

3.4.1 *Standard* MEAs

A MEA padrão possui 60 eletrodos em um *layout* de 6 x 10, ou de 8 x 8, conforme apresentado anteriormente na Figura 3.2. Encontram-se disponíveis com vários padrões: 100/10, 200/10, 200/10 i. r., 200/30, 200/30 i. r., 500/30 i. r., 500/10 i. r.. Possui eletrodos planos circulares feitos de TiN, e as trilhas são feitas de titânio ou ITO (material transparente, o que permite manipulação por microscópio ótico). O material utilizado para isolamento é nitrito de silício.

Estas MEAs podem ser usadas para uma larga variedade de aplicações, desde culturas de neurônios dissociados a fatias de tecidos posicionados diretamente sobre os eletrodos.

3.4.2 *Thin* MEAs

Este tipo de MEA possibilitou uma combinação de gravação e imagem. MEAs do tipo *standard* possuem uma base de 1 mm de espessura, o que impossibilitava que a cultura fosse observada com microscópios invertidos, mesmo com lentes potentes. Para solucionar esse problema, as *thin* MEAs foram construídas com espessura de apenas 180 μm e com contatos feitos de ITO.

3.4.3 *High-Density* MEAs

Por diversas razões, resolução espacial se torna importante, principalmente quando se realiza medidas onde a velocidade de condução ou atrasos de sinapses necessitam de precisão para uma longa distância.

As MEAs de alta densidade (*high-density*) podem possuir uma quantidade muito grande de eletrodos (256 eletrodos) com pequeno espaçamento (100 μm), cobrindo uma área de cerca de 2,8 x 2,8 mm (Figura 3.4).

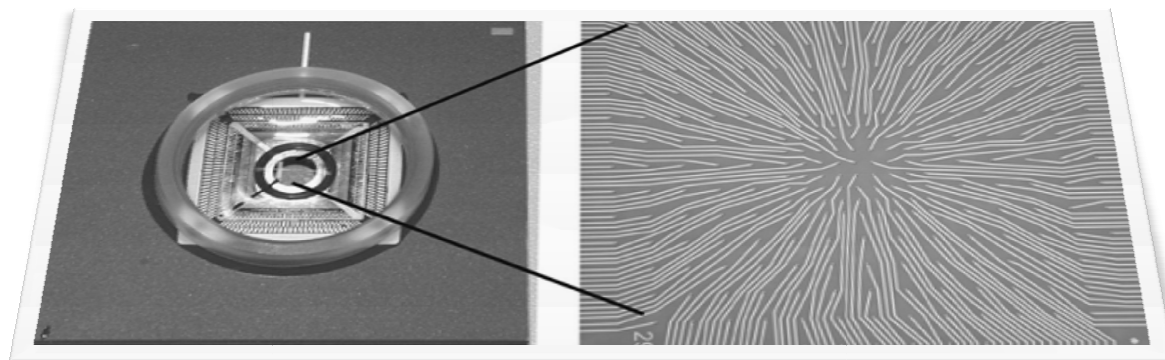


Figura 3.4 – *High-Density MEA* (Modificado de (Taketani & Baudry, 2006)).

3.4.4 Outros Tipos de MEAs

Outros tipos de MEAs também existem disponíveis, como a *Flex MEA*, cujo material polimérico é flexível e permite ser utilizada diretamente sobre tecidos in vivo. São comumente utilizadas em eletrocortigramas do córtex somato-sensorial de ratos e para estimulação elétrica na mesma região (Taketani & Baudry, 2006).

Outro tipo importante de MEA são as 3D MEAs, utilizadas para gravação de fatias de tecidos. Este tipo de MEA possui eletrodos pontiagudos que permitem uma maior área de contato com o tecido e possui uma boa relação sinal-ruído.

3.4.5 MEA60 System

O MEA60 System foi apresentado originalmente pela *Multi Channel Systems*[®] (MCS), em 1996, e desde então tem sido utilizado por pesquisadores para uma grande variedade de aplicações.

Mais informações sobre a MCS e os modelos de MEA fabricados pela empresa, podem ser acessados em (Systems, 2008).

3.5 Coleta de Sinal e Ruído

3.5.1 Coleta de Sinais em MEAs

Os sinais coletados através da MEA correspondem aos sinais eletroquímicos da atividade externa aos neurônios, compreendendo a soma das atividades de grupos de neurônios posicionados próximos a um eletrodo.

Esses sinais eletrofisiológicos foram adquiridos na Universidade de Gênova, Itália, pelo aluno Danilo Roman Campos, da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando o sistema MEA60. Foram realizadas culturas primárias de neurônios corticais e do hipocampo de rato, extraído-se o tecido de embriões com 18-19 dias de desenvolvimento, após anestesia, e tomados todos os cuidados necessários estipulados pelo Comitê de Ética da Universidade de Gênova. Detalhes associados à preparação das culturas podem ser encontrados em (Novellino et al., 2003) e no **Anexo 1**.

O *setup* de aquisição dos sinais foi conforme se segue:

- Conectou-se a MEA a um banco de 60 amplificadores integrados (cada qual associado a um microeletrodo), montados em suporte conjunto, compreendendo os estágios de pré-amplificação e amplificação, com ganho total absoluto de 1200;
- Utilizou-se um regulador de temperatura, um computador pessoal equipado com uma placa PCI de aquisição de dados para monitoramento em tempo real, um microscópio invertido, uma mesa antivibratória e uma gaiola de Faraday;
- Os dados foram monitorados e gravados usando o software comercial *MCRack* (MCS);
- Cinco culturas foram monitoradas, com o objetivo de obter boa representatividade estatística associada à variabilidade biológica.

A obtenção de cada um dos cinco conjuntos de sinais é denominada “um experimento”, cujo procedimento é descrito a seguir:

- Cada MEA foi retirada da estufa de CO₂ e colocada sobre o respectivo banco de amplificadores;
- Após 20 minutos da deposição da cultura sobre os eletrodos, com o objetivo de permitir às células se adaptarem ao novo ambiente, iniciaram-se as medidas;
- Em seguida, para cada cultura, foram coletados quatro registros consecutivos de sinal de atividade neural espontânea. Cada registro tem duração de 5 minutos, totalizando 20 minutos de coleta de dados para cada MEA.

Deve-se destacar que cada sessão completa de 20 minutos foi realizada para uma única cultura, de forma que as MEAs foram medidas individualmente, sendo uma MEA medida subsequentemente à outra. Justificativas práticas do ponto de vista de instrumentação e da fisiologia, para tal procedimento, podem ser encontradas em (Novellino et al., 2003).

3.5.2 Ruído em Medidas Eletrofisiológicas

Existe uma idéia geral de que ruídos são distúrbios, interferências que ocorrem quando se mede um determinado sinal. Em medidas de sinais eletrofisiológicos, estes ruídos podem resultar dos próprios instrumentos de medida (eletrodos), da instrumentação eletrônica (amplificadores), de fontes externas (lâmpadas fluorescentes, monitores, vibrações mecânicas, etc.) e de processos de digitalização do sinal.

Algumas considerações iniciais sobre os tipos fundamentais de ruídos são importantes para uma melhor compreensão. Estes tipos de ruídos possuem natureza aleatória; suas propriedades estatísticas podem ser medidas, porém valores absolutos num determinado tempo não podem ser medidos. A medida mais conveniente da amplitude do ruído dá-se por valores em RMS (*Root Mean Square*). A maioria dos ruídos possui uma distribuição Gaussiana (Lathi, 2003).

Alguns tipos de ruídos podem ser eliminados, bastando-se para isto conhecer a largura de faixa ou de banda na qual ele é observado para que se use um filtro adequado. Na ocorrência de várias fontes de ruído, o ruído que possuir maior amplitude em rms será o ruído dominante no tempo.

3.5.2.1 Ruído Térmico

O ruído térmico é resultado do movimento de cargas excitadas num condutor. É conhecido como *Jonhson noise* ou *Nyquist noise*. Para o resistor, o ruído térmico pode ser representado como fonte de tensão ou como fonte de corrente. Na densidade espectral de potência (PSD) o ruído térmico é branco, ou seja, não varia com a frequência. Observa-se também que o ruído térmico da fonte de tensão aumenta com o aumento da resistência, enquanto que o ruído térmico da fonte de corrente diminui com o aumento da resistência (Lathi, 2003).

3.5.2.2 Ruído de Disparo

O ruído de disparo surge quando o fluxo de corrente ultrapassa uma barreira de potencial. Ocorre geralmente em dispositivos semicondutores a partir das suas junções, como, por exemplo, a junção P-N (Lathi, 2003).

3.5.2.3 Ruído de Dielétrico

Os ruídos de dielétricos são gerados por materiais que possuem propriedades capacitivas, ou seja, de isolamento elétrica (Lathi, 2003). A fonte mais importante deste tipo de ruído em eletrofisiologia são vidros, em especial em pipetas de *Pacth-Clamp*.

3.5.2.4 Ruído de Excesso

Ruídos de excesso ocorrem quando é adicionado algum ruído fundamental a outro ruído já presente num circuito ou num dispositivo elétrico (Lathi, 2003).

3.5.2.5 Fontes Externas de Ruído

A interferência proveniente de fontes externas é quase completamente eliminada em um sistema bem projetado, mas pode tornar-se a fonte de ruído dominante se precauções apropriadas não forem tomadas. A forma mais comum de interferência é a frequência da rede elétrica (50 ou 60 Hz) de dispositivos de potência, luzes fluorescentes, etc. Outras fontes potenciais de interferência são motores posicionados próximos aos locais de medidas, elevadores, estações de rádio e televisão e vídeos monitores de computadores (Lathi, 2003).

Na maioria dos casos, tais ruídos podem ser controlados através de aterramento, blindagem e filtragem. Outra possível fonte de ruído externa é a vibração mecânica, que

pode ser transmitida através do chão ou através do ar, e um isolamento adequado dessa vibração é sempre necessário para medidas eletrofisiológicas sensíveis, como é o caso da MEA.

3.5.2.6 Ruído de Quantização

Quantização é a aproximação de cada valor de um sinal por um múltiplo inteiro de uma quantidade elementar δ , que é o passo de quantização. Para um conversor analógico-digital (ADC) de 12 bits cujo fundo de escala varia de -10 a +10V, $\delta = 4,88$ mV; para um conversor analógico-digital de 16 bits com mesmo fundo de escala, $\delta = 305$ μ V. Esta aproximação leva a adição de um sinal de ruído ao sinal original (Widrow & Kollár, 2008). Este ruído é chamado *ruído de quantização*.

3.5.3 Ruído de Canais Iônicos

Uma das maiores fontes de ruído entre neurônios são os canais iônicos voltagem-dependentes incrustados na membrana neuronal (Steinmetz, Manwani, Koch, London, & Segev, 2000). Canais de um único íon são macromoléculas, contudo, e variam aleatoriamente entre estados conformacionais discretos devido à agitação térmica. Quando isso ocorre entre estados de condução e não-condução, o canal atua como uma fonte microscópica de corrente de ruído que é injetada na célula (Manwani, Steinmetz, & Koch, 2000; Steinmetz, Manwani, Koch, London, & Segev, 2000). Esta corrente pode mudar o comportamento dos *spikes* dos neurônios.

A condutância de um canal iônico voltagem dependente é dada por (3.1):

$$g_i(V_m, t) = \gamma_i m^M h^H, \quad (3.1)$$

na qual m e h são variáveis determinísticas e contínuas assumindo valores entre 0 e 1 e obedecem a cinética de 1ª ordem:

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} &= \frac{m_\infty(V_m) - m}{\tau_m(V_m)} \\ \frac{dh}{dt} &= \frac{h_\infty(V_m) - h}{\tau_h(V_m)} \end{aligned} \quad (3.2)$$

Em modelos estocásticos, canais iônicos voltagem-dependentes são modelados como cadeias de Markov de estados discretos com taxa de transição voltagem-dependente entre os diferentes estados conformacionais (Manwani, Steinmetz, & Koch, 2000; Steinmetz, Manwani, Koch, London, & Segev, 2000). Nos modelos de Markov de estados-finitos, as variáveis de estado n , m , e h denotam as probabilidades de que os portões de ativação e inativação estejam abertos, e α_i e β_i denotam as probabilidades de transição condicional entre diferentes estados (Figura 3.5).

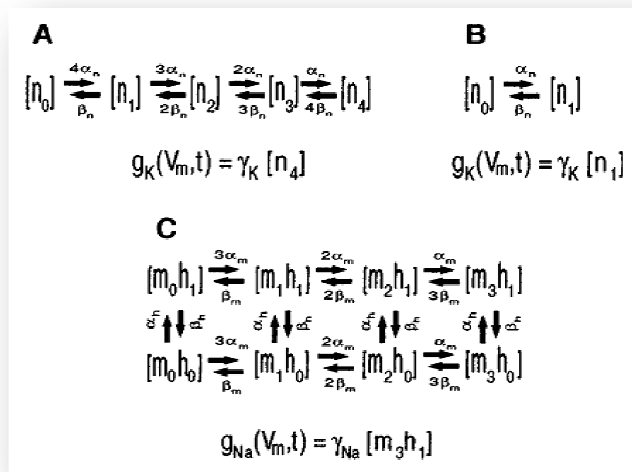


Figura 3.5 – Esquema de Cadeia de Markov para canais iônicos voltagem-dependentes. (Modificado de (Steinmetz, Manwani, Koch, London, & Segev, 2000)).

Nos dendritos, corpo celular e zona de gatilho, a flutuação estocástica de canais iônicos individuais representa uma origem significativa de ruído celular.

Pelo modelo cinético (Manwani, Steinmetz, & Koch, 2000; Steinmetz, Manwani, Koch, London, & Segev, 2000), a abrangência dessas flutuações é determinada pelo número de canais iônicos, pelo seu estado de condutância e pelo tempo de transição entre os estados. A flutuação de potencial na membrana, gerada por canais iônicos estocásticos, é geralmente menor que 2 mV.

3.5.4 Performance Geral da MEA: Nível de Ruído

Os amplificadores da MEA possuem um nível máximo de ruído de $\pm 8 \mu\text{V}$. Esse nível de ruído depende da dimensão do eletrodo e do material condutor utilizado. Regra geral, pode-se dizer que quanto menor o eletrodo, maior é o nível de ruído.

O nível total máximo de ruído para uma MEA e amplificador deve ser da ordem de $\pm 40 \mu\text{V}$, pico a pico, para eletrodos de TiN de $10 \mu\text{m}$, e $\pm 10 \mu\text{V}$ para eletrodos de TiN de $30 \mu\text{m}$ (Systems, 2005).

A Figura 3.6 abaixo mostra o nível padrão de ruído de uma MEA visto em um monitor de computador.

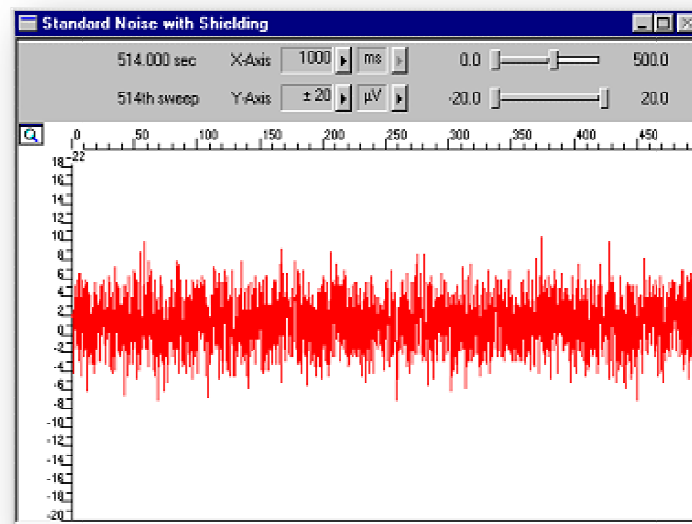


Figura 3.6 – Nível padrão de ruído de uma MEA (Modificado de (Systems, 2005)).

3.6 Spikes e Bursts

Como apresentado anteriormente, sabe-se que as MEAs são capazes de registrar atividade elétrica de um grupo de neurônios, sendo essa atividade extracelular espontânea ou eletroestimulada. Além disso, esse sinal extracelular possui amplitude da ordem de 20 a $40 \mu\text{V}$ e frequência de amostragem entre 5 e 48 kHz.

3.6.1 Spikes

Um sinal gravado a partir de uma MEA possui uma parte constituída de picos e outra parte sem atividade elétrica denominada *ruído biológico*. Os picos são considerados como atividade elétrica extracelular dos grupos de neurônios e são chamados de *spikes*.

Um sinal de MEA é mostrado na Figura 3.7 abaixo.

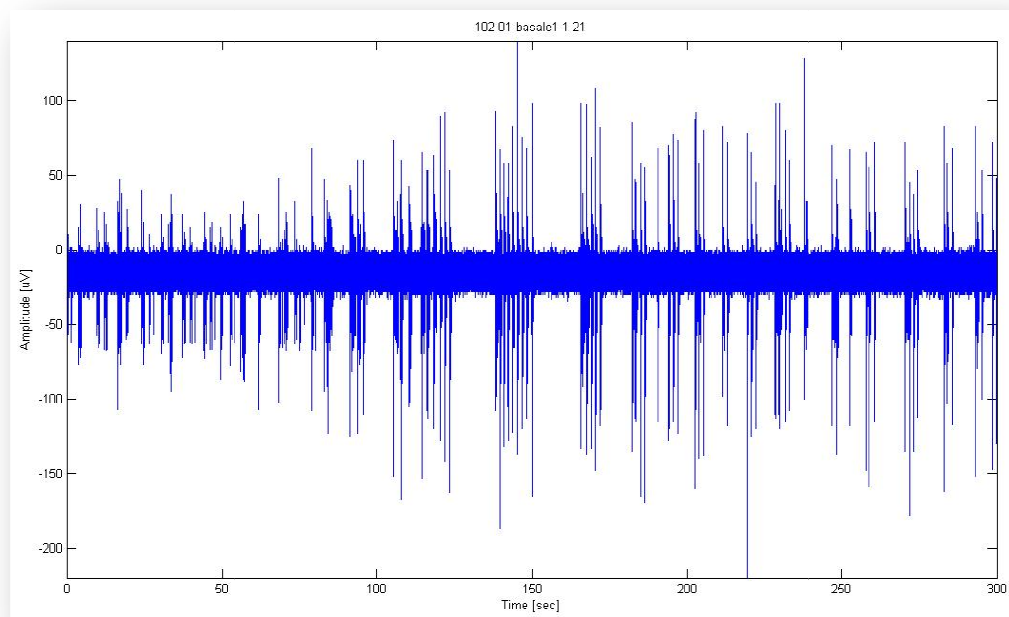


Figura 3.7 – Registro de um canal de uma MEA. Ruído biológico e spikes (picos).

Um conjunto de *spikes*, então, é uma sequência de impulsos nervosos ou potências de ação, produzidos por um ou mais neurônios, sendo o mesmo observado por um período de tempo relativamente longo (Chiappalone, 2003). Os *spikes* são considerados como a parte mais importante no sinal, estando a informação contida neles e no atraso entre dois deles.

Matematicamente, um *trem de spikes* é definido por (3.3):

$$ST(t) = \sum_{s=1}^N \delta(t - t_s), \quad (3.3)$$

na qual N é o número de *spikes* detectados na sequência e t_s é o tempo de amostragem (Chiappalone, 2003).

Para que um *spike* seja detectado é preciso estabelecer um valor de *threshold* (limiar) que é calculado como múltiplo do desvio padrão, sendo o desvio padrão calculado sobre o ruído biológico. Segundo (Chiappalone, 2003) o valor de limiar a ser adotado é de 7 ou 8.

Utilizando-se o esquema mostrado na Figura 3.8 abaixo, é possível detectar um *spike*. Para isso, o sinal elétrico deve ser dividido em janelas, cuja posição varia até percorrer todo o sinal. Cada uma dessas janelas deve conter pelo menos um *spike*. Para realizar o armazenamento do *spike*, deve-se comparar os valores dos pico máximo e pico mínimo (existentes dentro de uma janela) com o valor de *threshold* calculado. Se os valores do pico máximo e pico mínimo dentro da janela forem maior e menor, respectivamente, que o valor de *threshold*, um *spike* será armazenado.

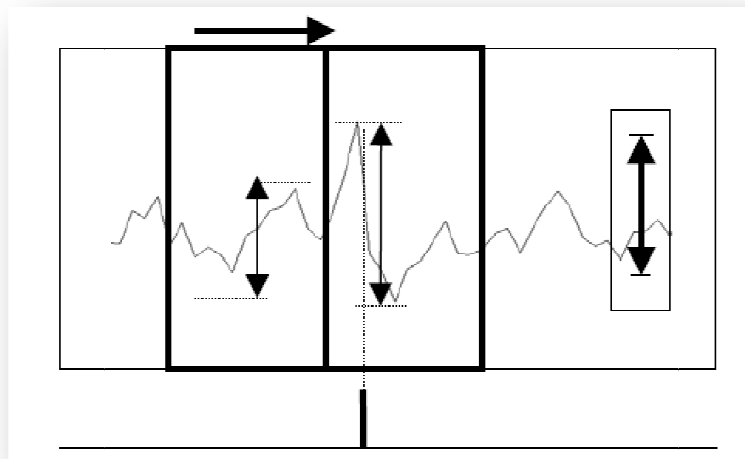


Figura 3.8 – Identificação de um Spike (Modificado de (Chiappalone, 2003)).

A partir da análise dos *spikes* é possível extrair os seguintes parâmetros:

- Número total de *spikes*;

- Quantidade de *spikes* que formam *bursts*;
- Porcentagem de *spikes* randômicos;
- Frequência média de picos em um *burst* (*picos/s*);
- Frequência média de *spikes* em um *burst* (*spikes/s*).

3.6.2 Bursts

Um *burst* é uma sequência de *spikes* (5 a 10 *spikes*) que possuem duração igual a soma de todos os ISI (intervalos entre *spikes*) contidos num mesmo conjunto. O valor padrão de *threshold* estabelecido para detecção de *bursts* é de 0,4 *bursts/min* (Chiappalone, 2003).

Os *spikes* contidos em um *burst* deve possuir um ISI máximo na ordem de 100 ms (Chiappalone, 2003). O intervalo entre *bursts* (IBI) deve ter duração mínima de 100 ms.

Um trem de bursts é definido matematicamente por (3.4):

$$BT(t) = \sum_{b=1}^M \left(A_b \Pi \left(\frac{t - t_b - \frac{\tau_b}{2}}{\tau_b} \right) \right) \text{ e } A_b = \frac{1}{\tau_b} \int_{\tau_b} \sum_{s=1}^N \delta(t - t_s) dt = \frac{N_{\tau_b}}{\tau_b}, \quad (3.4)$$

na qual M é o número total de *bursts* e t_b é o tempo de ocorrência de um *burst* (Chiappalone, 2003). A análise matemática desta equação é mostrada na Figura 3.9 abaixo.

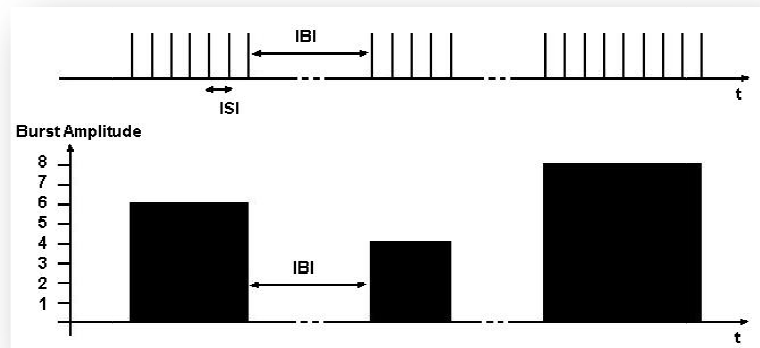


Figura 3.9 – Intensidade e Intervalo entre Bursts (Modificado de (Chiappalone, 2003)).

A análise de *bursts* permite obter:

- Taxa média de *bursts* (*bursts/min*);
- Número total de *bursts*;
- Média de *spikes* por *bursts*;
- Duração dos *bursts* (em *ms*);
- Intervalo entre *bursts* (em *s*).

Como os dados coletados em um simples experimento chegam à ordem de Gigabytes, utilizou-se um software desenvolvido pelo NBT-DIBE (*Neuroengineering and Bio-nanoTechnology Group* – NBT, *Department of Biophysical and Electronic Engineering* – DIBE) da Universidade de Gênova para análise estatística detalhada dos dados captados a partir das MEAs. Essa ferramenta de software é denominada *Spike Manager* (Vato et al., 2004).

Capítulo 4

Processos Estocásticos e a Autocorrelação

Neste capítulo será apresentada uma breve descrição de processos estocásticos e a ferramenta matemática de autocorrelação, que define o “grau de relação” entre as amostras de um dado sinal. São apresentados, também, resultados para a autocorrelação de sinais de diversas culturas de neurônios, captados através da MEA. Uma comparação com resultados de autocorrelação para sinais eletroencefalográficos também é apresentado nesta seção.

4.1 Introdução

Ao se trabalhar com processamentos de sinais deve-se levar em consideração a aleatoriedade da variável analisada. Variáveis aleatórias implicam considerações importantes e tratamento matemático diferente de variáveis deterministas. No caso de processamento de sinais biológicos, a aleatoriedade do sinal pode estar na amplitude do valor medido.

4.2 Processos Estocásticos

Sendo X um processo estocástico no tempo, tem-se que $X(t)$ define uma função do tempo t . A Figura 4.1 apresenta um processo onde diferentes experimentos são realizados, definindo funções $X_n(t)$. As funções amostra $X_n(t)$ do processo são, cada

uma delas, funções da variável tempo. Para um instante fixo t_k os valores das diversas funções amostra constituem uma variável aleatória no conjunto das funções amostra: $\{X(t_k)\} = \{x_1(t_k), x_2(t_k), \dots, x_n(t_k)\}$. Instantes diferentes corresponderão a variáveis aleatórias diferentes. Define-se, então, que um *Processo Estocástico* é a designação atribuída ao conjunto destas variáveis aleatórias (Roger, 2009).

Assim, para uma variável aleatória, o resultado de uma experiência aleatória é um número, enquanto que para um processo aleatório, o resultado de uma experiência aleatória é uma função do tempo (função amostra do processo aleatório).

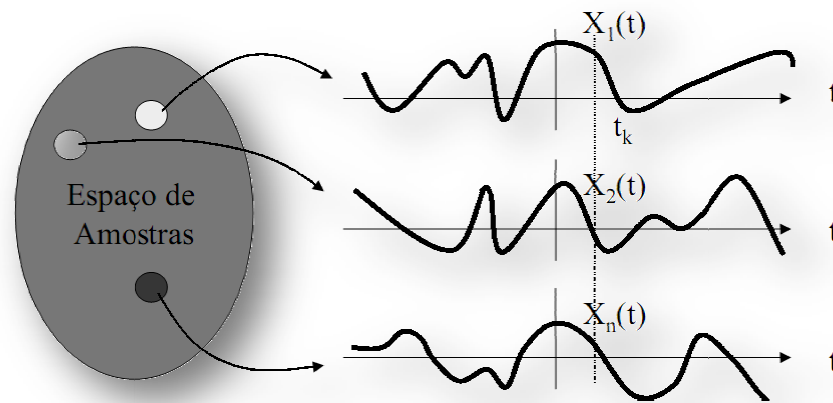


Figura 4.1 – Espaço amostral de um processo estocástico (Modificado de (Roger, 2009)).

4.3 Correlação

A correlação, definida pelo *coeficiente de correlação de Pearson*, indica a medida da relação linear entre duas variáveis aleatórias. Matematicamente, a correlação é dada por:

$$R(t_1, t_2) = E[(x_1)(x_2)]. \quad (4.1)$$

O coeficiente de correlação apresenta valores entre +1 e -1. Assim:

- Uma correlação positiva indica que as duas variáveis movem-se juntas, e quanto mais próximo de +1, maior a relação entre as variáveis;

- Uma correlação próxima a 0 indica que as duas variáveis estão fracamente relacionadas;
- Uma correlação negativa indica que as duas variáveis movem-se em direções opostas, e quanto mais próximo de -1, maior a relação inversa entre as variáveis.

4.4 Autocorrelação

A *autocorrelação* é uma ferramenta matemática que informa o quanto o valor de uma variável aleatória está relacionado com sua vizinhança. A ferramenta é aplicada a uma função (ou sinal), possibilitando, assim, verificar o quão relacionado estão os valores da função à medida que se afasta de um determinado ponto. Supondo-se uma variável aleatória X_t discreta estacionária, dependente do tempo, com média μ , sua autocorrelação $R(k)$ é definida como:

$$R(k) = \frac{E[(X_t - \mu)(X_{t+k} - \mu)]}{\sigma^2}, \quad (4.2)$$

na qual $E[\cdot]$ é o operador esperança matemática, k é o deslocamento no tempo discreto e σ^2 é a variância da variável X_t .

Assim como na correlação, os valores de autocorrelação estão entre +1 e -1, e suas interpretações são semelhantes.

4.4.1 Propriedades da Autocorrelação

A função de autocorrelação $R(\tau)$, na qual τ representa o deslocamento no tempo contínuo, possui propriedades matemáticas que facilitam sua aplicação e análise (Rabiner & Schafer, 1978). Algumas dessas propriedades são:

1. $R(\tau)$ é uma função par, isto é $R(\tau) = R(-\tau)$;
2. A função de autocorrelação de um sinal periódico é também periódica, com o mesmo período;

3. Atinge seu máximo valor em $\tau = 0$, isto é: $|R(\tau)| \leq R(0)$ para todo τ ;
4. A quantidade $R(0)$ é igual à energia para sinais determinísticos ou a potência média para sinais aleatórios ou periódicos, isto é: $R(0) = E[x^2(t)]$.

4.4.2 Densidade Espectral de Potência

A *densidade espectral de potência* é definida como sendo a *transformada de Fourier* da função de autocorrelação (Rabiner & Schafer, 1978).

Portanto, a densidade espectral de potência é dada por

$$S(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} R(\tau) e^{-j2\pi f\tau} d\tau, \quad (4.3.a)$$

para variáveis contínuas, e

$$S(f) = \sum_{k=-\infty}^{+\infty} R(k) e^{-j2\pi f k}, \quad (4.3.b)$$

para variáveis discretas.

4.4.3 Estimador da Autocorrelação

Com base no que foi apresentado anteriormente, o cálculo da autocorrelação é melhor aplicado quando se conhece, em todo o domínio do tempo, a função analítica que define o sinal a ser utilizado. Entretanto, para sinais biológicos não existem funções analíticas bem definidas que representem fielmente o sinal real. Neste caso, devemos trabalhar com os valores reais do sinal biológico, que se apresentam de forma discreta.

Para um processo real $x(t)$, a função de autocorrelação pode ser estimada por:

$$R_x(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x(t)x(t+\tau) dt. \quad (4.4)$$

Em (Radujkov & Senk, 2001) os autores procuram um melhor estimador para a função de autocorrelação ($\tilde{R}_x(\tau)$) para aplicação em reconhecimento de voz. O artigo apresenta uma comparação entre métodos comuns e sua nova aproximação.

A nova técnica apresenta sucesso entre dois requerimentos para processamento em tempo-real: pequena dimensão do sinal analisado e qualidade na estimação que é frequentemente usada para descrição de partes pseudo-estacionárias dos sinais analisados. (Radujkov & Senk, 2001)

$$\tilde{R}_x(\tau) = \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x\left(t - \frac{|\tau|}{2}\right) x\left(t + \frac{|\tau|}{2}\right) dt. \quad (4.5)$$

As equações apresentadas acima descrevem um modelo para a estimação da função de autocorrelação para sinais contínuos, o que não é uma realidade quando se trata de sinais reais coletados.

Em (Rabiner & Schafer, 1978) é apresentado um método para estimação da função de autocorrelação para sinais discretos.

$$\phi(k) = \sum_{m=-\infty}^{\infty} x(m)x(m+k). \quad (4.6)$$

Se o sinal é aleatório ou periódico, a definição apropriada é:

$$\phi(k) = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{(2N+1)} \sum_{m=-N}^N x(m)x(m+k). \quad (4.7)$$

As Equações (4.8) e (4.9) (Childers, 1997) apresentam o estimador de autocorrelação utilizado no presente trabalho.

$$R_x(\tau) = \left(\frac{1}{L-\tau} \right) \sum_{n=0}^{L-\tau-1} x(n)x(n+\tau), \quad (4.8)$$

na qual $\tau = 0, 1, \dots, \tau_{máx}$ e $\tau_{máx} \leq L-1$, para valores discretos.

A normalização é feita por

$$R(\tau) = \frac{R_x(\tau)}{R_x(0)}, \quad (4.9)$$

na qual $R_x(0)$ corresponde ao maior valor da função de autocorrelação, segundo a propriedade 3 (seção 4.4.1).

4.5 Metodologia

Com a finalidade de se aplicar o estimador para o cálculo da autocorrelação, resolveu-se, então, testá-lo para alguns tipos de sinais sintéticos, cujo resultado da autocorrelação já era conhecido. Este procedimento foi realizado somente com a intenção de validar o estimador matemático, e os resultados não diferem dos esperados por métodos analíticos. Além disso, o estimador foi testado com sinais reais de eletroencefalografia e sinais de MEA, sendo este último dividido em: sinais de um único eletrodo de culturas distintas, e trechos do sinal de uma única cultura contendo ruído biológico, *spikes* isolados e *bursts*.

Em vista da grande quantidade de dados de sinais da MEA, e da duração do sinal de cada experimento, foram feitos testes avaliando o desempenho do cálculo para diversos tamanhos de janelas de dados. Este desempenho foi qualificado observando alguns parâmetros: tempo gasto para o cálculo da autocorrelação para todo o sinal, e variação do tempo de decaimento para diversos tamanhos de janelas.

A autocorrelação do sinal foi calculada para várias janelas do mesmo e, em seguida, foi calculada a autocorrelação média do sinal, a partir da média das autocorrelações calculadas para todo o sinal.

A variável denominada *tempo de decaimento* foi definida a partir do seguinte critério: após o cálculo da autocorrelação de um sinal, definia-se o valor médio para esta; a partir do valor médio, procurava-se no gráfico o ponto onde a curva da autocorrelação encontrava-se logo abaixo deste valor acrescido de 10 %; o instante de tempo em que isto ocorria pela primeira vez era definido como *tempo de decaimento*.

O tempo de decaimento foi observado no gráfico da autocorrelação média dos sinais, mas também se realizou o cálculo do tempo de decaimento para o resultado da autocorrelação de cada janela do sinal.

Embora se buscasse observar o comportamento da autocorrelação para diversos tamanhos de janelas de dados, em (Shimazaki & Shinomoto, 2007) recomenda-se que os segmentos de dados não devem ser maiores que 1 a 2 segundos. Esta informação limitou o tamanho máximo da janela de dados em 2 s.

A utilização da ferramenta matemática Autocorrelação tem um objetivo mais amplo: sua aplicação como ferramenta para segmentação do sinal da MEA.

A segmentação de sinais para análise e cálculos matemáticos é um recurso bastante utilizado em técnicas de processamento de sinais. Além de reduzir o custo computacional, a segmentação de um sinal real em intervalos temporais menores permite que este sinal seja considerado estacionário (Rangayyan, 2001), ou seja, suas variáveis estatísticas não variam nesse intervalo de tempo.

4.6 Aplicação da Autocorrelação

4.6.1 Sinais da MEA

Os sinais da MEA utilizados para os cálculos iniciais correspondem apenas ao sinal de um único eletrodo de cinco diferentes culturas de MEA. São eles:

Sinal 1. 01_Nbasal1_1: Sinal de uma cultura ativa;

Sinal 2. 01_NoNeurons_01: Ruído do dispositivo eletrônico da MEA, obtido ligando-se todos os dispositivos à MEA, porém sem nenhuma cultura;

Sinal 3. 359_01_DIV21_Nbasal_1: Sinal de uma cultura inativa;

Sinal 4. Exp2_01_DIV41_nbasal1_1: Sinal de uma cultura ativa;

Sinal 5. Exp2_02_DIV41_TTX1_1: Este último sinal corresponde à mesma cultura do **Sinal 4**, porém sem spikes ou bursts devido à ação da droga tetrodotoxina (TTX); contém apenas ruído biológico e ruído da MEA.

Culturas primárias de neurônios corticais de ratos foram preparadas baseadas na extração de tecido de embrião de 18 dias, em conformidade com as regulamentações estabelecidas pelo Comitê de Bioética Animal da Universidade de Gênova, Itália. Foram utilizadas MEAs planares de sessenta eletrodos (MCS). Cada conjunto de gravação contém 20 minutos de duração, com uma taxa de amostragem de 10 kHz. Maiores detalhes sobre a preparação das culturas vide **Anexo 1**.

Com a intenção de avaliar o comportamento do tempo de decaimento, bem como o tempo de processamento, para diversos tamanhos de janelas temporais, foram realizados

diversos testes cujos resultados são apresentados a seguir. Para facilitar a visualização dos resultados, os mesmos encontram-se agrupados por tamanho da janela de dados.

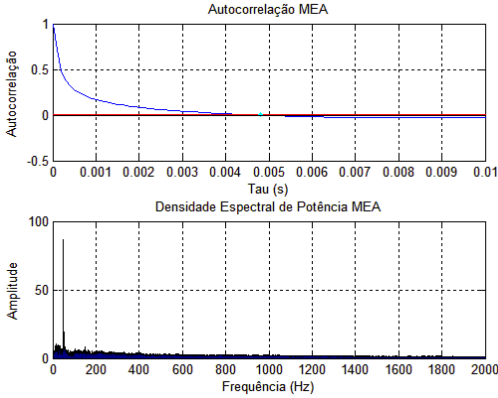
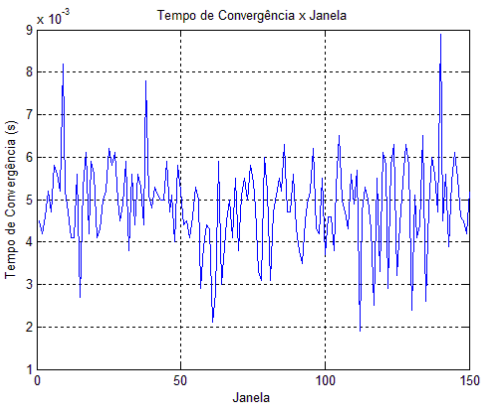
Os tamanhos de janelas utilizados foram:

- 2,0 segundos;
- 1,0 segundo;
- 0,5 segundo;
- 0,2 segundo;
- 0,1 segundo;
- 0,05 segundo;
- 0,02 segundo;
- 0,01 segundo.

Apesar do tamanho da janela, e consequentemente do valor de τ , serem de até 2 segundos, e do intervalo de frequência da densidade espectral de potência chegar a 5 kHz, as figuras a seguir foram redimensionadas para um intervalo de 0 a 0,01 s, para a autocorrelação, e 0 a 2 kHz para a densidade espectral de potência.

Na tabela 4.1 mostra-se como os resultados foram analisados. A tabela contém duas figuras: uma da autocorrelação do sinal e uma da variação do tempo de decaimento ao longo das janelas do sinal. Os resultados da análise de ambas as figuras encontram-se imediatamente ao lado das mesmas.

Tabela 4.1 – Sinal 01_Nbasal1_1_12: janela de 2 s.

Arquivo:		01_Nbasal1_1_12.mat	
		Tamanho da Janela de Dados (s):	2
		Tamanho Máximo para Tau (s):	2
		Tempo de Processamento (s):	2320.05
		Tempo de Decaimento (s):	0.0048
		Número de Iterações:	150
		Tempo de Decaimento Médio (s):	0.0049
		Variância (s^2):	$1.1429 \cdot 10^{-6}$
		Máximo Tempo de Decaimento (s):	0.0089
		Mínimo Tempo de Decaimento (s):	0.0019

Nas Figuras 4.2 e 4.3 ilustram-se alguns resultados para o cálculo da autocorrelação para os sinais da MEA.

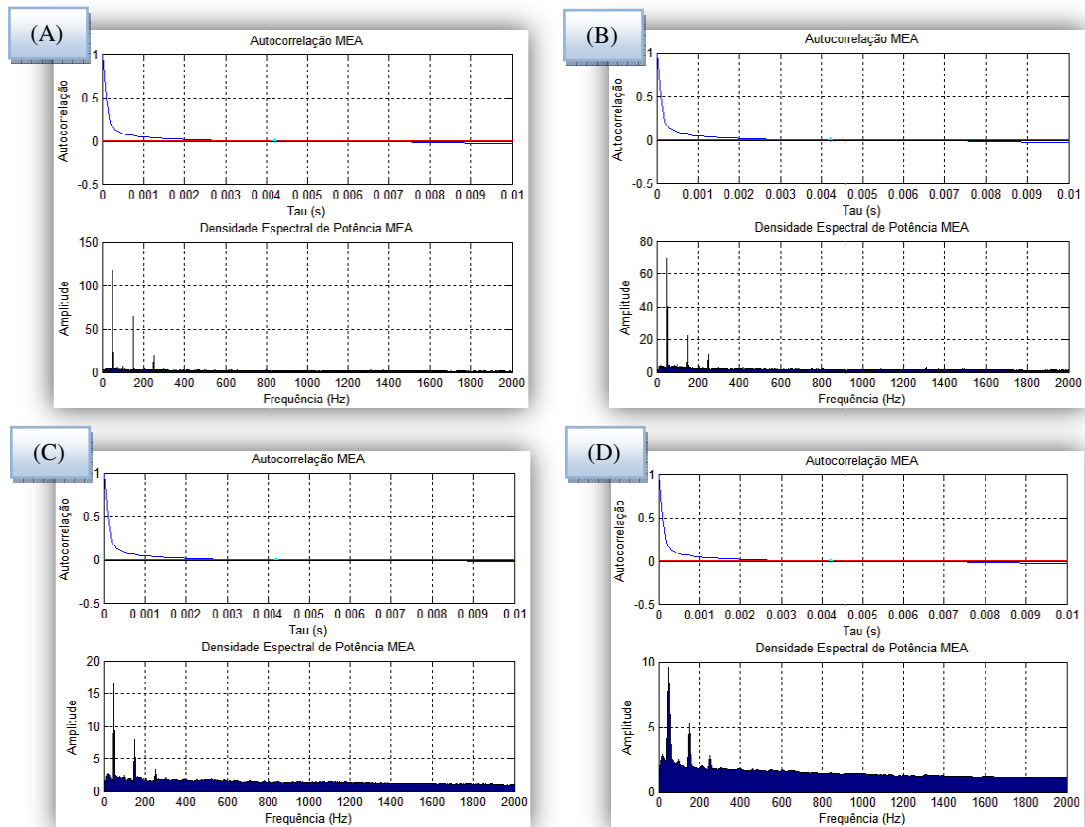


Figura 4.2 – Autocorrelação para o Sinal *01_NoNeurons_01_12*: janelas de (A) 2 s, (B) 1 s, (C) 0,2 s e (D) 0,1 s.

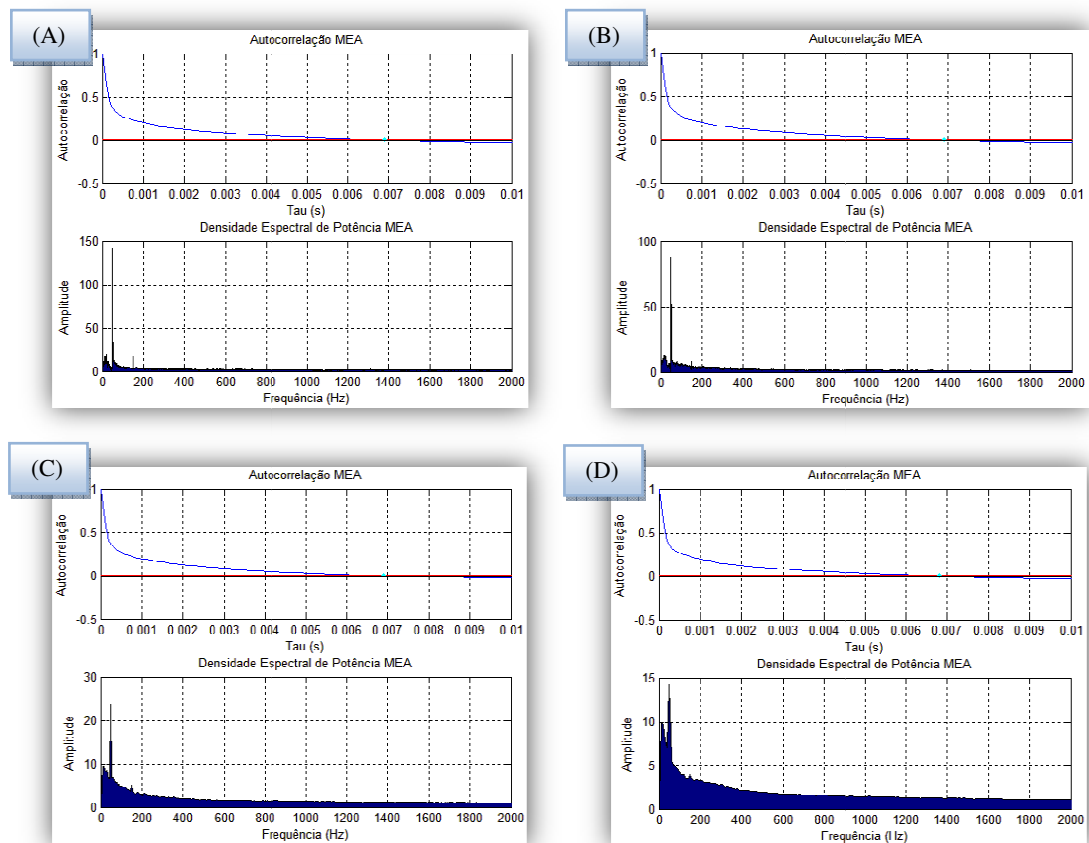


Figura 4.3 – Autocorrelação para o Sinal *Exp2_01_DIV41_nbasal1_1_12*: janelas de (A) 2 s, (B) 1 s, (C) 0,2 s e (D) 0,1 s.

Nas tabelas 4.2 e 4.3 estão sintetizados os resultados relacionados ao tempo de decaimento e a variância do tempo de decaimento.

Tabela 4.2 – Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: Todos os Sinais da MEA.

Tempo de Decaimento/Janela	Nbasal	NoNeurons	DIV21_Nbasal	DIV41_nbasal	DIV41_TTX
Janela de 2,0 s	4,8 ms	4,2 ms	4,5 ms	6,9 ms	7,1 ms
Janela de 1,0 s	5,0 ms	4,2 ms	4,5 ms	6,9 ms	7,1 ms
Janela de 0,5 s	5,1 ms	4,2 ms	4,5 ms	6,9 ms	7,1 ms
Janela de 0,2 s	5,2 ms	4,2 ms	4,4 ms	6,9 ms	7,1 ms
Janela de 0,1 s	5,2 ms	4,2 ms	4,4 ms	6,8 ms	7,2 ms
Janela de 0,05 s	5,2 ms	4,1 ms	4,4 ms	6,8 ms	7,0 ms
Janela de 0,02 s	4,2 ms	3,0 ms	3,2 ms	5,1 ms	5,1 ms
Janela de 0,01 s	2,7 ms	1,9 ms	2,2 ms	3,1 ms	3,0 ms

Tabela 4.3 – Variância do Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela:
Todos os Sinais da MEA. Unidades em s^2 .

Variância do Tempo de Decaimento/Janela	Nbasal	NoNeurons	DIV21_Nbasal	DIV41_nbasal	DIV41_TTX
Janela de 2,0 s	$1.1429*10^{-6}$	$7.6502*10^{-7}$	$8.8112*10^{-7}$	$9.1070*10^{-7}$	$7.3824*10^{-7}$
Janela de 1,0 s	$1.4044*10^{-6}$	$7.8672*10^{-7}$	$8.8112*10^{-7}$	$1.3370*10^{-6}$	$1.6917*10^{-6}$
Janela de 0,5 s	$1.7289*10^{-6}$	$8.2008*10^{-7}$	$1.2771*10^{-6}$	$2.3300*10^{-6}$	$2.6455*10^{-6}$
Janela de 0,2 s	$2.8959*10^{-6}$	$8.8918*10^{-7}$	$1.6244*10^{-6}$	$4.4899*10^{-6}$	$4.7441*10^{-6}$
Janela de 0,1 s	$3.8422*10^{-6}$	$9.7222*10^{-7}$	$2.1568*10^{-6}$	$7.4625*10^{-6}$	$8.1818*10^{-6}$
Janela de 0,05 s	$6.7547*10^{-6}$	$1.1366*10^{-6}$	$3.6554*10^{-6}$	$1.2081*10^{-5}$	$1.0634*10^{-5}$
Janela de 0,02 s	$4.3737*10^{-6}$	$1.2690*10^{-6}$	$2.7712*10^{-6}$	$5.3452*10^{-6}$	$5.3035*10^{-6}$
Janela de 0,01 s	$1.8224*10^{-6}$	$6.9357*10^{-7}$	$1.2757*10^{-6}$	$1.8949*10^{-6}$	$1.8394*10^{-6}$

Pela análise dos resultados apresentados acima, é possível observar que há uma coerência entre os valores do tempo de decaimento de cada sinal para janelas de 0,05 a 2 segundos. Entretanto, para janelas menores que 0,1 segundos parece haver uma perda de informação relativa à densidade espectral de potência.

O tempo de processamento dos sinais apresentou uma tendência a uma acentuada redução à proporção que o tamanho da janela de dados também diminuía.

O fato do tempo de decaimento ser pequeno e do gráfico da autocorrelação tender a zero muito rapidamente, implica que o sinal da MEA apresenta uma tendência muito grande a se comportar como um ruído branco (Granado-Filho, 1994).

4.6.2 Sinais da MEA: Spikes, Bursts e Ruído Biológico

Nesta seção, escolheu-se um sinal de MEA e observou-se o comportamento de trechos desse sinal. Os trechos correspondem a intervalos onde ocorrem:

- *Spikes* isolados;
- *Bursts*;
- Ruído biológico.

O sinal escolhido foi o **01_Nbasal1_1**, correspondente ao sinal de uma cultura ativa.

Foram realizados testes para alguns valores de janelas. Os resultados são apresentados a seguir.

Como apresentado na seção anterior, foram realizados testes de diversos valores de janelas de dados. Nesta seção não houve uma preocupação muito grande com o tempo de processamento dos sinais, já que se tratam de trechos pequenos dos mesmos. Apesar disso, novamente, os resultados apresentam uma tendência de o processamento ser mais rápido para janelas de dados menores.

Nas Figuras 4.4 a 4.6 ilustram-se alguns dos resultados.

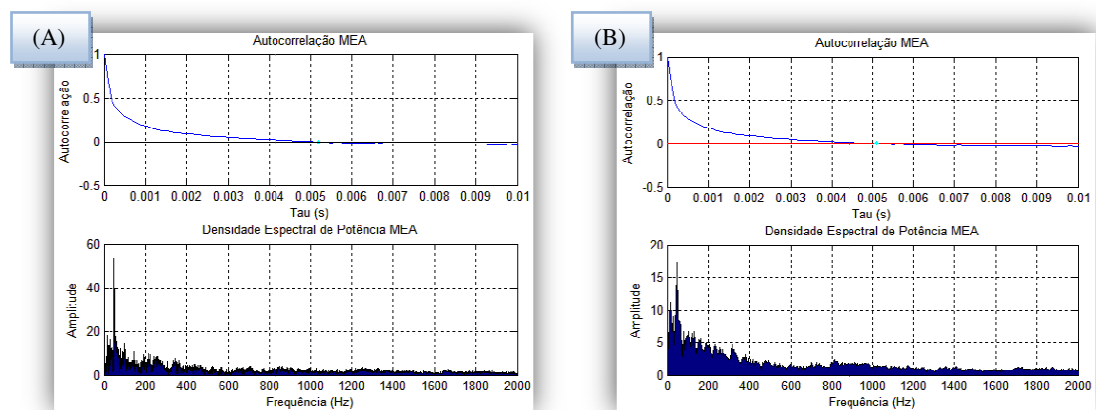


Figura 4.4 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Ruído Biológico: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

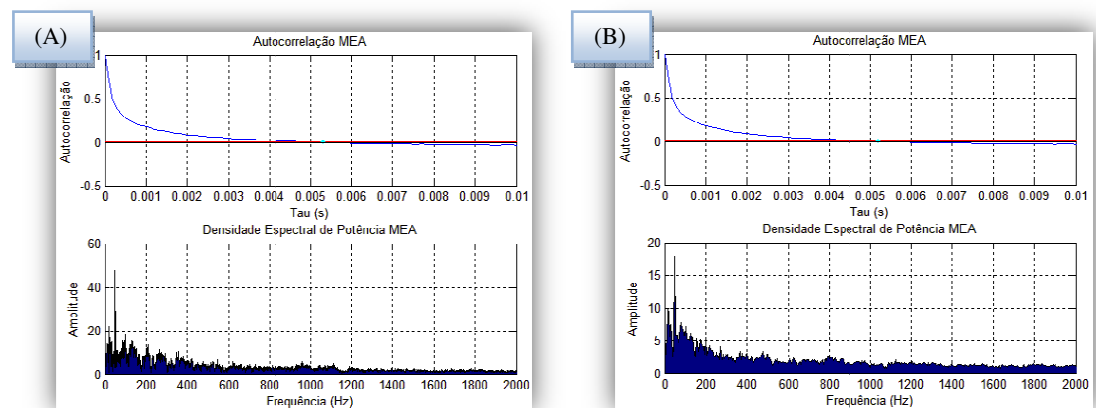


Figura 4.5 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Bursts: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

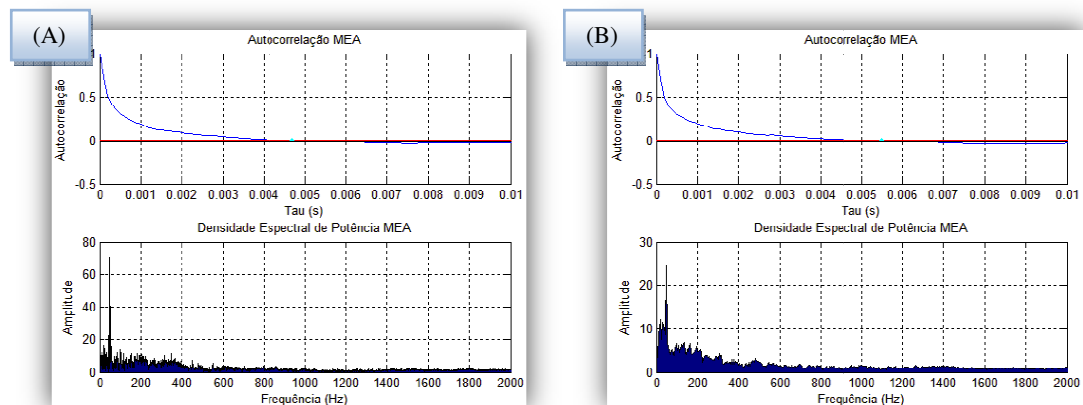


Figura 4.6 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Spikes: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

Os resultados foram sintetizados nas tabelas 4.4 e 4.5 abaixo.

Tabela 4.4 – Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: Ruído Biológico, Bursts e Spikes.

Tempo de Decaimento/Janela	Ruído Biológico	Bursts	Spikes
Janela de 2,0 s	5,1 ms	5,2 ms	4,0 ms
Janela de 1,0 s	5,2 ms	5,3 ms	4,7 ms
Janela de 0,5 s	5,1 ms	5,3 ms	4,7 ms
Janela de 0,2 s	5,1 ms	5,2 ms	5,5 ms

Tabela 4.5 – Variância do Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: Ruído Biológico, Bursts e Spikes. Unidades em s^2 .

Variância do Tempo de Decaimento/Janela	Ruído Biológico	Bursts	Spikes
Janela de 2,0 s	$8.1667 \cdot 10^{-8}$	$1.3900 \cdot 10^{-7}$	$2.1107 \cdot 10^{-6}$
Janela de 1,0 s	$8.6811 \cdot 10^{-7}$	$1.2055 \cdot 10^{-6}$	$1.6917 \cdot 10^{-6}$
Janela de 0,5 s	$8.3275 \cdot 10^{-7}$	$1.9263 \cdot 10^{-6}$	$1.9695 \cdot 10^{-6}$
Janela de 0,2 s	$2.2012 \cdot 10^{-6}$	$4.4994 \cdot 10^{-6}$	$2.6796 \cdot 10^{-6}$

É possível observar, a partir dos resultados para todos os tamanhos de janelas, que há uma constância nos valores para o tempo de decaimento dos trechos, com uma pequena alteração no trecho de *Spikes*, que apresentou um aumento no seu valor na janela de 0,2 s. De uma forma geral, o trecho com *Spikes* apresenta o menor valor para o

tempo de decaimento, seguido pelo trecho de Ruído Biológico e, por fim, o trecho com *Bursts*.

Novamente, o tempo de processamento diminuía à medida que as janelas de dados ficavam menores.

4.6.3 Sinais de EEG

Com a intenção de comparar os resultados do processamento dos sinais da MEA, realizou-se um processamento de alguns trechos de sinais de eletroencefalografia. É importante observar que os sinais EEG já há muito são bastantes estudados pela literatura. Obviamente os sinais de EEG, apesar de estarem relacionados com atividade neuronal, são uma realidade bastante distinta dos sinais das culturas neuronais da MEA. Estes últimos não se encontram em seu ambiente natural, mas sim em uma cultura preparada com nutrientes essenciais. Suas conexões são muito mais limitadas, visto também que os sinais das MEAs aqui analisados tratam-se de atividade espontânea, não havendo nenhum tipo de estímulo externo à cultura.

Considerando estes apontamentos, os sinais de EEG analisados correspondem a dados fornecidos por um banco de dados da Universidade de Tampere (Finlândia), onde os sinais foram coletados a uma taxa de amostragem de 200 Hz. Os trechos dos dados analisados correspondem a sinais onde há:

- Evidência de crise epiléptica - 10 segundos;
- Atividade normal não patológica - 10 segundos.

Foram analisados, para cada trecho (com e sem evidência de crise), os mesmos conjuntos de derivações de eletrodos (detalhes na Figura 2.5). A saber:

- F7-C3;
- F8-C4;
- T5-C1;
- T6-C2.

Como nos sinais da MEA, realizaram-se testes para diversos valores de janela de dados. Alguns resultados são apresentados nas Figuras 4.7 e 4.8, sinal com crise e sem crise, respectivamente.

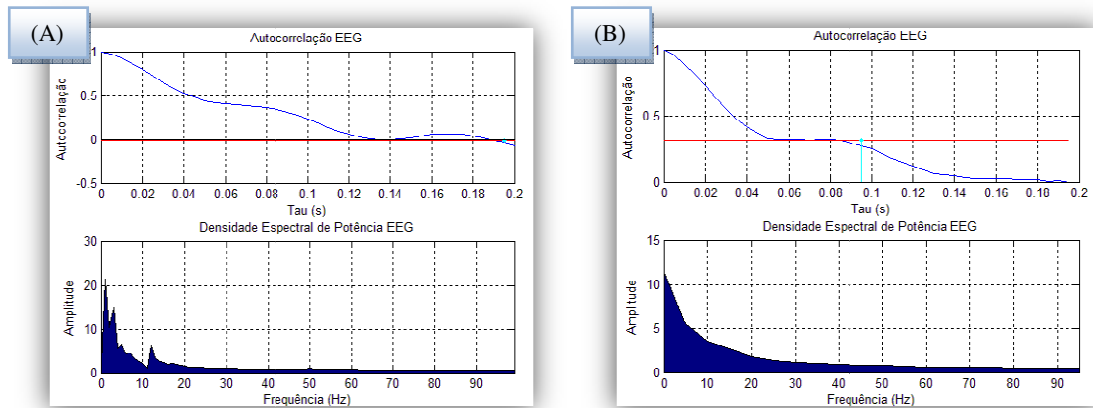


Figura 4.7 – Sinal EEG Com Evidência de Crise Epiléptica (Eletrodos F7-C3): janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

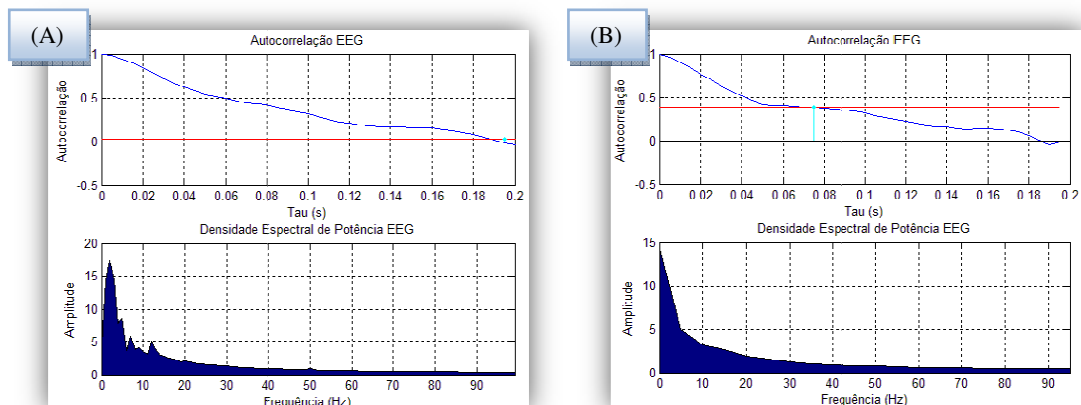


Figura 4.8 – Sinal EEG Com Atividade Normal (Eletrodos F7-C3): janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

O tempo de processamento dos dados de EEG é muito menor que o tempo gasto para os dados da MEA. Isto ocorre pelo fato de que os sinais EEG possuem uma taxa de amostragem muito menor que os sinais da MEA, o que diminui o tempo gasto com os cálculos computacionais.

Há variações significativas no tempo gasto com o processamento dos sinais, bem como há variações para o tempo de decaimento à medida que se diminui o tamanho da

janela de dados. Entretanto, o sinal sem crise apresentou uma alteração menos significativa nos valores do tempo de decaimento na comparação entre as janelas de 2 s e 1 s, como se pode verificar nas tabelas 4.6 e 4.7 abaixo.

Tabela 4.6 – Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: EEG Com Evidência de Crise Epiléptica.

Tempo de Decaimento/Janela	F7-C3	F8-C4	T5-C1	T6-C2
Janela de 2,0 s	135 ms	130 ms	205 ms	170 ms
Janela de 1,0 s	195 ms	190 ms	125 ms	150 ms
Janela de 0,5 s	115 ms	130 ms	215 ms	130 ms
Janela de 0,2 s	95 ms	90 ms	55 ms	65 ms

Tabela 4.7 – Tempo de Decaimento por Tamanho de Janela: EEG Com Atividade Normal.

Tempo de Decaimento/Janela	F7-C3	F8-C4	T5-C1	T6-C2
Janela de 2,0 s	195 ms	220 ms	220 ms	470 ms
Janela de 1,0 s	195 ms	205 ms	210 ms	155 ms
Janela de 0,5 s	195 ms	195 ms	190 ms	85 ms
Janela de 0,2 s	75 ms	50 ms	60 ms	55 ms

Apesar dessa variação no tempo de decaimento, a forma da curva de autocorrelação de cada par de eletrodos se mantém praticamente inalterada à medida que se altera o valor da janela de dados.

4.7 Conclusões

O estudo realizado envolveu apenas um canal da MEA, o que implica que foi analisada apenas a dinâmica de um canal, e não a dinâmica da cultura. Portanto as conclusões que se seguem são limitadas por este impositivo.

A análise dos testes realizados com diversos tamanhos de janelas de dados para o sinal da MEA permite ressaltar os seguintes pontos: há uma diminuição bastante expressiva no tempo de processamento à medida que as janelas de dados diminuem; os valores para os tempos de decaimento se mantêm praticamente inalterados em todos os

sinais para as janelas de 0,05 a 2,0 s. Isto implica que um algoritmo baseado na técnica de autocorrelação para segmentação do sinal pode trabalhar tranquilamente com janelas de dados dentro desse intervalo. Esta informação pode ser verificada na tabela 4.2.

Entretanto, as informações para a densidade espectral de potência parecem ser reduzidas para janelas de dados muito pequenas, ou seja, menores que 0,1 s, o que poderia limitar o tamanho das janelas de dados.

Quanto aos trechos do sinal da MEA contendo ruído biológico, *bursts* e *spikes* apresentam constância nos valores para o tempo de decaimento. O trecho com *Spikes* apresenta o menor valor para o tempo de decaimento, seguido pelo trecho de Ruído Biológico e, por fim, o trecho com *Bursts*. Há apenas uma pequena alteração no trecho de *Spikes* na janela de 0,2 s, como se pode verificar na tabela 4.4.

A relação entre menor e maior tempo de decaimento possivelmente está associada com as características dos sinais. Ou seja, sinais que apresentam variações rápidas, ou alterações rápidas no comportamento, como no trecho com *spikes*, apresentam menor tempo de decaimento, enquanto sinais que apresentam menores variações têm tempo de decaimento maior, como o trecho de ruído biológico. O trecho com *bursts*, apesar de ser formado por *spikes*, possui um tempo de decaimento alto. Isto se deve ao fato de que os *spikes* que formam os *bursts* ocorrem com um intervalo menor de tempo, não caracterizando, portanto, “alterações” no sinal, ou seja, os *spikes* fazem parte da característica do sinal. O mesmo não ocorre com o trecho com *spikes* isolados, onde estes correspondem a alterações bruscas no comportamento do sinal.

Spikes e *bursts* estão associados a processos de dinâmica mais rápida, enquanto que o ruído biológico está associado a processos de dinâmica mais lenta (Chiappalone, 2003). Entretanto, um trecho com *bursts* pode ser encarado como um sinal “modulado” por uma senóide de baixa frequência. Isto poderia explicar o comportamento mais “lento” do sinal, verificado pelo tempo de decaimento da autocorrelação. Na Figura 4.9 ilustra-se esta comparação.

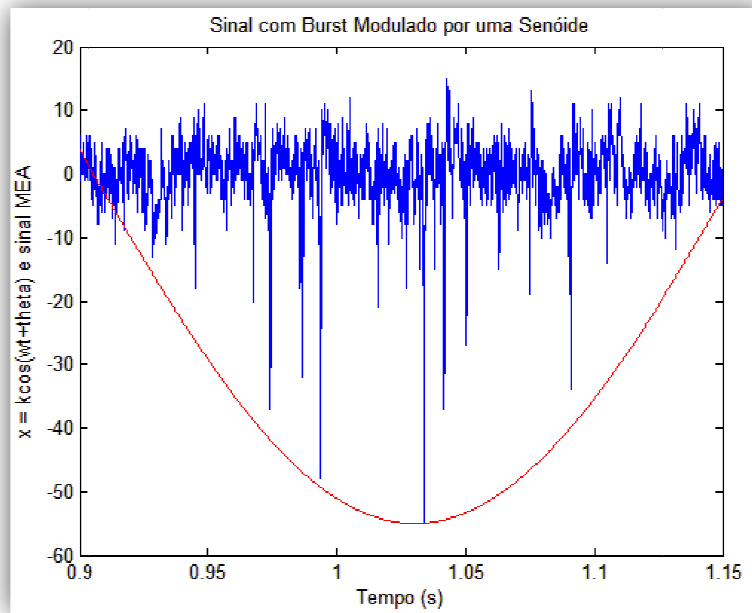


Figura 4.9 – Sinal da MEA: trecho com sequência de spikes que formam um burst modulado por uma senoide de 2 Hz.

Esta análise leva a uma observação interessante. A cultura **DIV41_TTX** não possui atividade, como *bursts* ou *spikes* isolados, havendo somente *ruído biológico*. Porém, seu comportamento é diferente da “cultura” **NoNeurons**, onde há somente *ruído de instrumentação*, e da cultura **DIV21_Nbasal**, que é uma cultura *inativa*, cujo valor do tempo de decaimento se aproxima do tempo de decaimento da “cultura” **NoNeurons**. Desta forma, pode-se pensar na aplicação da ferramenta de Autocorrelação para diferenciar culturas inativas de culturas ativas que só apresentem *ruído biológico*.

A diminuição do tempo de processamento em virtude da diminuição da janela de dados também foi verificada para os trechos do sinal da MEA.

Nas tabelas 4.3 e 4.5 pode-se verificar como a variância do tempo de decaimento muda para cada valor de janela de dados, bem como para sinais diferentes. É interessante observar na tabela 4.3 que os sinais para as culturas **DIV41_nbasal** e **DIV41_TTX** (que correspondem à mesma cultura antes e após a adição de uma droga, respectivamente) apresentam as mesmas ordens de grandeza e valores muito próximos para as mesmas janelas de dados, apresentando, maior valor de variância para a janela de 0,05 s. Apesar dos seus tempos de decaimento serem diferentes, porém próximos (como se pode observar na tabela 4.2), suas variâncias aparentam ser muito mais

próximas. O sinal que apresentou menos mudanças na sua variância foi o **Nbasal**, que é uma cultura ativa.

Na tabela 4.5, apenas o sinal com *spikes* apresentou maior estabilidade no valor da variância, mantendo sua ordem de grandeza sempre em 10^{-6} s^2 .

Apesar dos sinais da MEA permitirem trabalhar com diversos tamanhos de janelas de dados, os sinais EEG parecem limitar estas janelas a 1,0 ou 2,0 s. Os sinais EEG com evidência de crise epiléptica apresentaram as maiores variações de valores por janela de dados, como mostrado na tabela 4.6.

Entretanto, os sinais com atividade normal apresentam uma constância nos valores para o tempo de decaimento em quase todos os eletrodos, havendo apenas uma alteração no eletrodo T6-C2 (veja tabela 4.7).

A mesma relação entre tempo de decaimento e comportamento do sinal é verificada para o sinal EEG. O sinal EEG com evidência de crise epiléptica apresenta variações “bruscas” no sinal, o que o leva a possuir um menor tempo de decaimento. Entretanto, o sinal EEG com atividade normal possui comportamento “suave”, sem alterações bruscas, o que o leva a possuir maior tempo de decaimento.

De uma forma geral, quanto maior o tempo de decaimento, maior o tamanho da janela de dados que pode ser considerada estacionária. Esta relação era esperada na comparação da estacionariedade do sinal EEG e do sinal da MEA. Como o EEG é um sinal de dinâmica mais lenta e menos aleatória que o sinal da MEA, possui um tempo de decaimento maior, ou seja, é estacionário por um período de tempo maior que o sinal da MEA. Essa estacionariedade, por outro lado, pode ser verificada na estabilidade do valor do tempo de decaimento para diversos tamanhos de janelas de dados, ou seja, sinais de MEA são estacionários para janelas de 0,05 a 2,0 s, enquanto que sinais de EEG não são estacionários para janelas menores que 0,5 s.

Assim, para sinais de EEG será mais apropriada a utilização de janelas de dados de 1,0 s, enquanto para os sinais da MEA essas janelas podem ser de 0,5 s.

Capítulo 5

Segmentação do Sinal da MEA

Neste capítulo será apresentada a técnica de segmentação através do SEM (Spectral Error Measurement) e informações importantes sobre ferramentas que o compõem, como a predição linear, filtro de predição e algoritmo de Levinson-Durbin. São apresentados também os resultados para a segmentação de sinais EEG e MEA.

5.1 Introdução

Como já discutido, a análise de sinais necessita, muitas das vezes, que esse sinal seja analisado por trechos ou segmentos. Entretanto, para sinais cuja dinâmica e informação podem variar bastante, segmentos de tamanhos fixos podem ocasionar perda ou fragmentação de informação.

Com o pensamento imbuído desse sentimento, despertou-se o interesse do estudo de segmentação para os sinais da MEA através da técnica do SEM (do inglês, *Spectral Error Measurement*), onde a variação desse parâmetro indica mudança de comportamento estatístico do sinal. Entretanto, a técnica selecionada foi inicialmente testada em sinais EEG, para uma avaliação da sua aplicação e estudo dos seus parâmetros matemáticos.

A técnica do SEM para a segmentação do sinal da MEA foi baseada no trabalho apresentado inicialmente em (Bodenstein & Praetorius, 1977), onde os autores utilizam a autocorrelação, a densidade espectral e a predição linear para segmentação e extração

de características de sinais eletroencefalográficos. Em (Appel & Brandt, 1984; Praetorius, Bodenstein, & Creutzfeldt, 1977; Wong & Abdulla, 2006), os autores discutem a técnica através de aplicações a diversos grupos de sinais biológicos e sintéticos.

5.2 Predição Linear

5.2.1 Predição Linear Futura

Uma técnica bastante aplicada em processamento de sinais é a predição linear, que consiste em “predizer um valor futuro de um processo estocástico estacionário de tempo discreto, dado um conjunto de amostras passadas de um processo” (Haykin, 1996), por exemplo, dadas as amostras $u(n-1), u(n-2), \dots, u(n-M)$ fazer uma estimação de $u(n)$.

Seja o valor predito $\hat{u}(n | U_{n-1})$ definido por:

$$\hat{u}(n | U_{n-1}) = \sum_{k=1}^M w_{f,k}^* u(n-k), \quad (5.1)$$

na qual $w_{f,k}$ corresponde aos pesos ótimos discretos para o preditor.

O erro de predição futura $f_M(n)$ é definido como a diferença entre a amostra de entrada $u(n)$ e seu valor predito $\hat{u}(n | U_{n-1})$.

$$f_M(n) = u(n) - \hat{u}(n | U_{n-1}). \quad (5.2)$$

O índice M para o erro de predição futura significa *ordem do preditor*, e é definida como “o número de elementos de unidades atrasadas necessário para armazenar o conjunto dado de amostras usadas para fazer a predição” (Haykin, 1996).

5.2.2 Filtro de Erro de Predição Futura

Define-se $a_{M,k}$, $k=0,1,\dots,M$ como os pesos discretos de um filtro, que está relacionado com os pesos discretos da predição direta da seguinte forma:

$$a_{M,k} = \begin{cases} 1, & k = 0 \\ -w_{f,k}, & k = 1, 2, \dots, M \end{cases} \quad (5.3)$$

Assim, o erro de predição pode ser definido com base nos coeficientes do filtro como se segue (Haykin, 1996):

$$f_M(n) = \sum_{k=0}^M a_{M,k}^* u(n-k). \quad (5.4)$$

5.2.3 Algoritmo de Levinson-Durbin

O algoritmo de Levinson-Durbin define um método de resolução das equações aumentadas de Wiener-Hopf para a predição linear.

Dado um sinal discreto de entrada $u(n)$, o conjunto de coeficientes ótimos para a predição linear $a_{m,k}$, onde $m = 0, 1, \dots, M$ e $k = 0, 1, \dots, m$, pode ser calculado através da recursividade descrita abaixo (Haykin, 1996).

1. Inicialmente, calcula-se a autocorrelação para um conjunto de N amostras, no qual N é muito maior que a ordem M do filtro:

$$\hat{r}(k) = \frac{1}{N} \sum_{n=1+k}^N u(n) u^*(n-k), \text{ com } k = 0, 1, \dots, M; \quad (5.5)$$

2. Utilizar as equações abaixo para calcular Δ_{m-1} e P_m (vide **Anexo 2** uma interpretação dos parâmetros Δ_{m-1} e P_m):

$$\begin{aligned} \Delta_{m-1} &= r_m^{BT} a_{m-1} \\ \Delta_{m-1} &= \sum_{l=0}^{m-1} r(l-m) a_{m-1,l} \end{aligned} \quad (5.6)$$

$$P_m = P_{m-1} (1 - |\kappa_m|^2); \quad (5.7)$$

3. O conjunto de coeficientes $a_{m,k}$ é calculado por

$$a_{m,k} = a_{m-1,k} + \kappa_m a_{m-1,m-k}^*, \text{ com } k = 0, 1, \dots, m; \quad (5.8)$$

A recursão é iniciada com $m = 0$, para o qual temos:

$$P_0 = r(0)$$

e

$$\Delta_0 = r^*(1).$$

Algumas condições de contorno são definidas:

$$\kappa_m = -\frac{\Delta_{m-1}}{P_{m-1}}$$

e

$$a_{m,m} = \kappa_m.$$

Note também que $a_{m,0} = 1$ para todo m , e $a_{m,k} = 0$ para todo $k > m$.

A recursão termina quando $m = M$.

Para calcular os coeficientes através do algoritmo de Levinson-Durbin, foi desenvolvido um programa em MATLAB[®].

5.2.3.1 Exemplo de Resolução do Algoritmo de Levinson-Durbin

Nesta seção ilustramos um exemplo de resolução das equações aumentadas de Wiener-Hopf para a predição linear utilizando o algoritmo de Levinson-Durbin apresentado anteriormente.

Seja o conjunto de amostras $u(n), u(n-1), u(n-2), \dots, u(n-M)$. Pretende-se encontrar o conjunto de coeficientes ótimos para a predição linear $a_{m,k}$, para um filtro de ordem $M = 3$.

Obedecendo ao procedimento descrito no item anterior, calcula-se inicialmente a autocorrelação do conjunto de amostras para uma ordem, segundo a equação (5.5).

A recursão é iniciada fazendo-se $m = 0$.

- **Para $m = 0$:**

Temos que:

$$P_0 = r(0) \quad (5.9.a)$$

e

$$\Delta_0 = r^*(1). \quad (5.9.b)$$

Por definição, tem-se:

$$a_{0,0} = 1, \quad (5.10)$$

e, portanto,

$$\kappa_0 = 1. \quad (5.11)$$

- **Para $m = 1$:**

Temos, por definição, que:

$$a_{1,0} = 1. \quad (5.12)$$

Das equações (5.9) obtemos:

$$\kappa_1 = \frac{-\Delta_0}{P_0}. \quad (5.13)$$

Resolvendo as equações (5.7) e (5.8), temos:

$$P_1 = P_0(1 - |\kappa_1|^2) \quad (5.14.a)$$

e

$$a_{1,1} = \kappa_1. \quad (5.14.b)$$

- **Para $m = 2$:**

Por definição:

$$a_{2,0} = 1. \quad (5.15)$$

Das equações (5.6) e (5.9) obtemos:

$$\Delta_1 = r^*(2)a_{1,0} + r^*(1)a_{1,1} \quad (5.16.a)$$

e

$$\kappa_2 = \frac{-\Delta_1}{P_1}. \quad (5.16.b)$$

Resolvendo as equações (5.7) e (5.8), temos:

$$P_2 = P_1(1 - |\kappa_2|^2), \quad (5.17.a)$$

$$a_{2,1} = \kappa_1 + \kappa_2 \kappa_1^* \quad (5.17.b)$$

e

$$a_{2,2} = \kappa_2. \quad (5.17.c)$$

• **Para $m = 3$:**

Por definição, temos:

$$a_{3,0} = 1. \quad (5.18)$$

Resolvendo as equações (5.6) e (5.9) obtemos:

$$\Delta_2 = r^*(3)a_{2,0} + r^*(2)a_{2,1} + r^*(1)a_{2,2} \quad (5.19.a)$$

e

$$\kappa_3 = \frac{-\Delta_2}{P_2}. \quad (5.19.b)$$

Das equações (5.7) e (5.8), temos:

$$P_3 = P_2(1 - |\kappa_3|^2), \quad (5.20.a)$$

$$a_{3,1} = \kappa_1 + \kappa_2 \kappa_1^* + \kappa_3 \kappa_2^*, \quad (5.20.b)$$

$$a_{3,2} = \kappa_2 + \kappa_3(\kappa_1 + \kappa_2 \kappa_1^*)^*, \quad (5.20.c)$$

$$a_{3,3} = \kappa_3. \quad (5.20.d)$$

5.3 Técnica de Segmentação pelo SEM

A técnica de segmentação através do SEM (*Spectral Error Measurement*) foi proposto inicialmente em 1977 por Günter Bodenstein e H. Michael Praetorius, no artigo (Bodenstein & Praetorius, 1977). Nesse artigo os autores propõem a técnica para a segmentação e extração de características de sinais EEG.

Em (Appel & Brandt, 1984; Praetorius, Bodenstein, & Creutzfeldt, 1977; Wong & Abdulla, 2006) os autores fazem uma avaliação de técnicas de segmentação de sinais, entre elas o SEM. Também é apontado o fato de que a técnica do SEM exige um maior trabalho na escolha dos parâmetros de entrada.

Baseado em (Bodenstein & Praetorius, 1977) foi desenvolvido um algoritmo em ambiente MATLAB[®] para a segmentação dos sinais da MEA, sendo o algoritmo testado inicialmente para sinais EEG.

5.3.1 Algoritmo da Segmentação

Dado um sinal discreto de entrada, $s(n) = s_1, s_2, s_3, s_4, \dots, s_n$, define-se uma janela de dados e, em um instante de tempo arbitrário, observa-se o valor do SEM. Então se desloca a janela ao longo do sinal e testa-se a correspondente mudança espectral no SEM. O sinal é definido quase-estacionário se o SEM estiver abaixo de um limiar Θ .

$$SEM = \left(\frac{1}{r(0)} - 1 \right)^2 + 2 \sum_{k=1}^M \left(\frac{r(k)}{r(0)} \right)^2. \quad (5.21)$$

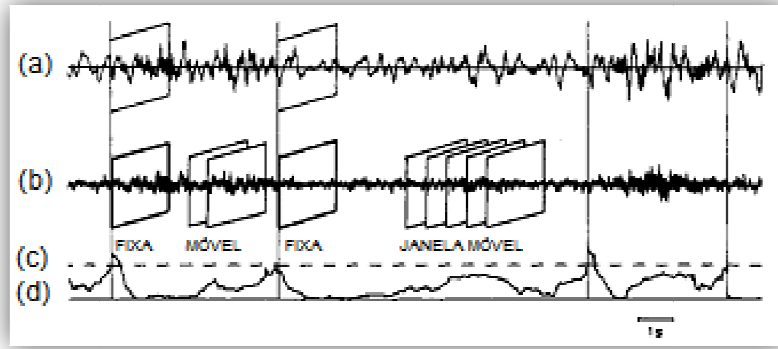


Figura 5.1 – Processo de segmentação. (a) Sinal EEG bruto. A barra indica a seção onde o filtro de predição linear é adaptado. (b) Resultado do erro de predição. A função de autocorrelação do erro de predição inicial é computada a partir da janela fixa; a função de autocorrelação corrente corresponde à janela móvel. (c) Limiar de segmentação. (d) SEM. (Modificado de (Bodenstein & Praetorius, 1977))

Seja, então, o sinal real representado pela série temporal $\dots, s_{-1}, s_0, s_1, \dots$, com zero arbitrário. O seguinte procedimento é adotado:

Passo (1): Calcula-se a autocorrelação de ordem p de acordo com

$$R(i) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^{N-|i|} s_n s_{n+|i|}, \text{ com } i = 1, \dots, p; \quad (5.22)$$

Passo (2): Calculam-se os coeficientes do filtro de predição linear de ordem p (algoritmo de Levinson-Durbin);

Passo (3): Dos valores do sinal, $s_{-N-p}, \dots, s_{n+N}$ calcula-se o erro de predição $e_{-N}, \dots, e_{n+N}$, de acordo com (5.23):

$$e_n = \sum_{k=0}^p a_k s_{n-k}. \quad (5.23)$$

De acordo com (5.22) define-se uma função de autocorrelação de curto tempo do erro de predição, por:

$$r(n; m) = \frac{1}{2N+1} \sum_{k=-N}^{N-m} e_{n+k} e_{n+k+m}; \quad (5.24)$$

Passo (4): Calcula-se $r(0;m)$ para $m = 0, \dots, M$ (janela fixa sobre o gráfico do erro de predição na Figura 5.1);

Passo (5): Calcula-se $r(n;m)$ para cada ponto (janela móvel sobre o gráfico do erro de predição, (Figura 5.1)):

$$r(n;m) = r(n-1;m) + e_{n+N}e_{n+N-m} - e_{n-N-1}e_{n+m-N-1}; \quad (5.25)$$

Passo (6): Define-se e calcula-se SEM_n para cada tempo n :

$$SEM_n = \left(\frac{r(0;0)}{r(n;0)} - 1 \right)^2 + 2 \sum_{k=1}^M \left(\frac{r(n;k)}{r(n;0)} \right)^2; \quad (5.26)$$

Passo (7): Testa se $SEM_n > \Theta$.

Se não, aumenta 1 em n e volta ao passo 5 (faz-se a janela deslocar);

Passo (8): Se sim, guarda-se a posição em que isso ocorre e reinicia-se o processo deslocando a janela para a posição imediatamente posterior ao ponto detectado. Reinicia-se o processo em (1).

5.3.2 Escolha de Parâmetros

A execução do programa depende da definição inicial de alguns parâmetros.

Na Figura 5.2 apresenta-se a janela principal do programa desenvolvido na linguagem MATLAB[®] para a segmentação do sinal da MEA.

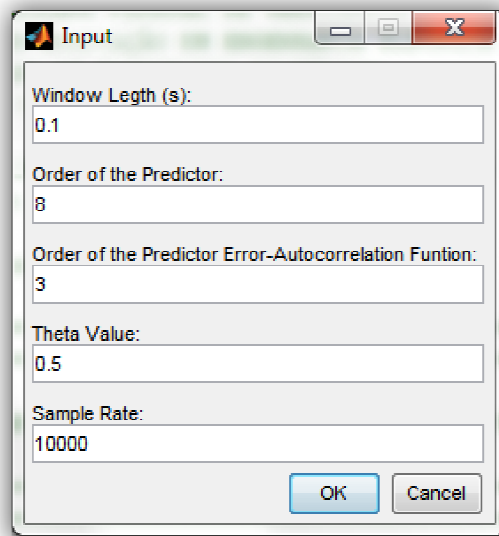


Figura 5.2 – Janela de entrada de dados do programa de segmentação do sinal da MEA.

A janela de dados, com tamanho $2N + 1$, deve ser pequena para uma segmentação acurada, porém grande o suficiente para uma estimação segura da função de autocorrelação (Bodenstein & Praetorius, 1977). No caso da MEA, vimos que a janela de dados pode ser 0,1 ou 0,2 s, por causa da perda de informação da densidade espectral de potência (seção 4.7).

O parâmetro mais importante é o p , a ordem do preditor do sinal. O número de operações requeridas pelo algoritmo de Levinson-Durbin é de ordem p^2 , então p deve ser mantido baixo. E associado ao p , temos M , a ordem da função de autocorrelação do erro de predição.

Em (Bodenstein & Praetorius, 1977) os autores discutem o valor de Θ , mas informam que este valor é bastante experimental. Em (Appel & Brandt, 1984; Wong & Abdulla, 2006) os autores afirmam sobre a dificuldade de ajuste de parâmetros para a técnica de segmentação pelo SEM.

5.4 Avaliação da Técnica de Segmentação

Por se tratar de uma técnica que busca segmentar sinais em virtude da mudança de comportamento dos mesmos, o método do SEM foi aplicado inicialmente a sinais eletroencefalográficos, visto que a dinâmica deste tipo de sinal é mais simples e conhecida na literatura que o sinal da MEA, sendo possível uma avaliação visual do resultado da segmentação. Esta foi uma forma encontrada de se avaliar o método antes de aplicá-lo ao sinal da MEA.

5.4.1 Resultados para Sinais EEG

Segundo (Bodenstein & Praetorius, 1977) e (Appel & Brandt, 1984), o ajuste dos parâmetros necessários para a segmentação do sinal EEG é complicado, o que pôde ser verificado na prática durante a realização dos testes. A escolha inicial dos parâmetros foi feita com base nos valores utilizados em (Bodenstein & Praetorius, 1977), porém variações significativas nestes valores foram efetuadas, buscando-se um melhor conjunto de parâmetros que se adequasse ao banco de dados EEG disponíveis para os testes.

O conjunto de sinais EEG utilizado nesses testes corresponde ao mesmo conjunto utilizado no capítulo anterior.

A tabela 5.1 abaixo mostra os valores do conjunto de parâmetros utilizados em alguns testes.

Tabela 5.1 – Valores de parâmetros para cada teste em sinal EEG.

Valor do Parâmetro/Teste	Tamanho da Janela (s)	Ordem do Filtro de Predição	Ordem da Função de Autocorrelação do Erro de Predição	Téta	Taxa de Amostragem (Hz)
Teste 1	0,1	8	3	0,5	200
Teste 2	0,1	8	3	5	200
Teste 3	2,0	8	3	0,5	200
Teste 4	2,0	8	3	5	200
Teste 5	2,0	20	3	5	200
Teste 6	2,0	20	10	5	200

Alguns resultados se mostraram insatisfatórios, gerando gráficos como os da Figura 5.3.

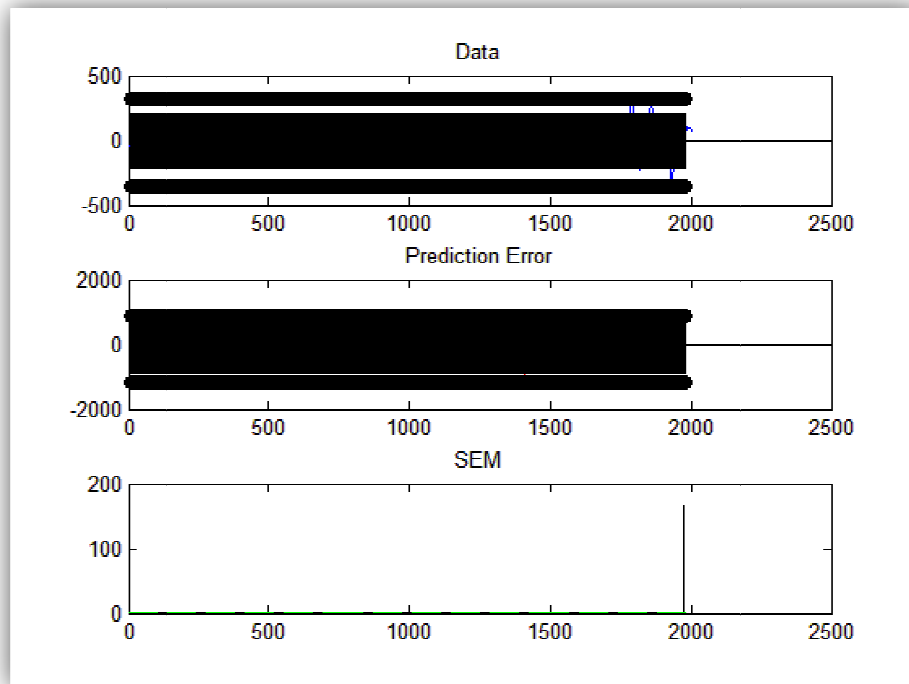


Figura 5.3 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epiléptica. Eletrodos T5-C1, com duração de 10 s (Teste 1).

As barras pretas verticais indicam os pontos em que o sinal foi segmentado. Devido aos valores dos parâmetros utilizados nesse teste, tanto no gráfico de *Data* quanto no de *Prediction Error* as barras pretas surgiram em quase todos os pontos, ou seja, o valor do SEM ultrapassou em, praticamente todos os pontos, o valor de $\Theta = 0.5$.

O valor de Θ está indicado pela linha pontilhada em verde claro no gráfico do SEM. Devido a uma questão de escala, todos os valores do SEM que ultrapassaram Θ foram suprimidos do gráfico, mantendo somente o valor correspondente ao Θ .

Fazendo-se uma alteração no valor de Θ , temos gráficos semelhantes à Figura 5.4.

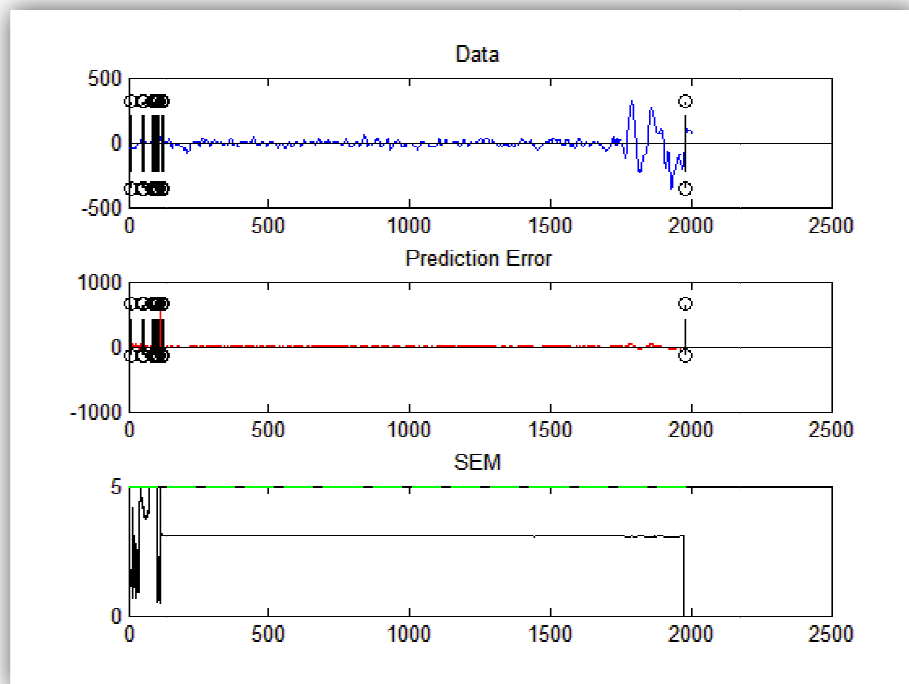


Figura 5.4 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epilética. Eletrodos T5-C1, com duração de 10 s (Teste 2).

O algoritmo deveria ter segmentado o sinal em um ponto próximo à amostra 1750 (eixo horizontal do primeiro gráfico). Entretanto, devido à dificuldade de ajuste de parâmetros, não se consegue facilmente uma segmentação correta.

Para outro conjunto de ajuste de parâmetros, conseguiu-se segmentar, de forma razoável, um trecho de sinal EEG onde existe evidência de crise epilética.

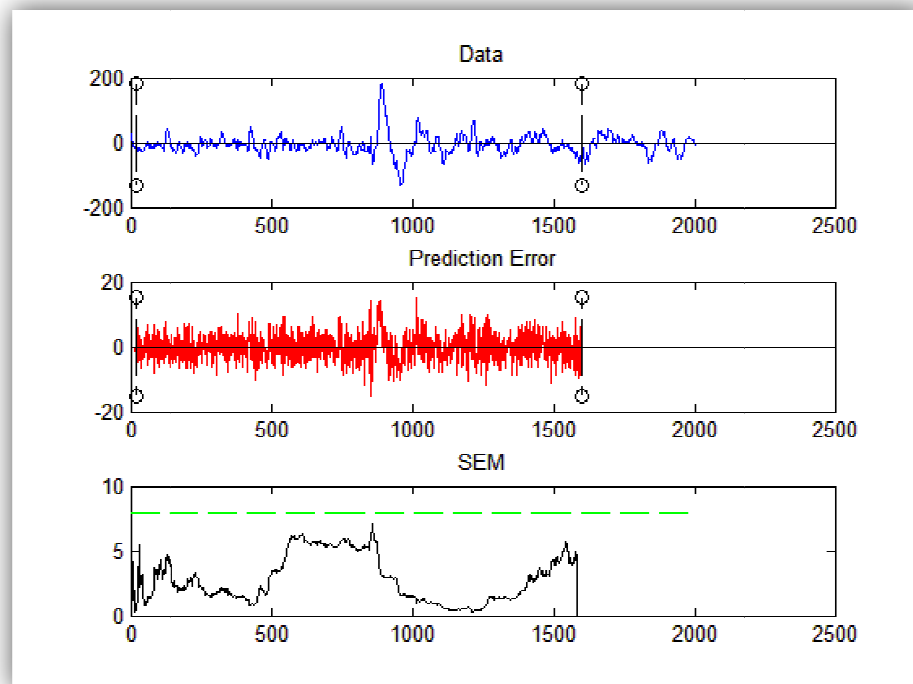


Figura 5.5 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epilética. Eletrodos T6-C2, com duração de 10 s. O ajuste de parâmetros não conseguiu identificar a presença de uma alteração (nesse caso uma espícula) entre as amostras 850 e 1000, aproximadamente.

Entretanto, existe a presença de uma alteração no sinal (nesse caso uma espícula) entre as amostras 850 e 1000, aproximadamente. Esta alteração do sinal pode ser percebida no gráfico do SEM, na mesma posição em que ocorre a alteração do sinal. Uma pequena variação no valor de Θ , colocando-o próximo ao valor do pico presente no ponto em questão, é suficiente para identificar a espícula e segmentar o sinal de forma mais eficiente, como mostrado na Figura 5.6.

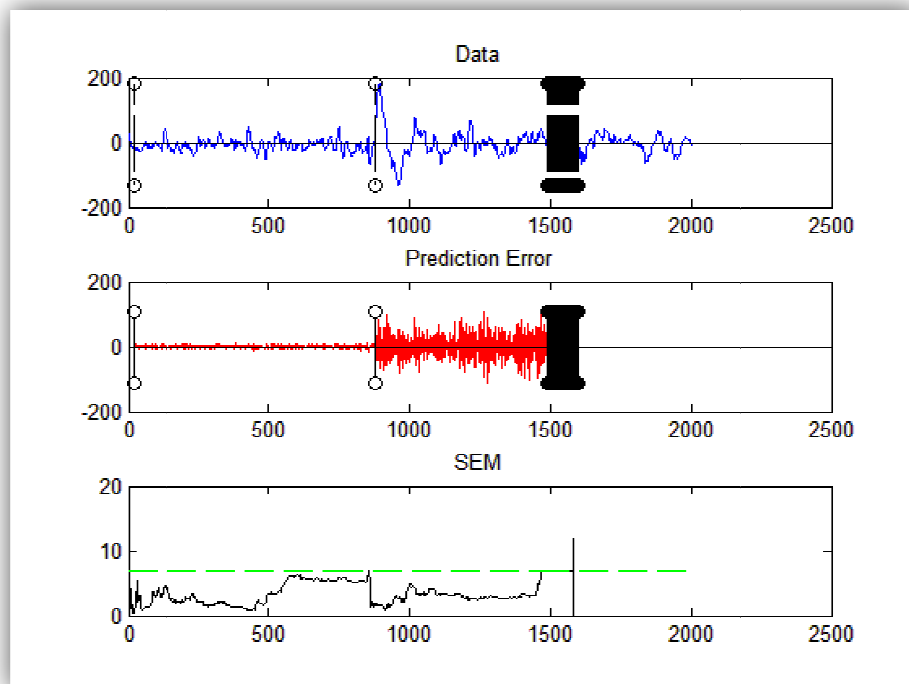


Figura 5.6 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epilética. Eletrodos T6-C2, com duração de 10 s. Uma pequena alteração no valor de Θ é suficiente para identificar a espícula e segmentar o sinal de forma mais eficiente.

5.4.2 Resultados para Sinais MEA

Os testes realizados para o sinal da MEA tomaram por base o conjunto de dados utilizados para a segmentação do sinal EEG. Foram realizados testes com trechos de sinais da MEA, semelhante ao procedimento adotado nos testes com a autocorrelação (vide seção 4.6.2). A tabela 5.2 abaixo mostra os valores do conjunto de parâmetros utilizados em alguns testes para os sinais da MEA.

Tabela 5.2 – Valores de parâmetros para cada teste em sinal MEA.

Valor do Parâmetro/Teste	Tamanho da Janela (s)	Ordem do Filtro de Predição	Ordem da Função de Autocorrelação do Erro de Predição	Teta	Taxa de Amostragem (Hz)
Teste 1	0,1	8	3	0,5	10000
Teste 2	0,1	8	3	5	10000
Teste 3	2,0	8	3	0,5	10000
Teste 4	2,0	8	3	5	10000
Teste 5	2,0	20	3	5	10000
Teste 6	2,0	20	10	100	10000

Semelhante ao ocorrido com o sinal EEG, os sinais da MEA apresentaram grande dificuldade no ajuste dos parâmetros.

Na Figura 5.7 mostra-se o que ocorreu em alguns dos testes com o sinal da MEA.

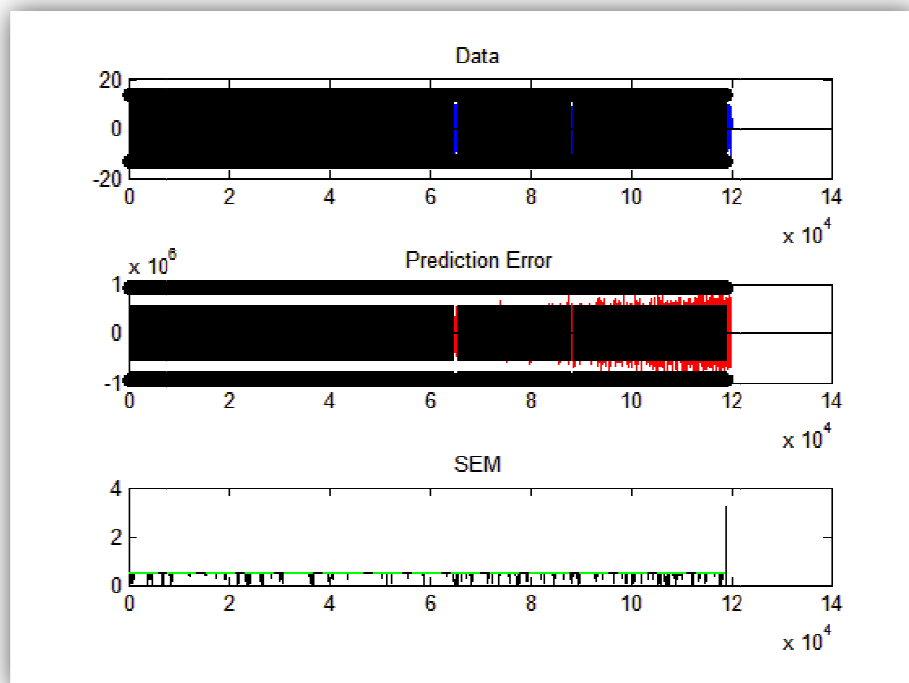


Figura 5.7 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com ruído biológico. Imprecisão no ajuste dos parâmetros não permite segmentar de forma correta o sinal.

O sinal com ruído biológico não apresenta mudanças significativas no seu comportamento, principalmente na amplitude. Neste caso, o sinal foi considerado pelo programa como “segmentado em toda parte”, ou seja, o comportamento praticamente constante do sinal não foi suficiente para que o SEM também se mantivesse “estável” abaixo do limiar. Assim, o SEM sofreu alterações o tempo todo, ultrapassando o valor do limiar $\Theta = 0,5$.

Com base nos resultados de diversos testes, alterando-se o valor do limiar Θ para 100, observa-se uma mudança significativa no padrão da segmentação, conforme pode ser verificado na Figura 5.8.

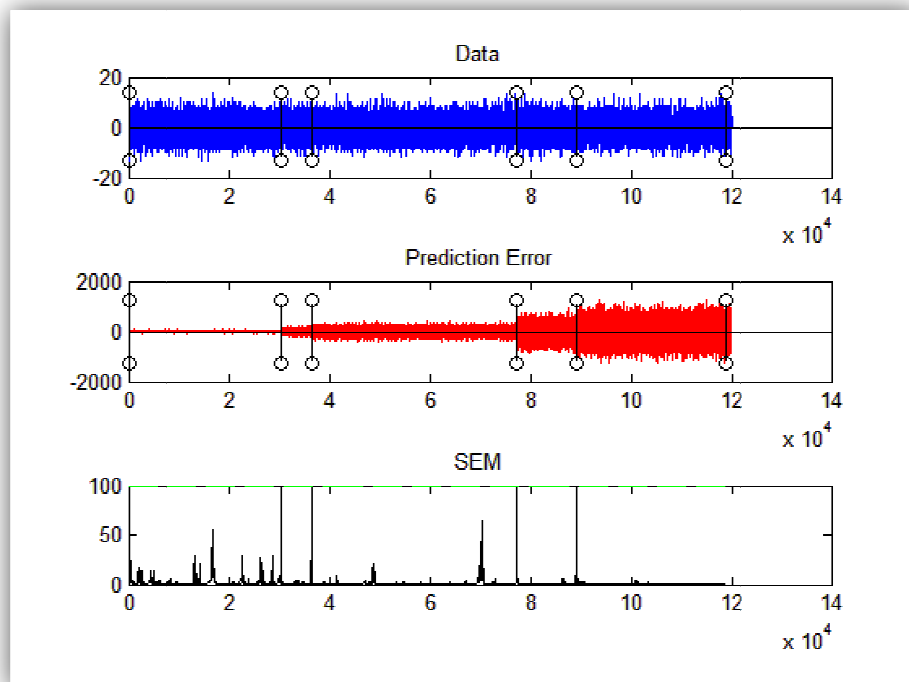


Figura 5.8 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com ruído biológico. Apesar de não ser possível identificar as mudanças no sinal, o programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos.

Utilizando-se um sinal contendo *spikes* isolados, e fazendo-se alterações mais significativas nos parâmetros, é possível verificar a melhora significativa na identificação de segmentos.

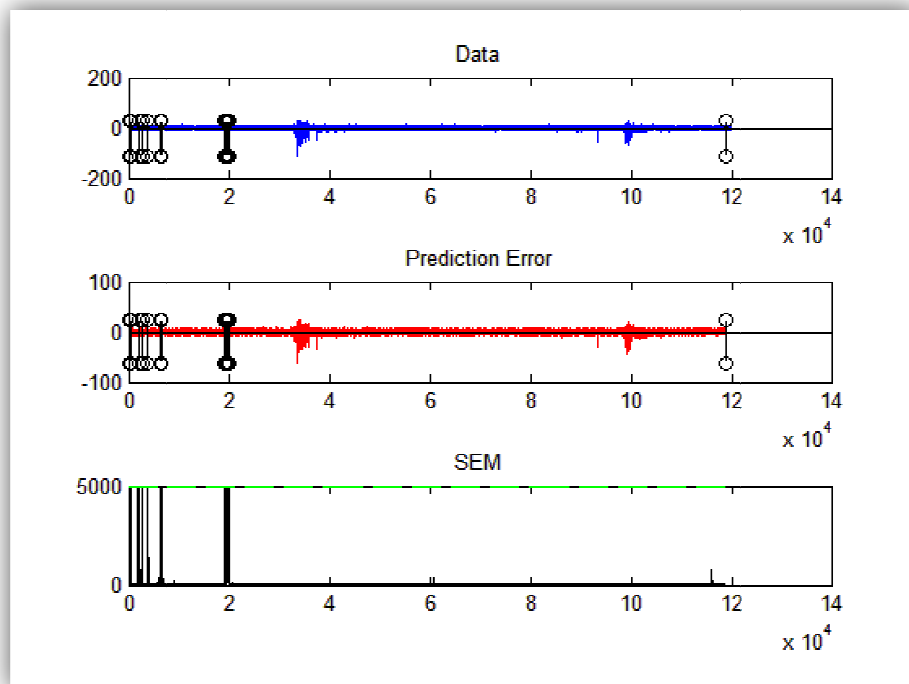


Figura 5.9 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com spikes isolados. O programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos, entretanto, não é possível perceber alterações que justifiquem determinados segmentos.

Em um trecho contendo *bursts*, os resultados não diferem muito dos outros encontrados para os trechos com *ruído biológico* e *spikes isolados*.

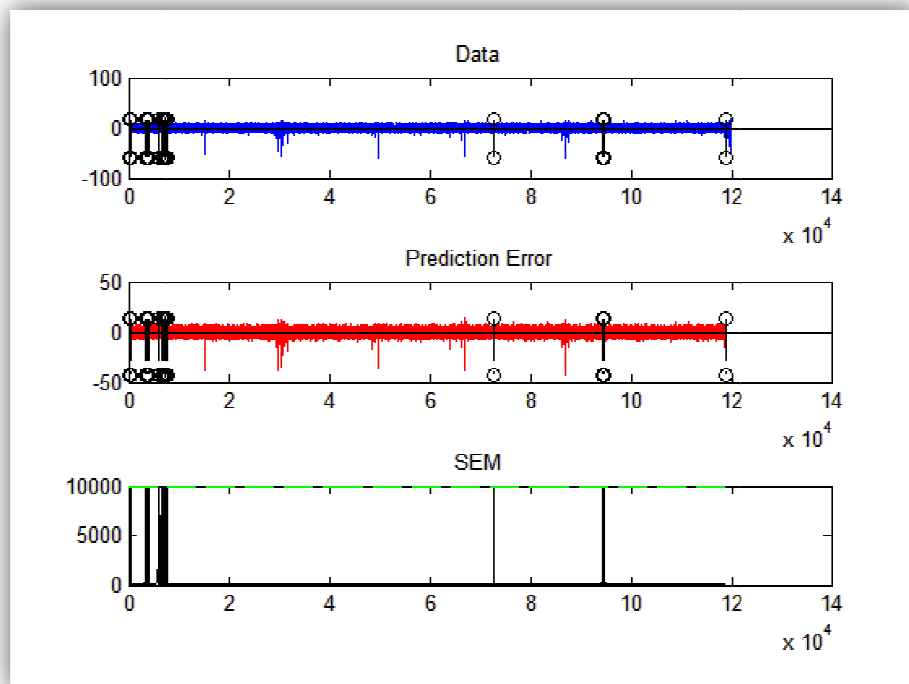


Figura 5.10 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com bursts. O programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos, entretanto, outros segmentos não conseguiram ser identificados.

5.5 Conclusões

A técnica de segmentação de sinais apresenta-se útil e aplicável, entretanto, o ajuste dos parâmetros torna sua utilização prática um tanto quanto complexa.

A busca por um conjunto de parâmetros adequados pode ser ainda mais extensa, visto que para cada tipo de sinal estes “parâmetros ótimos” podem sofrer alterações significativas.

O parâmetro que apresenta maior relevância na segmentação é, sem dúvidas, o valor de Θ , cujo valor “ótimo” pode variar bastante de um trecho para outro, no mesmo sinal. Uma solução alternativa poderia estar em definir um Θ variável, que se adaptasse a cada trecho de sinal. Entretanto, a variação do valor de Θ não poderia se apoiar nos mesmos critérios utilizados para a segmentação pela técnica do SEM, mas sim em outra forma de avaliação da dinâmica do sinal. Porém, isto tornaria a técnica de segmentação ainda mais complexa.

Estudos propostos na literatura, como em (Appel & Brandt, 1984; Wong & Abdulla, 2006), avaliam outras técnicas além do SEM. A saber: NLEO (*Non-Linear Energy Operator*), GLR (*Generalized Likelihood Ratio*) e ACF (*Autocorrelation Function procedure*). Esta última técnica, baseada em autocorrelação, mostrou-se a menos precisa, enquanto que a técnica do SEM ocupa uma segunda colocação, atrás somente da GLR.

Capítulo 6

Conclusões e Trabalhos Futuros

Neste último capítulo, são analisadas as contribuições deste trabalho, além de serem feitas sugestões importantes para trabalhos futuros que poderão ser realizados a partir desta dissertação.

A proposta inicial deste trabalho foi o desenvolvimento de uma ferramenta capaz de segmentar os registros de sinais de matrizes multieletrodo (MEAs) a partir do seu padrão estatístico de comportamento, para que os mesmos pudessem ser estudados de acordo com os tipos de atividades presentes em cada trecho.

O cumprimento da proposta exigiu uma série de pesquisas iniciais, tais como: o estudo dos processos fisiológicos envolvidos na geração dos sinais elétricos nos neurônios, a pesquisa das principais técnicas matemáticas associadas à segmentação de sinais e o estudo do funcionamento de ferramentas matemáticas associadas à segmentação de sinais através de testes computacionais.

Concluídas essas etapas, foram desenvolvidos programas em MATLAB[®] para o estudo do funcionamento das ferramentas matemáticas e para a realização da segmentação.

O programa de segmentação de sinais, desenvolvido inicialmente para segmentação de sinais de MEA, foi testado para sinais EEG. A realização destes testes permitiu um primeiro contato da técnica com sinais reais, possibilitando um ajuste de parâmetros.

Entretanto, esse ajuste de parâmetros mostrou-se bastante complexo para ambos os sinais: EEG e MEA. Esta dificuldade de ajuste dos parâmetros já era esperada, como relatado em (Wong & Abdulla, 2006) e (Appel & Brandt, 1984).

Contudo, os testes computacionais envolvendo a ferramenta matemática de autocorrelação produziram análises bastante interessantes. Como, por exemplo, a informação de que a dinâmica de sinais de MEA pode ser melhor observada dentro de intervalos de 0,1 a 2,0 s, segundo os valores encontrados para o *tempo de decaimento* e sua análise com base na densidade espectral de potência.

A ferramenta de autocorrelação também se mostrou bastante interessante para uma possível aplicação na diferenciação entre culturas *inativas* e *ativas* que só apresentem ruído biológico, podendo ser utilizada como indicativo de *inatividade celular*.

Assim, neste trabalho, foi dada uma ênfase relativamente extensa no que diz respeito à fundamentação teórica que envolve ferramentas matemáticas utilizadas classicamente na segmentação de sinais. Esta postura se apóia no princípio de que todo trabalho científico desenvolvido deve apresentar informação coesa para possível reprodução e avaliação, em qualquer momento.

Este trabalho pôde, ainda, contribuir como uma forma de investigação da utilização de uma técnica de segmentação para sinais de matrizes multieletrodo, o que não é discutido na literatura clássica acerca da MEA.

6.1 Trabalhos futuros

Este trabalho implica na geração de uma nova ferramenta para a identificação de inatividade celular em culturas de neurônios, sendo necessária a realização de testes mais extensos para diversos tipos de culturas e para mais de um canal de MEA. Esses testes deverão ser realizados para validar, ou não, a técnica.

Segundo a proposta inicial de segmentação de sinais da MEA, poder-se-á realizar novos estudos com outras técnicas, tais como GLR e NLEO. Estes estudos de segmentação poderão abrir novas portas ao estudo de sinais de matrizes multieletrodo.

Referências Bibliográficas

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., et al. (1997). *Biologia Molecular da Célula. Biologia*. Porto Alegre/RS: Editora Artes Médicas.
- Appel, U., & Brandt, A. V. (1984). A comparative study of three sequential time series segmentation algorithms. *Signal Processing*, 6(1), 45-60. doi: 10.1016/0165-1684(84)90050-1.
- Bodenstein, G., & Praetorius, H. M. (1977). Feature Extraction from the Electroencephalogram by Adaptive Segmentation. *Proceedings of the IEEE*, 65(5), 642-652. doi: 10.1109/PROC.1977.10543.
- Cardoso, R. R. (2005). *Uma Estratégia de Modelagem Tridimensional para Mapeamento de EEG de Superfície*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Chiappalone, M. (2003). Acquisition and Processing of Electrophysiological Signals: a New Perspective towards Brain-Machine Interface.
- Childers, D. G. (1997). *Probability and Random Processes Using MATLAB with Applications to Continuous and Discrete Time Systems*. *Journal of the American Statistical Association* (1st., Vol. 94, p. 433). United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Debergh, P., & Read, P. (1991). *Micropropagation: Technology and Application*. *Technology*. London: Kluwer Acad. Publishers.
- Granado-Filho, A. G. (1994). *Estudo de estimadores de correlação baseados no emprego de quantização grosseira e "dithering."*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Campinas, Campinas-SP.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006). *Textbook of Medical Physiology*. *Sciences-New York* (11th., p. 1116). Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Inc.
- Haykin, S. (1996). *Adaptive Filter Theory* (3rd., p. 989). New Jersey: Prentice-Hall, Inc.

- Klisch, C., Inyushkin, A., Mordel, J., Karnas, D., Pévet, P., Meissl, H., et al. (2009). Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 30(1), 6575. Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06794.x.
- Lathi, B. (2003). *Introducción a la teoría y sistemas de comunicación*. Limusa. México, D.F.: Editorial Limusa, S.A. de C.V. Retrieved from <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRIUAN.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=025369>.
- Leach, J. P., Stephen, L. J., Salveta, C., & Brodie, M. J. (2006). Which electroencephalography (EEG) for epilepsy? The relative usefulness of different EEG protocols in patients with possible epilepsy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 77(9), 1040-2. doi: 10.1136/jnnp.2005.084871.
- Manwani, A., Steinmetz, P. N., & Koch, C. (2000). Channel Noise in Excitable Neuronal Membranes. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 12, 143-149. Kaufmann. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=A6J8kzUhCcAC&oi=fnd&pg=PA143&dq=Channel+Noise+in+Excitable+Neuronal+Membranes&ots=K1k310gB1v&sig=yCw6HNzlY7eM_YTIQ-Hv7nxKrOA.
- Martinoia, S., Bonzano, L., Chiappalone, M., Tedesco, M., Marcoli, M., Maura, G., et al. (2005). In vitro cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensing applications. *Biosensors & bioelectronics*, 20(10), 2071-8. doi: 10.1016/j.bios.2004.09.012.
- Meister, M., Pine, J., & Baylor, D. (1989). Multielectrode recording from the vertebrate retina. *Invest. Ophthalmol. Vis.*, 30(Suppl.), 68.
- Meister, M., Pine, J., & Baylor, D. (1994). Multi-neuronal signals from the retina: acquisition and analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 51(1), 95-106. doi: 10.1016/0165-0270(94)90030-2.
- Meister, M., Wong, R. O., Baylor, D. A., & Shatz, C. J. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5008), 939-43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2035024>.
- Novellino, A., Chiappalone, M., Vato, A., Bove, M., Tedesco, M. B., Martionia, S., et al. (2003). Behaviors from an electrically stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays. *Neurocomputing*, 52-54(14 Div), 661-669. doi: 10.1016/S0925-2312(02)00861-5.
- Pine, J. (1980). Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *Journal of Neuroscience Methods*, 2(1), 19-31. doi: 10.1016/0165-0270(80)90042-4.

- Praetorius, H. M., Bodenstein, G., & Creutzfeldt, O. D. (1977). Adaptive Segmentation of EEG Records: A New Approach to Automatic EEG Analysis. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 42(1), 84-94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/64352>.
- Rabiner, L., & Schafer, R. (1978). *Digital Processing of Speech Signals* (p. 512). New Jersey: Prentice-Hall.
- Radujkov, I., & Senk, V. (2001). New Directions to Autocorrelation Function Estimation. In *5th International Conference on Telecommunications in Modern Satellite, Cable and Broadcasting Service, 2001. TELSIKS 2001* (Vol. 2, pp. 571-574). Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:New+Directions+to+Autocorrelation+Function+Estimation#0>.
- Rangayyan, R. M. (2001). *Biomedical signal analysis: a case-study approach* (1st., p. 552). Piscataway, NJ: Wiley – IEEE Press.
- Roger, L. L. (2009). Processos Aleatórios e Ruídos. Retrieved from [www.ft.unicamp.br/~leobravo/Gerais/Notas de aula Slides.pdf](http://www.ft.unicamp.br/~leobravo/Gerais/Notas%20de%20aula/Slides.pdf).
- Shimazaki, H., & Shinomoto, S. (2007). A method for selecting the bin size of a time histogram. *Neural computation*, 19(6), 1503-27. doi: 10.1162/neco.2007.19.6.1503.
- Steinmetz, P. N., Manwani, A., Koch, C., London, M., & Segev, I. (2000). Subthreshold Voltage Noise Due to Channel Fluctuations in Active Neuronal Membranes. *Journal of Computational Neuroscience*, 9(2), 133-48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030518>.
- Systems, M. C. (2005). Microelectrode Array (MEA) User Manual. Multi Channel Systems MCS GmbH. Retrieved from http://www.multichannelsystems.com/fileadmin/user_upload/Manuals/MEA_Manual.pdf.
- Systems, M. C. (2008). Innovations in Electrophysiology: Multi Channel Systems. Retrieved from www.multichannelsystems.com.
- Taketani, M., & Baudry, M. (2006). *Advances in network electrophysiology: using multi-electrode arrays. Neurosciences* (p. 478). New York: Springer Science+Business Media, Inc. Retrieved from <http://www.lavoisier.fr/notice/fr606806.html>.
- Thomas Jr., C. A., Springer, P. A., Loeb, G. E., Berwald-Netter, Y., & Okun, L. (1972). A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental Cell Research*, 74(1), 61-66. doi: 10.1016/0014-4827(72)90481-8.
- Vato, A., Bonzano, L., Chiappalone, M., Cicero, S., Morabito, F., Novellino, A., et al. (2004). Spike manager: a new tool for spontaneous and evoked neuronal networks

activity characterization. *Neurocomputing*, 58-60, 1153-1161. doi: 10.1016/j.neucom.2004.01.180.

Wheeler, B. C., & Novak, J. L. (1986). Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 33(12), 1204-12. doi: 10.1109/TBME.1986.325701.

Widrow, B., & Kollár, I. (2008). *Quantization Noise - Roundoff Error in Digital Computation, Signal Processing, Control, and Communications*. *IEEE Transactions on Information Theory* (1st., p. 751). New York: Cambridge University Press. Retrieved from www.cambridge.org/9780521886710.

Windhorst, U., & Johansson, H. (1999). *Modern Techniques in Neuroscience Research* (p. 1311). Berlin: Springer Verlag. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=cjCnNtIhjMQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Cytological+Staining+Methods&ots=vj0f7GMCE-&sig=vYDvuOQvcjMNR23X1UyiMfa0fAE>.

Wong, L., & Abdulla, W. (2006). Time-frequency evaluation of segmentation methods for neonatal EEG signals. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, 1(1), 1303-6. doi: 10.1109/IEMBS.2006.259472.

Yamaguchi, C. (2003). Fourier and Wavelet Analyses of Normal and Epileptic Electroencephalogram (EEG). *Proceedings of the 1st International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering*, 406-409. Retrieved from <http://crf.flib.u-fukui.ac.jp/dspace/handle/10461/3168>.

Anexo 1

Estudo de Protocolo de Cultura de Neurônios em Ratos

Células podem viver, se reproduzir e até mesmo expressar suas propriedades em uma placa de cultura de tecidos. Esta é uma forma de simulação do ambiente natural dessas células, o que permite uma manipulação e monitoração dos efeitos da adição ou remoção de soluções específicas, como hormônios e fatores de crescimento, além de possibilitar a análise das interações entre diferentes tipos de células. Entretanto, a maioria das células de vertebrados morre após um número finito de divisões em cultura. Supõe-se que este limite de tempo de vida está relacionado com o limite de tempo de vida do animal do qual a célula se derivou (Alberts et al., 1997; Debergh & Read, 1991).

1 Preparação da Pré-Cultura

Para a preparação da pré-cultura é necessário utilizar o polímero Poli-D-Lisina (PDL 0,1 mg/ml) e Laminina para isolar a superfície da MEA esterilizada, aumentando a adesão das células. Acrescentar 80-100 mL desta solução na matriz e deixar descansar. No dia seguinte, retirar o excesso de PDL com água destilada e aplicar a solução de

Laminina 0,02 mg/ml por 2 a 3 horas. Lavar com água destilada e secar antes de aplicar as células (Martinoia et al., 2005).

2 Dissecção

Os neurônios da cultura analisada na MEA são neurônios do hipocampo e do córtex de ratos. Os neurônios são obtidos dos embriões de rato de 18-19 dias. Para retirá-los é preciso anestesiá-los uma rato preta com O_2/CO_2 em uma superfície limpa. Fazer um corte transversal no músculo abdominal inferior para expor o útero e remover os embriões para uma placa de Petri com HBSS (*Solução Salina Balanceada de Hank*). Isolar as cabeças e com uma tesoura pequena, cuidadosamente, retirar o cérebro do crânio. Separar e isolar os lobos corticais com a ajuda de fórceps afiados e remover completamente as meninges antes de remover o hipocampo (Martinoia et al., 2005).

3 Dissociação de Células

Depois de toda preparação, mover a placa de Petri para um fluxo laminar esterilizado. Cortar cada córtex em partes pequenas e as transferir para um tubo de centrífuga de 15 mL, contendo 2-3 mL de solução de tripsina 0,125 %, para cada córtex. O hipocampo é tratado na mesma solução de tripsina, porém não será picado. Colocar o tubo em banho-maria a 37 °C e incubá-lo por 20-25 minutos para o córtex e 15-18 minutos para o hipocampo. Sacudir gentilmente os tubos a cada 5 minutos. Retirar o máximo possível de tripsina com uma pipeta e, para bloquear a digestão proteolítica, adicionar 5-8 mL de meio Neurobasal contendo 10 % de soro FBS (*Soro Fetal Bovino*). Repetir este procedimento duas vezes. Centrifugar cada suspensão de células por 5 minutos a 900-1000 rpm e reter as células em 10 mL de meio Neurobasal suplementado com 2 % de B-27 e 1 % de Glutamax-1. Contar o número de células com um hemocitômetro e diluir a suspensão das células corticais a uma concentração final de $6-8 \times 10^5$ células por mL e 60-80 μ L em cada um dos poços de cultura da MEA (Martinoia et al., 2005).

4 Manutenção da Cultura

Colocar a MEA em um incubador umedecido com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Cada semana trocar parte do meio antigo por meio fresco. Quatro dias depois de ter chapeado as células, acrescentar 50 µL de solução Ara-C 10 µM para inibir a replicação e o crescimento excessivo de células não neurais. Incubar por 24-36 horas e, depois deste tempo, modificar o meio. Os experimentos são executados começando na segunda semana com um mês de antecedência (Martinoia et al., 2005).

5 Tempo Necessário

Para dissecar os fetos e preparar cada suspensão de células, tanto do córtex como do hipocampo, se gasta de 1 hora e 30 minutos a 2 horas, utilizando de 6 a 8 embriões (Martinoia et al., 2005).

Anexo 2

Interpretação dos Parâmetros κ_m e Δ_{m-1}

Os parâmetros κ_m são chamados de *coeficientes de reflexão*. “O uso do termo vem de uma analogia feita com a teoria de linhas de transmissão, onde o κ_m pode ser considerado como o coeficiente de reflexão na fronteira entre duas seções com impedâncias de diferentes características” (Haykin, 1996).

Para o parâmetro Δ_{m-1} , este pode ser interpretado como a correlação cruzada entre o erro de predição direta $f_{m-1}(n)$ e o erro de predição inversa atrasado $b_{m-1}(n-1)$ (Haykin, 1996).

$$\Delta_{m-1} = E[b_{m-1}(n-1)f_{m-1}^*(n)]. \quad (\text{A3.1})$$