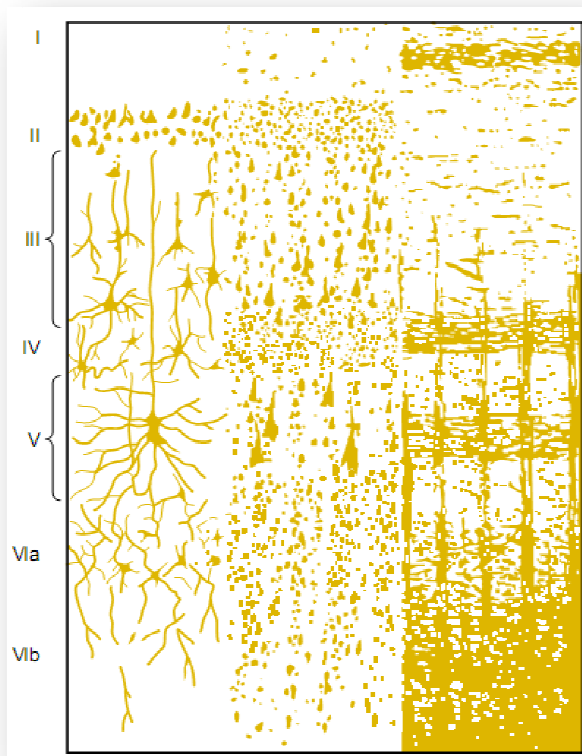


Figura 2.4 – Estrutura do córtex cerebral (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).

A análise dos sinais EEG forma um campo de interesse tanto na área de pesquisa científica como na clínica médica (Windhorst & Johansson, 1999). Neste ponto, o EEG se torna uma ferramenta essencial de investigação para o uso em jovens com epilepsia (Leach, Stephen, Salveta, & Brodie, 2006).

As amplitudes do EEG captados no escalpo estão entre 10 e 100 μ V, e em adultos mais comumente entre 10 e 50 μ V (Yamaguchi, 2003). Suas frequências podem ir desde muito baixas (ondas lentas) até frequências altas (ondas rápidas) (Windhorst & Johansson, 1999; Yamaguchi, 2003). Clinicamente estudam-se as frequências entre 0,1 Hz e 100 Hz. As componentes de frequência dentro desta faixa possuem características especiais e estão relacionadas com algum tipo de atividade específica desenvolvida no cérebro (Cardoso, 2005). Estas componentes podem ser classificadas como:

- *Ondas Delta*: 0,5 a 4 Hz – Estão relacionadas com sono profundo;
- *Ondas Teta*: 4 a 8 Hz – Estão relacionadas a estados de meditação, hipnose, sonolência e sonhos;
- *Ondas Alfa*: 8 a 13 Hz – Estão relacionadas com o estado de vigília com olhos fechados, em relaxamento mental ou meditação;
- *Ondas Beta*: 13 a 30 Hz – Estão relacionadas com o estado de vigília alerta;
- *Ondas Gama*: 30 a 60 Hz – Estão relacionadas com atividade mental intensa e alta concentração;
- *Ondas Lambda*: Acima de 60 Hz – Estão relacionadas com estados raros de consciência, como “consciência plena de si mesmo”; o mais alto estado de meditação.

Para a captação da atividade elétrica, eletrodos são posicionados no escalpo seguindo um padrão sugerido por Helbert Jasper, em 1958, aceito mundialmente e conhecido por *Sistema Internacional 10/20*.

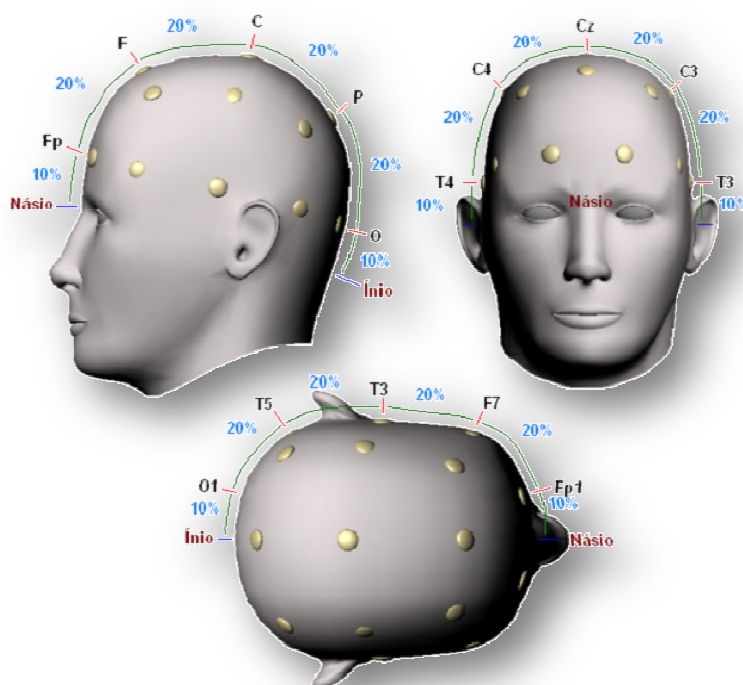


Figura 2.5 – Sistema Internacional 10/20 (Modificado (Cardoso, 2005)).

Capítulo 3

Matriz Multieletrodo (MEA) e seu Sinal

Neste capítulo é apresentada uma visão geral sobre o dispositivo MEA, mostrando suas características e potencialidades, além de informações sobre coleta de sinais e a possibilidade de presença de ruídos durante a coleta. Há, ainda, uma breve explicação a respeito do processo de detecção de spikes e bursts.

3.1 Introdução

A matriz multieletrodo (MEA) é um dispositivo eletrônico utilizado tanto para captação de atividades elétricas extracelulares como para eletroestimulação de grupos de células. É um equipamento bastante útil para o estudo da dinâmica de grupos celulares, seja *in vitro* ou *in vivo*. Entretanto, a utilização desse tipo de dispositivo implica cuidados na sua manipulação, bem como na preparação das culturas a serem analisadas.

Para permitir uma investigação pormenorizada da dinâmica celular, estes dispositivos possuem um conjunto de eletrodos que podem possuir diversas configurações de posicionamento. Basicamente, o dispositivo é constituído por: uma câmara de cultura, onde se deposita a cultura de células, e um conjunto de microeletrodos, os quais são posicionados segundo um padrão – o posicionamento dos eletrodos pode depender do tipo de cultura a ser analisada.

Na Figura 3.1 são apresentadas fotografias de uma MEA.

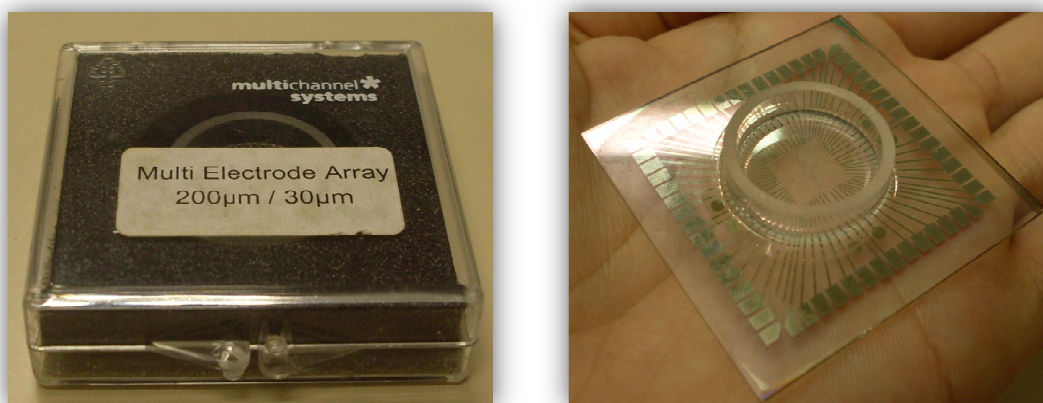


Figura 3.1 – Fotografia de uma MEA. À esquerda, embalagem de uma MEA 200/30. À direita, a mesma MEA segurada na palma da mão.

MEAs têm sido utilizadas para análises de culturas de neurônios (Klisch et al., 2009), permitindo uma avaliação da atividade elétrica espontânea dos neurônios com, ou sem, a presença de alguma droga. Ao se analisar os sinais da MEA deve-se considerar a interação entre os neurônios, e através da detecção de *spikes* e *bursts* avaliar a dinâmica celular.

Diversos cuidados devem ser tomados para evitar ruídos durante a captação e digitalização do sinal da MEA.

3.2 Histórico da MEA

Há quase 40 anos atrás, em 1972, foi publicado o primeiro trabalho (Thomas Jr., Springer, Loeb, Berwald-Netter, & Okun, 1972) sobre a utilização de uma matriz com microeletrodos planares utilizada para captação da atividade elétrica de culturas celulares.

A MEA utilizada para os testes consistia de um dispositivo fabricado em vidro com duas fileiras de gravação com 15 eletrodos de ouro cada, espaçadas de 100 µm. Esse dispositivo foi aplicado no estudo de cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal (Taketani & Baudry, 2006).

Sem conhecimentos do trabalho anterior, Gueter Gross e seus colaboradores propuseram, em 1977, a ideia de um dispositivo multieletrodo em matriz. Consistia-se de 36 eletrodos de ouro com diâmetro de 10 μm e espaçados de 100 ou 200 μm (Taketani & Baudry, 2006).

O primeiro registro bem sucedido de neurônios dissociados foi reportado por Jerome Pine em 1980 (Pine, 1980). Utilizando uma matriz multieletrodo com duas linhas paralelas de 16 eletrodos, com diâmetro de 10 μm e espaçamento de 250 μm , Pine captou o registro da atividade de neurônios dissociados do gânglio cervical superior de ratos em uma cultura de três semanas, após ter formado uma rica rede de interconexão (Taketani & Baudry, 2006).

Os registros captados chegaram à ordem de 50 μV , com razão sinal-ruído de 5 a 15:1. Foi descoberto, também, que os eletrodos poderiam ser utilizados para eletroestimulação, com pulsos de 0,5 V e duração de 1 ms.

Em 1982, Gross observou que a atividade espontânea parecia ter uma relação com a temperatura ambiente abaixo de 30 °C, decrescendo rapidamente com baixas temperaturas no ambiente (Taketani & Baudry, 2006).

Entre 1986 e 1988, Wheeler e Novak construíram matrizes multieletrodo passivas de 8 x 4, com 32 eletrodos de 20 μm de diâmetro e 200 μm de espaçamento. Foram registradas atividade de fatias de hipocampo (Wheeler & Novak, 1986).

Dentre outras pesquisas realizadas nessa mesma época, em 1989, Meister e seus colaboradores (Meister, Pine, & Baylor, 1989; Meister, Pine, & Baylor, 1994; Meister, Wong, Baylor, & Shatz, 1991) realizou estudo de retina de salamandra, posicionando uma camada de células ganglionares da retina sobre uma “*Pine lab* MEA” (Taketani & Baudry, 2006) e iluminando-a com um monitor CRT com padrões luminosos diferentes, podendo-se perceber sinais extracelulares bastantes claros.

Esses e muitos outros trabalhos foram realizados utilizando matrizes multieletrodo, e desde então, MEAs têm sido utilizadas para captação e análise de sinais de culturas de células dissociadas e de redes neuronais mais complexas, bem como para a captação de atividades em fatias de tecidos reais.

3.3 MEA: Visão Geral

3.3.1 Gravação Extracelular com a MEA

A MEA possui como modelo padrão típico um arranjo de 60 eletrodos, posicionados em formato matricial 8 x 8, sendo que não há eletrodos nas quatro extremidades da matriz, conforme mostrado na Figura 3.2 abaixo:

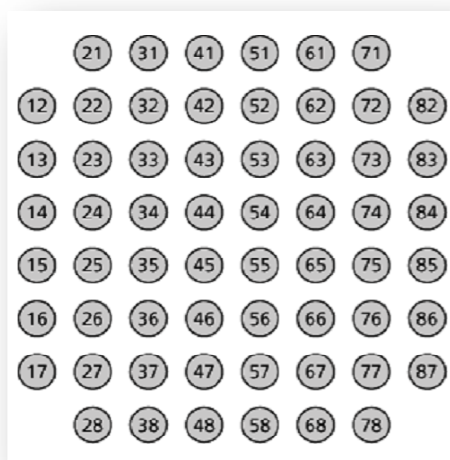


Figura 3.2 – Modelo padrão de posicionamento dos eletrodos (Modificado de (Systems, 2005)).

Qualquer modelo de MEA pode ser utilizado tanto para gravação de atividade celular como para eletroestimulação das culturas. A estrutura do equipamento permite também que culturas celulares sejam preparadas diretamente sobre a matriz.

Os sinais captados pelos eletrodos da MEA são amplificados e filtrados, e enviados para um computador para posterior análise.

As MEAs podem ser fabricadas em vários formatos, dependendo da sua aplicação. Inicialmente as MEAs possuíam eletrodos de ouro, mas com o tempo diversos outros tipos de materiais foram utilizados na fabricação do dispositivo.

3.3.2 Projeto e Produção da MEA

A área de gravação possui dimensão quadrada de 700 μm a 5 mm de comprimento, contendo, conforme dito anteriormente, 60 eletrodos posicionados numa matriz 8 x 8, com uma distância intereletrodo de 100, 200 ou 500 μm .

O biosensor padrão possui uma superfície planar circular, disponível nos tamanhos 10, 20 e 30 μm de diâmetro para os modelos de nitrato de titânio (TiN). Eletrodos 3D de platina (Pt) tem diâmetro de 40 μm na base com uma ponta muito fina (Systems, 2005).

A amostra biológica pode ser colocada diretamente na área de gravação. Para isto, a MEA possui controlador de temperatura. Porém, a região de contato tem que ser coberta com procedimentos padrões antes do uso para melhorar a fixação da célula e o crescimento da mesma.

A escolha do layout da MEA deve ser de acordo com o tipo de cultura desejada. Quanto menor a distância entre os eletrodos e o material a ser analisado, maior a intensidade do sinal, e quanto maior a densidade de células, maior a chance de se obter um sinal.

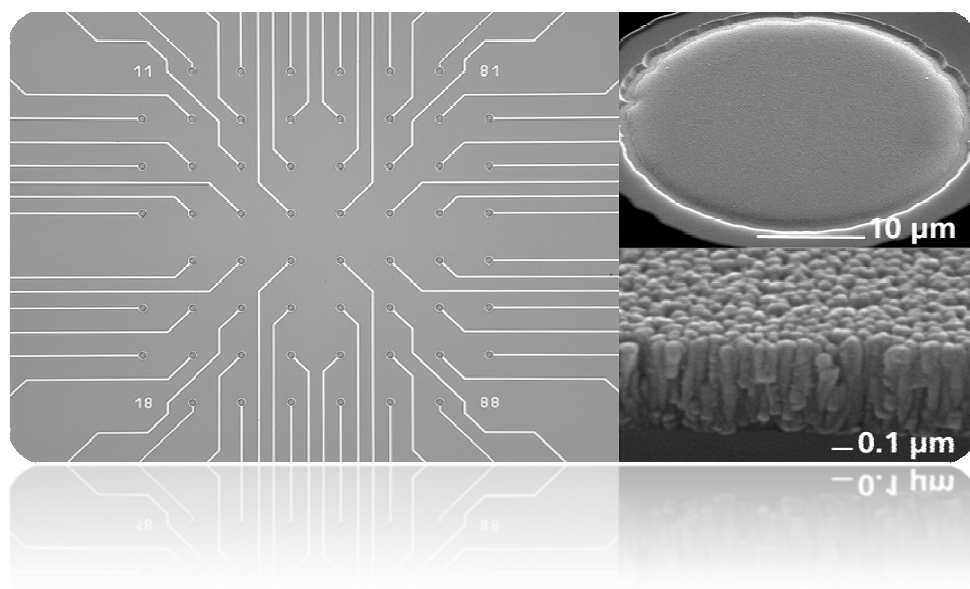


Figura 3.3 – Posicionamento e dimensão dos eletrodos de uma MEA padrão (Modificado de (Systems, 2005)).

3.3.3 Eletrodos, Trilhas e Isolamento

Os eletrodos compostos por TiN são bastantes estáveis. MEAs com este tipo de material podem durar muito tempo, até aproximadamente um ano. A impedância é de 20 e 400 k Ω , dependendo do diâmetro do eletrodo.

Devido à sua estrutura estável, quase todas as MEAs podem ir para o autoclave, com exceção das *Flex MEAs*.

Os eletrodos são embebidos em um material carreador, para fazer a transdução do sinal químico da atividade celular para sinal elétrico no eletrodo. O material utilizado geralmente é o vidro. Entretanto pode ser alterado, dependendo do tipo de cultura utilizada.

As trilhas padrão são feitas de titânio ou óxido de índio-estanho (ITO), e são isoladas eletricamente com nitrido de silício (PEVCD).

3.4 Tipos de MEAs e *Layouts*

Os tipos de MEAs se diferem por:

- Materiais carreadores utilizados;
- Área de gravação;
- Geometria:
 - Diâmetro do eletrodo;
 - Distância intereletrodo.

A geometria é responsável por definir a categoria, e o código utilizado possui dois números: o primeiro número está relacionado com a distância intereletrodo, e o segundo com o diâmetro do eletrodo. Por exemplo, a MEA 100/10 possui distância intereletrodo de 100 μm e eletrodos com diâmetro de 10 μm .

As versões *standard* estão disponíveis com um eletrodo interno de referência, cuja abreviatura é i. r..