

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



**Modelos de Predição Linear para a Análise
de Sinais Eletroencefalográficos (EEG) e
de Matrizes Multieletrodo (MEA)**

Jaqueline Alves Ribeiro

Maio
2006

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

Modelos de Predição Linear para a Análise de Sinais Eletroencefalográficos (EEG) e de Matrizes Multieletrodo (MEA)

Jaqueline Alves Ribeiro

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 29 de maio de 2006.

Banca Examinadora:

Prof. Elisângela P. Silveira Lacerda, Dra. (ICB/UFG)

Prof. Gilberto Arantes Carrijo, Dr. (FEELT/UFU)

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

Prof. João Yoshiyuki Ishihara, Dr. (ENE/UnB)

Prof. Ubirajara Coutinho Filho, Dr. (Fequi/UFU)

Prof. Wilson Felipe Pereira, Dr. (ICBIM/UFU)

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

R482m Ribeiro, Jaqueline Alves, 1981-

Modelos de predição linear para a análise de sinais
eletroencefalográficos (EEG) e de matrizes multieletrodo (MEA)
/ Jaqueline Alves Ribeiro. - Uberlândia, 2006.

174 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. I.
Destro Filho, João Batista. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

CDU: 61:62

Modelos de Predição Linear para a Análise de Sinais Eletroencefalográficos (EEG) e de Matrizes Multieletrodo (MEA)

Jaqueline Alves Ribeiro

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. Darizon Alves de Andrade, Ph.D.
Coordenador do curso de Pós-Graduação

*Aos meus pais, Antônio e Luzia,
as minhas irmãs Adriana e Andrea
e ao meu afilhado Gabriel Victor
pelo apoio e incentivo.
Esta não é apenas uma conquista minha,
mas sim de todos vocês, por tudo que fizeram por mim.
Obrigada!*

Agradecimentos

A **Deus** pela vida e por guiar meus caminhos, por todas as bênçãos concedidas para superar os momentos difíceis nesta jornada. Minha fé em Ti me fez acreditar que as vitórias surgem através de esforços.

Aos **meus amados pais, Antônio e Luzia**, pelos princípios com que me criaram, carinho e amor que tenho recebido; as minhas irmãs, **Adriana e Andrea**, em especial à Andrea por me ajudar a superar a dor nos momentos mais difíceis, pela amizade, e sempre estar do meu lado, incondicionalmente. Ao meu sobrinho **Gabriel Victor**, o filho da dindinha, que me faz ver a vida do jeito dele, com as brincadeiras e risadas; ao meu cunhado **Alessandro**, pelo apoio prestado, às vindas em Uberlândia, às mudanças, e a **toda minha família**, tios, tias, avós, primos e primas, que sempre torceram pelo meu sucesso.

À madrinha **Ondina** por todo carinho e apoio prestado durante esta caminhada, seus conselhos e sua amizade. Suas filhas **Lara e Laís**, pelas descontrações.

À amiga **Flávia**, minha mãezinha de Uberlândia, pelo carinho, força e dedicação, por estar sempre por perto me auxiliando, em particular, às idas ao supermercado, à hidroginástica, à fisioterapia, e aos amigos que conheci a partir dela, à célula **Geração Águia** pelos ensinamentos bíblicos. Foi muito gratificante conhecer vocês!

Aos **meus amigos de longe e de perto** pela força e inspiração nessa jornada, as conversas “jogadas fora”, as brincadeiras, as comidas comunitárias na Kitnet, os conselhos, os passeios, os puxões de orelha merecidos, enfim... Só Deus sabe o quanto

foram importantes quando os colocaram em meu caminho. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao meu orientador **João Batista Destro Filho**, pelo constante estímulo e toda atenção dedicada, e também pela compreensão nas minhas ausências, por toda confiança depositada em mim para a finalização da dissertação.

Aos **coordenadores da Pós-graduação** com os quais tive contato durante minha caminhada pela compreensão e apoio, acreditando em minha capacidade para concluir esta jornada; à secretária **Marli Junqueira Buzzi** pela dedicação e carinho e a **todos os funcionários** da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia que contribuíram de alguma maneira para a conclusão desta dissertação.

À **CAPES** pela oportunidade do financiamento, mas que não foi possível até o final, pois tive que me ausentar durante o tratamento.

Ao **Laboratório de Engenharia Biomédica (BIOLAB)** pelo amparo tecnológico e estrutural, **aos colegas do BIOLAB**, pela amizade e apoio durante esta jornada, em especial, àqueles que conviveram comigo, Ailton Jr., Eduardo, Geovane, Guilherme, Fábio, Karina, Marcelle, Saulo, Tiago Finotti. Obrigada a todos pelas contribuições!!

A todos os professores que compõem a banca, pelas discussões realizadas para a finalização deste trabalho, e também a disponibilidade em participar da defesa.

Aos alunos de Iniciação Científica, **Rodrigo R. Cardoso** e **Aline R. de Assis** pela ajuda no processamento dos sinais, com esforço e dedicação. Ao acadêmico de Graduação de Engenharia Elétrica (UFU) **Ronaldo J. Viana**, por ter estudado toda a base de dados EEG que compõem este trabalho.

À **Universidade de Tampere** (Finlândia), em particular ao Prof. A. Värri, pelo fornecimento da base de dados EEG. Também ao Prof. S. Martinoia, ao doutorando A. N. Ide e todos os colegas da DIBE – Universidade de Gênova, Itália, pelo fornecimento dos dados MEA utilizados neste trabalho. À **Prof. Nathalia Peixoto**, Universidade de Washington, USA, pelo registro das atividades elétricas neurais em microcrustáceos.

Ao **Dr. Aguinaldo Bertucci** (Hospital de Clínicas de Uberlândia), neurocirurgião, e ao doutorando **Fábio J. Parreira** (BIOLAB), pelo intenso trabalho de análise e classificação do banco de dados EEG.

Ao **Prof. Rodrigo Lemos Pinto** (UFG) pelas referências bibliográficas, quando estava em Goiânia.

Aos **colegas da Pós-Graduação**, pelo companheirismo, colaboração e aprendizagem que desenvolvemos juntos.

Por fim, agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse feito, por me auxiliarem na imensa e inacabável tarefa de auto-conhecimento.

*Não sei...
Se a vida é curta ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
Se não tocamos o coração das pessoas.
Muitas vezes basta ser:
Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.
E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais,
Mas que seja intensa, verdadeira, pura...
Enquanto durar...
Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”*

Cora Coralina

Resumo

RIBEIRO, J. A. *Modelos de Predição Linear para análise de Sinais Eletroencefalográficos (EEG) e de Matrizes Multieletrodo (MEA)*. Uberlândia: FEELT-UFU, 2006, 174 f.

Esta dissertação objetiva propor modelos de sinais neurofisiológicos, oriundos de matrizes multieletrodo (MEA), utilizadas para a aquisição da atividade neural espontânea a partir de células em cultura; bem como medidas neurológicas obtidas de eletroencefalografia (EEG). Os modelos são desenvolvidos no contexto aplicativo de MEAs utilizadas como neuroimplantes, com especial enfoque na detecção e prevenção de crises epiléticas a partir de sinais EEG ou de medidas mais invasivas, obtidas em nível celular. Sob este enfoque, as técnicas de processamento de sinais devem satisfazer um compromisso complicado, exigindo baixa complexidade computacional e operação em tempo real. Tais restrições levam à escolha da filtragem linear adaptativa, baseada em modelo auto-regressivo, e à teoria de estatísticas de ordem elevada (EOE) para, respectivamente, processar sinais não-estacionários e considerar a não-linearidade dos sistemas envolvidos. O filtro de predição linear funcionou adequadamente para ambos os sinais, sendo que para o caso da MEA, ele foi mais estável e preciso. Observou-se um menor tempo de convergência para sinais EEG relativamente aos sinais MEA, os quais, em sua maioria, podem ser considerados não-gaussianos e correlacionados, ocorrendo uma atividade periódica em eletrodos vizinhos. A atividade neural espontânea de pequenos grupos de neurônios pode ser considerada um ruído branco.

Palavras-chave: predição linear, estatística de ordem elevada, eletroencefalografia, matriz multieletrodo, neuroimplante, codificação neural.

Abstract

RIBEIRO, J. A. *Linear-Prediction Models for Electroencephalographic (EEG) and Multielectrode-Array (MEA) Signal Analysis*. Uberlândia: FEELT-UFU, 2006, 174 f.

This work establishes models of neurophysiological signals, which are composed of spontaneous activity measurements taken by means of multielectrode arrays (MEAs) applied on *in vitro* cell cultures; as well as of neurological signals based on electroencephalography. These models suppose that MEAs are employed as neuroprostheses applied for detection and forecast of epileptic seizures, based on EEG signals or on invasive measurements which are taken in a cellular level. From this point of view, the signal processing tools must fulfil a problematic trade-off involving low computational complexity and real-time operation. Such requirements lead to the choice of auto-regressive adaptive-linear filtering and high-order statistics (HOE) as the techniques to be used in order to cope with, respectively, non-stationary signals and nonlinear systems. Linear prediction of both signals is quite efficient, particularly in the case of MEA signals, for which the model is stable and accurate. On the other hand, the convergence times for EEG signals are lower than their respective counterparts for MEA signals, which may be considered mainly non-Gaussian and correlated. Cyclic activity was also observed for MEA signals associated with neighboring electrodes, whereas signals recorded from small groups of neurons present a white-noise behaviour.

Key-words: linear prediction, high-order statistics, electroencephalography, multielectrode arrays, neuroprostheses, neural coding.

Conteúdo

Lista de Figuras.....	XVI
Lista de Tabelas.....	XXII
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XXIV
1. Introdução	26
2. Conceitos básicos em neurofisiologia e neurologia	31
2.1 Introdução.....	31
2.2 O neurônio	32
2.2.1 Membrana Celular	34
2.2.2 Canais iônicos.....	36
2.3 Sinapses entre neurônios	39
2.4 Potencial de membrana dos neurônios	42
2.4.1 Potencial de ação	42
2.4.2 Potencial Pós-Sináptico (PPS).....	46
2.5 Medidas Neurofisiológicas: Matrizes Multieletrodo (MEA)	47
2.5.1 Culturas Celulares	47
2.5.2 Interface bioeletrônica	49
2.5.3 Matrizes Multieletrodo	50
2.5.4 Utilização e Fabricação das MEAs.....	52

2.5.5	Histórico	55
2.5.6	Aplicações	56
2.6	O Sistema Nervoso (SN)	62
2.6.1	Sistema Nervoso Central	64
2.6.1.1	A medula	65
2.6.1.2	O encéfalo	67
2.6.2	Sistema Nervoso Periférico	70
2.6.2.1	Sistema nervoso Autônomo.	70
2.6.3	Cérebro	71
2.6.3.1	O córtex cerebral.....	72
2.7	Medidas Neurológicas: O Eletroencefalograma (EEG)	74
2.7.1	Introdução.....	74
2.7.2	Medição	76
2.7.3	Características estatísticas do sinal EEG	80
2.7.4	Tipos de ondas EEG	81
2.8	Epilepsia	83
2.9	Conclusão	85
3.	Síntese Bibliográfica sobre Processamento de Sinais EEG e MEA	88
3.1	Introdução.....	88
3.2	Considerações gerais e processamento digital de sinais EEG.....	88
3.3	Processamento de sinais MEA	90
3.3.1	Pré-processamento e geração da série temporal e intervalos entre <i>spikes</i>	90
3.3.2	Classificação dos <i>spikes</i>	93

3.3.3	Estimação da conectividade neural	95
3.4	Conclusão	97
4.	Predição Linear Adaptativa e Estatística de Ordem Elevada (EOE)	100
4.1	Introdução.....	100
4.2	Filtragem Adaptativa.....	101
4.3	Cálculo dos Filtros	105
4.3.1	Filtro Ótimo: aproximações de Wiener	105
4.3.2	Filtros subótimos: aproximação estocástica	109
4.4	Predição Linear Direta (“forward”).....	111
4.4.1	Modelo auto-Regressivo (AR)	112
4.4.2	Modelo da Predição Linear Direta	112
4.4.3	CrITÉRIOS para uma boa predição.....	113
4.4.4	Solução ótima de Wiener para Predição Linear Direta	113
4.4.5	Solução subótima usando aproximação estocástica do Gradiente .	117
4.5	Predição Linear Reversa (“backward”)	119
4.5.1	Modelo auto-Regressivo (AR) Reverso	119
4.5.2	Modelo da Predição Linear Reversa.....	119
4.5.3	CrITÉRIOS para uma boa predição.....	120
4.5.4	Solução ótima de Wiener para Predição Linear Reversa	120
4.5.5	Solução subótima usando aproximação estocástica do Gradiente Reversa	121
4.6	Estatísticas de Ordem Elevada (EOE).....	122
4.6.1	Funções com uma variável aleatória	123
4.6.2	Funções com várias variáveis aleatórias.....	125

4.6.3	O ruído branco e os índices de descorrelação	128
4.7	Conclusão	129
5.	Simulações e Resultados.....	132
5.1	Introdução.....	132
5.2	Aquisição dos Sinais	133
5.3	Ferramentas e Metodologia	135
5.3.1	Processamento dos dados e critérios utilizados na Predição Linear.....	135
5.3.2	Processamento de dados utilizado para estimação dos índices de descorrelação	140
5.4	Resultados 1: EEG e Predição Linear	142
5.4.1	Processamento do banco de dados contendo sinais EEG com crise.....	142
5.4.2	Processamento do banco de dados contendo sinais EEG sem crise.....	144
5.4.3	Comparação dos resultados do banco de dados EEG/Crise e EEG/SemCrise.....	146
5.5	Resultados 2: MEA e Predição Linear	147
5.5.1	Processamento de dados de sinais MEA – Teste 1.....	147
5.5.2	Processamento de dados de sinais MEA – Teste 2.....	150
5.5.3	Resumo dos resultados dos Testes 1 e 2 e comparação dos resultados obtidos com os sinais EEG	151
5.6	Resultados 3: MEA como Ruído Branco	153
5.7	Conclusão	155
6.	Conclusões e Trabalhos Futuros	158
6.1	Conclusões gerais	158
6.2	Trabalhos futuros.....	162
	Referências Bibliográficas.....	163

Anexos	174
---------------------	------------

Lista de Figuras

Figura 1.1	Neurônios reais (adaptada de (LENT, 2001)).....	27
Figura 2.1	Um neurônio motor e suas partes constituintes (adaptada de (URL 1)).	33
Figura 2.2	Neurônios em conexão e o botão sináptico no detalhe (adaptada de (URL 2)).....	34
Figura 2.3	Desenho esquemático de uma célula, evidenciando suas organelas e a membrana plasmática (adaptada de (URL 4)).....	35
Figura 2.4	Desenhos esquemáticos da membrana plasmática com seus canais protéicos. Acima uma membrana com seus vários canais numa visão tridimensional (adaptada de (CARDOSO, 2005)). Abaixo os canais iônicos em evidência (adaptada de (LENT, 2001)).....	37
Figura 2.5	Sinapse química (adaptada de (URL 5))	39
Figura 2.6	Botões sinápticos em um neurônio receptor. Eles existem tanto no soma como nos dendritos, às vezes ocorrendo também no início do axônio (cone axonal) (adaptada de (GUYTON, 2002)).....	40
Figura 2.7	Botão sináptico em detalhe, evidenciando as vesículas e as mitocôndrias. Na fenda sináptica estão os neurotransmissores (adaptada de (FRISÓN, 1999)).....	41
Figura 2.8	Potencial de ação exibido em um osciloscópio (adaptada de (URL 6)).	43
Figura 2.9	Representação de uma onda de despolarização e repolarização associada ao potencial de ação (adaptada de (GUYTON, 2002)).....	43

Figura 2.10	Potencial de ação (adaptada de (VILELA, 2005))	44
Figura 2.11	Princípio do “tudo-ou-nada”: em A), o potencial de ação (PA) do neurônio pré-sináptico gera um potencial pós-sináptico excitatório (PPSE) que não chega a atingir o limiar; em B), um trem de PAs gera um PPSE que ultrapassa o valor de limiar, o que faz com que seja deflagrado um PA no neurônio pós-sináptico (adaptada de (LENT, 2001))	45
Figura 2.12	Eventos eletroquímicos da sinapse excitatória e sinapse inibitória (adaptada de (GUYTON, 2002)).....	47
Figura 2.13	Interface bioeletrônica (adaptada de (FROMHERZ, 2003)).....	49
Figura 2.14	Caminho neurônio- chip - neurônio (adaptada de (FROMHERZ, 2003)). Vide arranjo (c) da Figura 2.13.....	50
Figura 2.15	Conjunto de eletrodos em um tecido nervoso (adaptada de (RENNAKER, 2005))	51
Figura 2.16	Exemplos de aplicação das matrizes de microeletrodos (adaptada de PEIXOTO, 2001) (a) corte de cultura em tecido do cerebelo sobre MEA, (b) cultura celular de neurônios isolados do gânglio da raiz dorsal de ratos em cultura (14 dias).....	52
Figura 2.17	Matriz tridimensional fabricada com técnicas de microeletromecanismos (adaptada de (BAY, 2000)).....	53
Figura 2.18	Esquema geral da fabricação da MEA (adaptada de (PEIXOTO, 2001)).....	53
Figura 2.19	(a) Matriz de microeletrodos com neurônios e sinais extracelulares medidos de vários neurônios em cada eletrodo. Gânglio abdominal de Aplysia (adaptada de (STENGER, 1994)). (b) Sinais de uma matriz extracelular versus sinais medidos com eletrodos intracelulares (adaptada de (BEADLE, 1988)).....	58
Figura 2.20	MEA funcionando como neuroimplante em um nervo fibular (adaptada de (RUTTEN, 1999)).....	59

Figura 2.21	Esquema de um neuroimplante inteligente (adaptada de (PEREIRA, 2004))	60
Figura 2.22	Células gliares: astrócitos (nutrição), oligodentrócitos (sustentação) e células microgliais (defesa) (adaptada de (VILELA, 2005)).....	63
Figura 2.23	Figura esquemática mostrando o SNC, representado pelo encéfalo e pela medula e o SNP, representado pelos nervos (adaptada de (FRISÓN, 1999)).....	64
Figura 2.24	Meninges: Dura-máter (mais externa), Aracnóide (Intermediária) e Pia-máter (mais interna)(adaptada de (CARDOSO, 2005)).....	65
Figura 2.25	Medula Espinhal e Encéfalo (adaptada de (CARDOSO, 2005))	66
Figura 2.26	O encéfalo (adaptada de (URL 6))	67
Figura 2.27	Diencefalo e Tronco Encefálico. Vista posterior do encéfalo com exclusão do cerebelo (adaptada de (VILELA, 2005)).....	68
Figura 2.28	Ponte e Bulbo em evidência, com o cerebelo ao fundo e parte do telencefalo acima. Vista anterior do encéfalo (adaptada de (CARDOSO, 2005))	69
Figura 2.29	Secção mostrando a metade direita do encéfalo vista por dentro, evidenciando suas subdivisões (adaptada de (VILELA, 2005))	69
Figura 2.30	Sistema Nervoso Central e Periférico. Evidência de parte do Sistema Nervoso Autônomo (Simpático e Parassimpático), bem como de exemplo de nervos motores e sensoriais (adaptada de (CARDOSO, 2005))	71
Figura 2.31	Lobos do córtex cerebral (adaptada de (VILELA, 2005))	72
Figura 2.32	Subdivisões funcionais corticais, cerebelo e tronco encefálico (adaptada de (VILELA, 2005))	73
Figura 2.33	Eletrodos posicionados no escalpo e o registro eletroencefalográfico (adaptada de (LENT, 2001)).....	76
Figura 2.34	Eletrodos de disco de prata (modelos da Grass®) (adaptada de (BUTTON, 2000)).....	77

Figura 2.35	Eletrodos de agulha de platina (modelos da Grass®) (adaptada de (BUTTON, 2000)).....	77
Figura 2.36	Eletrodos nasofaríngeo (adaptada de (BUTTON, 2000)).....	78
Figura 2.37	Eletrodos prefixados em grade (adaptada de (BUTTON, 2000)). Touca com eletrodos posicionados (adaptada de (CARDOSO, 2005))	78
Figura 2.38	Eletrodos tipo clipe de orelha (“ear clip”) (adaptada de (BUTTON, 2000))	79
Figura 2.39	Eletrodos corticais (adaptada de (BUTTON, 2000)).....	79
Figura 2.40	Exemplos de ondas cerebrais (adaptada de (BUTTON, 2000) & BERNARDI, 1999)).....	83
Figura 3.1	Forma de onda extracelular com diferentes potenciais de ação (adaptada de (LEWICKI, 1998))	90
Figura 3.2	Métodos de extração da população dos spikes (PS) (adaptada de (CHAN, 2004))	93
Figura 3.3	Histograma de intervalo de neurônio cruzado. Eixo y: intervalo entre spikes [ms]. Eixo x: tempo [ms] (adaptada de (CASTELLONE, 2003)).....	96
Figura 4.1	Diagrama de blocos representando o problema de filtragem estatística (adaptada de (WIDROW, 1985))	102
Figura 4.2	Filtro Adaptativo usado para a identificação de um sistema (adaptada de (HAYKIN, 1991)).....	103
Figura 4.3	Aplicação da filtragem adaptativa ao modelamento inverso (adaptada de (HAYKIN, 1991)).....	104
Figura 4.4	Filtragem adaptativa aplicada à predição. A saída 1 corresponde à predição do valor de entrada; A saída 2 refere-se ao erro de predição (adaptada de (HAYKIN, 1991))	104
Figura 4.5	Filtro adaptativo utilizado no cancelamento de interferências (adaptada de (HAYKIN, 1991)).....	105

Figura 4.6	Ilustração do problema geral do Filtro de Wiener. Dados dois processos estacionários, $x(n)$ e $d(n)$, que são estatisticamente descorrelacionados entre si, o filtro $W(z)$ minimiza a estimativa do erro médio quadrático, $\hat{d}(n)$, de $d(n)$. (adaptada de (DE FATTA, 1988)).	106
Figura 4.7	Filtro Transversal com N coeficientes (adaptada de (HAYKIN, 1991))	107
Figura 4.8	Representação gráfica de w_1 x frequência	116
Figura 4.9	Representação gráfica de w_2 x frequência	116
Figura 4.10	Gráfico da Função Laplaciana, com seus momentos e cumulantes de ordem 1 a 4	127
Figura 4.11	Gráfico da Função Gaussiana, com seus momentos e cumulantes de ordem 1 a 4.	127
Figura 4.12	Gráfico da Função Uniforme, com seus momentos e cumulantes de ordem 1 a 4	127
Figura 5.1	Potenciais de ação associados a neurônios do gânglio cerebral do caramujo <i>Tritonia diomedea</i> (adaptada de (PEIXOTO, 2002))	134
Figura 5.2	Exemplo de um gráfico típico de eqm x n. Eixo x: tempo. Eixo y: erro quadrático médio	137
Figura 5.3	Exemplo de EQMr, em um gráfico típico de eqm x n. O valor de EQMr, calculado como média entre $n=400$ e $n=600$, é $EQMr \cong 68$	138
Figura 5.4	Exemplo de um gráfico típico de eqm x n em que o PM representa o ponto mais alto do gráfico, ocorrendo em $n \approx 600$	138
Figura 5.5	Exemplo de um gráfico típico de eqm x n em que o TC representa a convergência do sinal MEA $TC \cong 600$	139
Figura 5.6	Exemplo de gráfico típico de eqm x n para o caso de um sinal EEG com crise $TE \cong 600$	140
Figura 5.7	Gráfico PM x N para o processamento do banco de dados EEG/Crise.	142

Figura 5.8	Gráfico EQMr x N para o processamento do banco de dados EEG/Crise.....	142
Figura 5.9	Gráfico TC x N para o processamento do banco de dados EEG/Crise.	143
Figura 5.10	Gráfico TE x N para o processamento do banco de dados EEG/Crise.	143
Figura 5.11	Gráfico PM x N para o processamento do banco de dados EEG/Sem Crise.....	144
Figura 5.12	Gráfico EQMr x N para o processamento do banco de dados EEG/Sem Crise.....	145
Figura 5.13	Gráfico TC x N para o processamento do banco de dados EEG/Sem Crise.....	145
Figura 5.14	Gráfico PM x N para o sinal de MEA.	148
Figura 5.15	Gráfico EQMr x N para o sinal de MEA.....	148
Figura 5.16	Gráfico TC x N para sinal de MEA.....	149
Figura 5.17	Gráfico PM x N para o sinal de MEA.	150
Figura 5.18	Gráfico EQMr x N para o sinal de MEA.....	150
Figura 5.19	Gráfico TC x N para sinal de MEA.....	151

Lista de Tabelas

Tabela 2.1	Ondas cerebrais (adaptada de (BUTTON, 2000))	81
Tabela 4.1	Algumas aplicações da filtragem adaptativa.	103
Tabela 4.2	Função Laplaciana.....	127
Tabela 4.3	Função Gaussiana.....	127
Tabela 4.4	Função Uniforme.....	127
Tabela 4.5	Sumário das variáveis do filtro de Wiener (adaptada de (HAYKIN, 1991))	130
Tabela 5.1	Classificação dos sinais baseados nos índices de descorrelação	141
Tabela 5.2	Comparação dos resultados EEG/Crise e EEG/Sem Crise: Ordem de filtro e passo de adaptação.....	146
Tabela 5.3	Comparação dos resultados EEG/Crise e EEG/Sem Crise: Tempo de convergência e tempo de estacionariedade.....	146
Tabela 5.4	Comparação dos resultados EEG/Crise e EEG/Sem Crise: Pico Máximo e erro quadrático médio de regime permanente.	147
Tabela 5.5	Comparação dos Resultados MEA: Ordem de filtro e passo de adaptação	152
Tabela 5.6	Comparação dos Resultados MEA: Pico Máximo e erro quadrático médio de regime permanente.....	152
Tabela 5.7	Comparação dos Resultados MEA: Tempo de convergência	152

Tabela 5.8	Índices de descorrelação para diversos sinais	153
Tabela 5.9	IDE para os sinais MEA descorrelacionados	154
Tabela 5.10	IDE para os sinais MEA correlacionados.....	154
Tabela 5.11	IDE para os sinais MEA cíclicos.....	155

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADP	Adenosine Diphosphate (Difosfato de Adenosina ou Adenosina di-fosfato)
Ag-AgCl	Prata-cloreto de prata
ATP	Adenosine triphosphate (Trifosfato de Adenosina ou Adenosia tri-fosfato)
ANE	Atividade Neural Espontânea
AR	Modelo Auto-Regressivo
CMRR	Common-Mode Rejection Ratio (Razão de Rejeição em Modo Comum)
EEG	Eletroencefalografia, Eletroencefalograma ou Eletroencefalográfico(a)
eqm	Erro Quadrado Médio
EOE	Estatística de Ordem Elevada
EQMr	Erro Quadrado Médio de Regime Permanente
ERG	Eletroretinograma
GPS	Global Positioning System (Sistema de Posicionamento Global)
ICM	Interface Cérebro-Máquina
IDE	Índice de Descorrelação Elevada
K⁺	Íon Potássio
LMS	Least Mean Square (Mínimos Quadrados Médios)
MEA	Multielectrode Array (Matriz Multieletrodo)
N	Ordem do Filtro

Na⁺	Íon Sódio
P	Íon Fosfato
PA	Potencial de Ação
pdf	Função de densidade de probabilidade
PDS	Processamento Digital de Sinais
PM	Pico Máximo
PPS	Potencial Pós-Sináptico
PPSE	Potencial Pós-sináptico Excitatório
PPSI	Potencial Pós-sináptico Inibitório
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNR	Signal-To-Noise Ratio (Relação Sinal-Ruído)
SUS	Sistema Público de Saúde
TC	Tempo de Convergência
TE	Tempo de Estacionariedade
URL	Uniform Resource Locator (localização de informação na Internet)
USA	Estados Unidos da América
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
μ	Passo de Adaptação
Ω	Ohms

Capítulo 1

Introdução

O cérebro é um órgão que surpreende e impressiona. É como uma ponte, por assim dizer, entre consciência e mundo exterior. Por isso mesmo tem sido, ao longo da história humana, objeto de inúmeros questionamentos, instigando cientistas e filósofos a elaborarem diferentes perspectivas a respeito de suas funções. Todavia, graças ao avanço dos instrumentos médicos e aos estudos fisiológicos do corpo humano, o cérebro está sendo melhor compreendido.

Além de funções motoras e sensitivas, o cérebro é responsável ainda pelo desempenho de importantes atividades superiores como a memória e a cognição. Trata-se de um dos mais misteriosos órgãos do corpo humano. E por mais que tentemos desvendar seus segredos, é difícil compreendê-lo.

No entanto, a ciência médica, assim como a engenharia eletrônica, a computação, e, atualmente, a engenharia neural, seguem de mãos dadas com os avanços tecnológicos no intuito de melhor conhecer esta máquina, a qual, por sua vez nos permite conhecer o mundo. Logo, o enfoque das pesquisas envolve o neurônio (vide Figura 1.1), a unidade básica do sistema nervoso, e o grande responsável pelo processamento das informações no encéfalo.

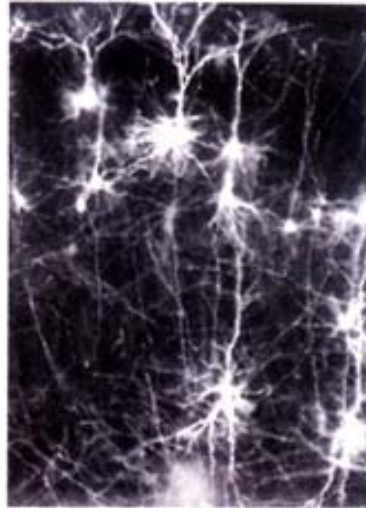


Figura 1.1 – Neurônios reais (adaptada de (LENT, 2001)).

O desenvolvimento de diversas técnicas, no século XX e no início do século XXI, capazes de realizar diferentes abordagens de estudo sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), vem possibilitando uma melhor compreensão do seu funcionamento (HOLLAND, 2003). Contudo, ainda há muitos questionamentos acerca de diversas patologias que afetam o SNC. Tornou-se possível estudar as atividades cerebrais, desde uma atividade motora ou sensitiva a uma atividade cognitiva, ou ainda o efeito de uma patologia. Todavia, diversas disfunções do corpo humano consistem em desafios para a medicina (Proc. IEEE, 2001). Dentre elas, devem-se destacar a epilepsia, o controle da dor, e as distrofias. Esses desafios envolvem o desenvolvimento de modelos matemáticos eficientes e compatíveis ao contexto fisiológico humano.

Uma das formas de modelar o cérebro se baseia no estudo dos potenciais elétricos evocados do córtex cerebral e captados por eletrodos dispostos no escalpo. Para tal estudo, a eletroencefalografia (EEG) consiste em uma importante ferramenta que permite o diagnóstico e a análise de diversas patologias que perturbam o cérebro, além do monitoramento de pacientes em enfermarias ou UTIs e o acompanhamento de fenômenos cognitivos.

Evidentemente, dentre estas patologias, pode-se citar a epilepsia, que atinge cerca de 1% da população mundial, ou 50 milhões de pessoas, dos quais 25% não respondem ao tratamento com o método tradicional (URL 10), que preconiza o uso de

drogas anticonvulsivantes. Pode-se citar, também, a dor crônica associada a processos metastáticos em pacientes terminais (Proc. IEEE, 2001).

As novas hipóteses sobre os mecanismos desencadeantes das crises epiléticas, fruto concreto da interação entre médicos e engenheiros, aliada à moderna tecnologia de instrumentação biomédica, sugerem novas formas de terapia. Em LITT e colaboradores (2003), os autores descrevem planos para a construção de neuroimplantes que minimizariam crises epiléticas, incluindo experimentos preliminares de eletroestimulação em animais. Tais circuitos funcionariam como marcapassos cardíacos, monitorando a atividade elétrica do cérebro e identificando fatores responsáveis por uma crise. Uma vez detectada a possibilidade iminente de crise, o dispositivo provocaria uma eletroestimulação no cérebro ou em um nervo periférico, com objetivo de eliminar a crise. Similarmente, neuroimplantes também poderiam ser utilizados para minimizar sensações dolorosas, através da eletroestimulação, ou da neuromodulação obtida através da filtragem seletiva de potenciais de ação do sistema nociceptivo.

Por outro lado, as recentes pesquisas estão causando uma revolução nos conceitos de instrumentação neurofisiológica. Dentre elas, estão a interface bioeletrônica, que permite mecanismos de transdução de um impulso nervoso de um neurônio para dentro de um circuito eletrônico e vice-versa. Deve-se citar, também, as matrizes multieletrodo (RUTTEN, 2002), que permitem a aquisição sistemática de potenciais de ação, utilizando os neurônios em cultura.

Além disso, através de estímulos elétricos e da análise da resposta neural celular a estes, obtém-se resultados interessantes, diretamente aplicáveis em neurociência e em procedimentos ligados à reabilitação. Esta pesquisa constitui a base essencial para a utilização clínica de neuroimplantes especializados e/ou eletroestimulação em seres humanos, as quais são atualmente limitadas pelos elevados custos da tecnologia de matrizes multieletrodo (MEA).

De qualquer forma, o desenvolvimento tecnológico da MEA, aliada ao rompimento de barreiras no modelamento de sistemas complexos, tende em médio e longo prazos estabelecer novos pontos de vista sobre as patologias do sistema nervoso, incluindo também os sinais EEG.

Enfim, surgem os desafios para a concretização destas novas terapias, que são paralelos ao desafio do modelamento dos fenômenos biológicos associados. Dentre estes, para o processamento de sinais, podem-se citar:

- ✓ Propor modelos simples para compreensão intuitiva e desempenho eficiente, através de algoritmos de baixa complexidade computacional;
- ✓ Estabelecer um conhecimento sobre as características estatísticas do sinal MEA, buscando novos pontos de vista sobre as patologias que envolvem a alteração da neurodinâmica, associada à transmissão de informações através do SNC;
- ✓ Processar simultaneamente, através de MEA, vários tipos de sinais biológicos, tanto em nível celular, como em nível neurológico (EEG).

Esta dissertação representa um passo inicial para o desenvolvimento de tecnologia própria, em resposta aos desafios mencionados no parágrafo anterior. As estratégias escolhidas para atingir as metas acima citadas estão descritas em detalhes em cada um dos capítulos deste trabalho.

No Capítulo 2, faz-se uma síntese dos conceitos básicos de neurofisiologia e neurologia, bem como sobre as respectivas medidas que fornecem os sinais elétricos utilizados nesta dissertação: a instrumentação através de MEAs, baseadas em culturas *in vitro*, e os exames EEG. Discutem-se também aspectos fisiológicos e epidemiológicos da epilepsia.

No Capítulo 3, faz-se uma breve síntese das principais técnicas atualmente empregadas para o processamento de sinais oriundos de EEG e MEA, com enfoque neste último.

Com isso, no Capítulo 4, apresentam-se as ferramentas teóricas propostas que tentam, de certa maneira, minimizar as limitações das técnicas atualmente utilizadas na análise da codificação neural e da epilepsia, buscando atender ao máximo os desafios especificados como metas deste trabalho.

No Capítulo 5, apresentam-se os resultados obtidos através da aplicação das técnicas apresentadas no Capítulo 4 à análise de sinais MEA e EEG. Apresentam-se os cálculos e os resultados finais que conduzem aos modelos simples, em termos das aproximações auto-regressiva e ruído branco.

Por fim, no Capítulo 6, são analisados os resultados obtidos em comparação aos desafios iniciais. Sugestões importantes para trabalhos futuros, que poderão ser realizados a partir desta dissertação, são também apresentadas.

As principais contribuições desta dissertação são listadas logo abaixo:

- ✓ A apresentação de um texto único, reunindo informações fisiológicas em nível celular e neurológico, que propicia uma conexão entre a epilepsia, o EEG, a MEA e os fenômenos fisiológicos associados (Capítulo 2);
- ✓ A discussão a respeito dos índices de descorrelação elevada (Capítulo 4);
- ✓ O estabelecimento de modelos paramétricos AR para sinais EEG e MEA, de baixa complexidade computacional (Capítulo 5), permitindo conclusões importantes no contexto aplicativo de neuroimplantes;
- ✓ A investigação detalhada, até a ordem n^o4, sobre a estrutura estatística dos sinais MEA (Capítulo 5), que sugere novas perspectivas para o estudo da codificação neural.

Capítulo 2

Conceitos básicos em neurofisiologia e neurologia

2.1 Introdução

Neste capítulo apresentam-se os conceitos sobre os quais se baseiam as medidas eletrofisiológicas que contextualizam a aplicação deste trabalho. Também se apresentam as estruturas biológicas de interesse, com suas respectivas instrumentações, em dois níveis: celular e neurológico.

Inicialmente, faz-se um estudo do neurônio, em particular de suas propriedades especiais no que diz respeito aos potenciais elétricos. Em seguida, analisa-se o sinal de matriz de multieletrodo (MEA), sua fabricação e aplicações, como também as novas técnicas de instrumentação neurofisiológica que sugerem a implementação de neuroimplantes especializados.

Em seguida, de forma sucinta, explicam-se os princípios gerais do funcionamento do sistema nervoso, destacando-se algumas áreas funcionais do cérebro, uma vez que sua compreensão influencia a interpretação dos sinais de eletroencefalografia (EEG). Consequentemente, faz-se uma breve revisão sobre os sinais de EEG e suas características estatísticas; e também da epilepsia, suas causas, tipos e conseqüências na população mundial, particularmente no Brasil.

2.2 O neurônio

Todos os estímulos do nosso ambiente, causando sensações como dor e calor; os sentimentos, pensamentos, programação de respostas emocionais e motoras; a aprendizagem e memória, a ação de drogas psicoativas, os distúrbios mentais; bem como qualquer outra ação ou sensação do ser humano, não podem ser entendidas sem o conhecimento do processo de comunicação entre os neurônios.

O neurônio é uma célula como qualquer outra: possui organelas, núcleo individualizado, necessita de oxigênio e nutrientes, e é envolta por uma membrana plasmática. O que diferencia um tipo de célula de outra é a sua função no nosso organismo. Portanto o que difere os neurônios de outras células, além da sua maior necessidade metabólica, é a sua função especializada. Ela tem como função *receber, processar e transmitir impulsos eletroquímicos*, ou *impulsos nervosos*, que são sinais de comunicação e codificação. Pode, assim, ser considerado como a unidade funcional fundamental do sistema nervoso (LENT, 2001).

Cada neurônio compreende (vide Figura 2.1):

- ✓ um corpo celular que contém um núcleo, retículo endoplasmático muito abundante (corpos de Nissl), mitocôndrias, aparelho de Golgi e neurofibrilas;
- ✓ uma ou mais ramificações de filamentos citoplasmáticos finos, denominados dendritos, que conduzem os impulsos até ao corpo celular;
- ✓ um prolongamento, o axônio, que pode ser muito longo e apresentar ramificações na sua parte distal ou, ao longo da sua extensão, formando ramificações colaterais. Em alguns casos, os axônios podem estar rodeados por uma substância esbranquiçada, de natureza lipídica, a mielina, recoberta por uma película de citoplasma contendo núcleos, designada por bainha de Schwann. A bainha de mielina é descontínua, dando origem à formação de nódulos de Ranvier.



Figura 2.1 – Um neurônio motor e suas partes constituintes (adaptada de (URL 1))

Os neurônios são células grandes, com numerosas projeções, denominadas dendritos. A maioria dos sinais é recebida pelos neurônios em seus dendritos, outros sinais são recebidos no corpo celular e alguns poucos no início do axônio. Acredita-se que no cérebro existam cerca de 100 bilhões de neurônios.

Qualquer função cognitiva, como pensar, mover, dormir, olhar, sentir, envolve a integração de um número desconhecido de neurônios, em áreas específicas do cérebro; e de estruturas nervosas do organismo, fora do cérebro. Os neurônios se interconectam em complexas cadeias, e a mensagem viaja através de cada neurônio na forma de impulsos.

Os sinais elétricos transmitidos pelos neurônios se baseiam na movimentação de íons (átomos, ou grupos de átomos, que perderam ou receberam elétrons), com cargas positivas ou negativas, que se formam ao longo do neurônio como fruto de reações químicas. Os neurônios podem ser classificados como:

- ✓ Neurônios sensoriais ou aferentes: transmitem impulsos do exterior para o sistema nervoso central;
- ✓ Neurônios motores ou eferentes: transmitem impulsos do sistema nervoso central para o exterior;
- ✓ Neurônios de associação: conduzem impulsos entre os outros dois tipos de neurônios.

Como qualquer outra célula, o neurônio possui um certo potencial de membrana, a ser discutido mais adiante. O neurônio, por ser uma célula excitável, tem este potencial modificado dependendo dos estímulos que sofre através de sinapses (Figura

2.2), ou de outros estímulos. A variação do potencial de membrana percorre o axônio como uma onda de *despolarização e repolarização*, que vai até os botões sinápticos.

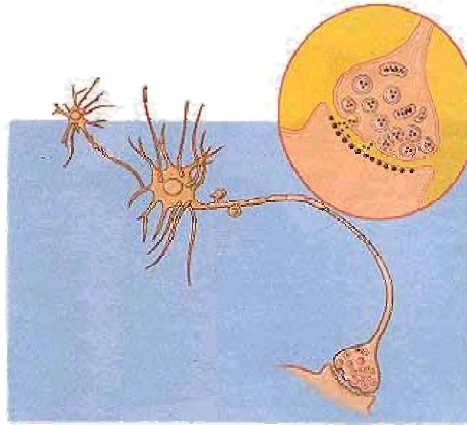


Figura 2.2 – Neurônios em conexão e o botão sináptico no detalhe (adaptada de (URL 2))

Devido à bainha de mielina, a propagação do sinal ocorre de nódulo em nódulo, uma vez que o potencial de ação somente pode ser regenerado nos nódulos, o que faz com que este possa chegar ao seu destino de forma mais rápida. Este tipo de propagação é denominado de *condução saltatória*. Além disso, a resultante do somatório de capacitâncias e resistências adicionais das bainhas de mielina, envolvendo o axônio neuronal, contribuem muito para o aumento da velocidade de condução das fibras nervosas.

2.2.1 Membrana celular

A membrana neuronal funciona como uma barreira para delimitar o citoplasma e excluir certas substâncias presentes que banham os neurônios. Sua espessura é de 5 nm, aproximadamente, e está repleta de proteínas e lipídeos. A função dos neurônios não pode ser compreendida sem o conhecimento da estrutura e função da sua membrana, bem como das proteínas associadas.

Quase 70% de toda massa corpórea de um ser humano adulto é basicamente composto de água, sendo o resto composto principalmente por sais dissolvidos na água, lipídios, proteínas e glicose. Logo, pode-se dizer que toda célula pode ser considerada como uma cápsula contendo uma solução aquosa. O que separa esta cápsula do meio externo, denominado meio extracelular, é uma membrana semipermeável constituída

basicamente de lipídios e proteínas (membrana lipoprotéica), conhecida como *membrana plasmática* (Figura 2.3).

Quando um sal se dissolve em água, suas ligações iônicas se desfazem, uma vez que a elevada constante dielétrica da água diminui a intensidade da força iônica e as moléculas de água solvatem os íons. Ou seja, sais dissolvidos em água se transformam em íons livres (cátions e ânions, moléculas eletricamente carregadas positivamente e negativamente), o que origina potenciais elétricos tanto no meio intra quanto no meio extracelular.

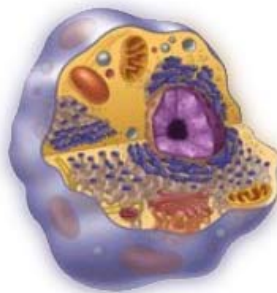


Figura 2.3 – Desenho esquemático de uma célula, evidenciando suas organelas e a membrana plasmática (adaptada de (CARDOSO, 2005))

Devido a este fenômeno, e como a composição iônica do meio intracelular se difere da composição do meio extracelular, as células do nosso corpo apresentam uma diferença de potencial elétrico entre o meio interno e o meio externo, que é denominada de *potencial de membrana* ou *potencial de repouso* da membrana. O interior da membrana celular apresenta uma carga elétrica menor que a carga elétrica exterior. Portanto, o potencial elétrico interno é negativo em relação ao potencial elétrico externo, que é tomado por referência.

A origem desse potencial elétrico pode ser explicada a partir da compreensão dos fenômenos eletroquímicos protagonizados pela membrana plasmática e por dois importantes íons existentes em nosso corpo, dentro e fora das células: sódio (Na^+) e potássio (K^+).

Quando em equilíbrio (dinâmico), existe uma diferença de concentração desses íons entre os meios intra e extracelular: há maior concentração de Na^+ no meio externo à célula e de K^+ no meio interno, além disso, há maior concentração de ânions orgânicos dentro da célula. Isso acontece devido à semipermeabilidade da membrana plasmática e

devido à sua capacidade de selecionar o trânsito de substâncias entre a célula e o meio em que ela se encontra, denominada *permeabilidade seletiva*.

A água trafega de um lado ao outro da membrana celular por pressão osmótica. Ou seja, apesar de ser altamente insolúvel nos lipídios da membrana, a água atravessa prontamente a totalidade da membrana celular, passando, quase toda ela, através dos canais existentes nas moléculas protéicas (GUYTON, 2002).

Podemos afirmar que o canal protéico se liga a uma molécula de ATP (trifosfato de adenosina), que trafega no meio intracelular. Ocorre então a quebra, formando ADP (difosfato de adenosina) e P (fosfato), liberando energia. Assim, o canal se modifica, atrai e se liga a três íons de sódio (três cargas positivas) no lado interno da membrana e a dois íons de potássio (duas cargas positivas) do lado externo. Portanto, injeta o potássio e ejeta o sódio. Isso ocorre de forma mais rápida que o funcionamento dos canais de transporte passivo, o que contribui para a permanência de um potencial de cerca de -70 mV no meio intracelular em relação ao meio extracelular. Esse processo é denominado de *equilíbrio dinâmico*.

Além de contribuir para a manutenção do potencial de membrana num dado valor de tensão, uma das principais funções da bomba Na^+/K^+ é o controle do volume das células. Sem o funcionamento dessa bomba, a maioria das células do corpo sofreria tumefação, até ocorrer sua ruptura (GUYTON, 2002).

2.2.2 Canais iônicos

Os canais iônicos regulam o fluxo de íons através da membrana de todas as células. Em particular, nas células neurais e musculares, eles são importantes para o controle das rápidas variações do potencial de membrana, associadas ao potencial de ação e aos potenciais pós-sinápticos das células-alvo (KANDEL, 2000).

Esses canais são grandes proteínas que atravessam toda a estrutura da membrana, incluindo grupos carboidratos (glicoproteínas) presos à sua superfície, conforme a Figura 2.4. Todos os canais apresentam um poro aquoso central, que se estende de uma face à outra da membrana. Muitos canais são formados por duas ou mais subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes, permitindo o fluxo de íons de

modo seletivo, continuamente ou em resposta a estímulos elétricos, químicos ou mecânicos (LENT, 2001).

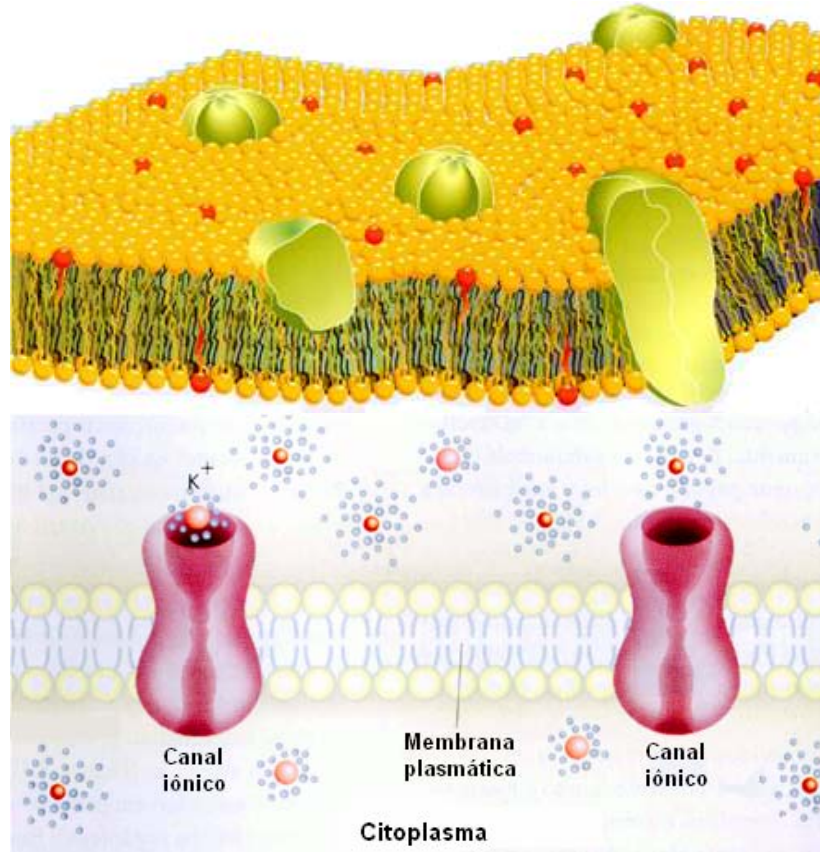


Figura 2.4 – Desenhos esquemáticos da membrana plasmática com seus canais protéicos. Acima uma membrana com seus vários canais numa visão tridimensional (adaptada de (CARDOSO, 2005)). Abaixo os canais iônicos em evidência (adaptada de (LENT, 2001))

A membrana plasmática de todas as células, inclusive das neurais, consiste em um mosaico de lipídios e de proteínas. A superfície dessa membrana é formada por uma dupla camada de fosfolipídios. Nessa lâmina lipídica contínua, ficam embebidas as moléculas de proteína, inclusive os canais iônicos.

A facilidade com que um íon se desloca dentro de uma solução (sua mobilidade ou constante de difusão) não depende simplesmente da sua dimensão, como também do tamanho da molécula do solvente. O canal iônico abre e fecha de forma *tudo-ou-nada*, resultando em breves pulsos de corrente através da membrana. Se o potencial elétrico variar através da membrana, a corrente que flui pelo canal se altera

proporcionalmente. A corrente é linearmente relacionada à força propulsora; em outras palavras, o canal se comporta como um resistor elétrico (KANDEL, 2000).

Os canais iônicos são classificados em dois tipos:

- ✓ os *canais catiônicos*, que, na maioria das vezes, permitem a passagem de íons sódio, quando estão abertos; mas às vezes, também permitem a passagem de íons potássio e/ou cálcio;
- ✓ os *canais aniônicos*, que permitem, sobretudo, a passagem de íons cloreto, mas, também, de quantidades diminutas de outros ânions (GUYTON, 2002).

Os canais catiônicos que conduzem íons sódio são revestidos por cargas negativas. Essas cargas atraem os íons sódio carregados positivamente para dentro do canal, quando o diâmetro deste aumenta até um tamanho maior que aquele do íon sódio hidratado. Essas mesmas cargas negativas, porém, repelem os íons cloreto e outros ânions, impedindo sua passagem.

Já para os canais aniônicos, quando seu diâmetro se torna suficientemente grande, conduzem íons cloreto para seu interior e seguem para o lado oposto; enquanto os cátions sódio, potássio e cálcio são bloqueados, porque a dimensão de seus íons hidratados impedem sua passagem pelos canais aniônicos.

Portanto, uma substância transmissora que abre os canais catiônicos é denominada de *transmissor excitatório*. Ao contrário, a abertura de canais aniônicos, permitindo a entrada de cargas elétricas negativas, inibe o neurônio. Essas substâncias transmissoras que abrem estes canais são denominadas de *transmissores inibitórios*.

Quando a substância transmissora ativa o canal iônico, este se abre em fração de milissegundos; quando a substância transmissora não está mais presente, o canal se fecha de modo igualmente rápido. Desta forma, a abertura e o fechamento dos canais iônicos permite um meio para o controle rápido dos neurônios.

2.3 Sinapses entre neurônios

Os neurônios devem desencadear informações sobre o estado interno do organismo e seu ambiente externo, avaliar esta informação, e coordenar atividades apropriadas à situação e às necessidades atuais do organismo. Cada neurônio se comunica com o seguinte por meio de *sinapses nervosas* (Figura 2.5), que pode ser definida como o conjunto de fenômenos bioquímicos ocorrendo no espaço de conexão entre os neurônios. O número de conexões de um único neurônio pode variar de algumas unidades até algumas centenas de milhares, segundo (GUYTON, 2002).

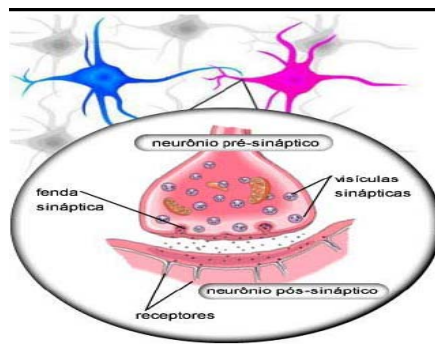


Figura 2.5 - Sinapse química (adaptada de (URL 3))

A célula nervosa cuja terminação do axônio se conecta ao soma ou ao dendrito do outro neurônio é denominado de *neurônio pré-sináptico*, sendo responsável pelo envio do impulso. O neurônio seguinte, que recebe o impulso, é denominado de *neurônio pós-sináptico*. Entre esses dois neurônios existe a *fenda sináptica*, de largura compreendendo 200 a 300 Angstroms.

Aproximadamente 80% a 95% dos botões ou terminais pré-sinápticos (Figura 2.6) se situam nos dendritos dos neurônios pós-sinápticos, e apenas 5% a 20% se situam sobre o soma (GUYTON, 2002).

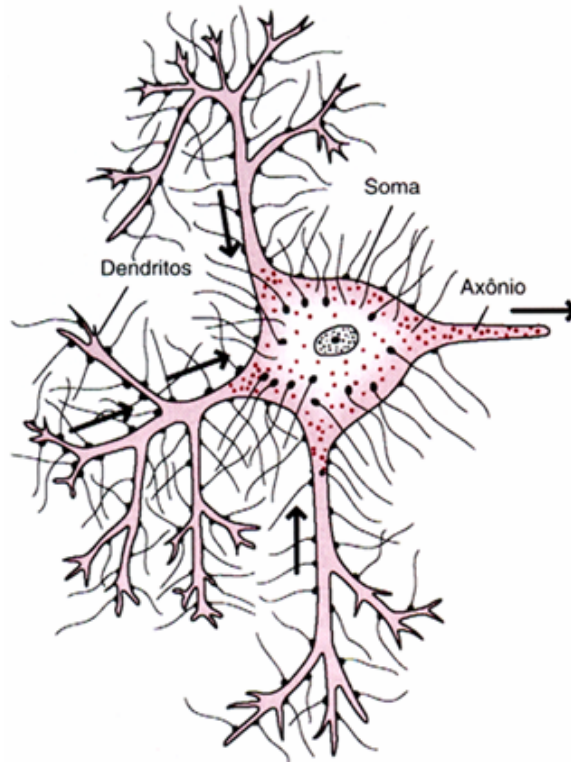


Figura 2.6 – Botões sinápticos em um neurônio receptor. Eles existem tanto no soma como nos dendritos, às vezes ocorrendo também no início do axônio (cone axonal) (adaptada de (GUYTON, 2002))

São as sinapses que possibilitam a transmissão do impulso nervoso de um neurônio ao outro, ou de um neurônio a uma fibra muscular, determinando, inclusive, o sentido que este impulso deve tomar. Tal impulso é a transmissão de um sinal codificado, como resultado de um estímulo ocorrido ao longo da membrana do neurônio. Dois tipos de fenômenos estão envolvidos no processamento do impulso nervoso: elétricos e químicos. Eventos elétricos propagam um sinal dentro do neurônio, e processos químicos transmitem o sinal de um neurônio a outro ou a uma célula muscular. Os processos químicos ocorrem no final do axônio, que libera substâncias químicas ou neurotransmissores, os quais se unem a receptores químicos situados nos canais iônicos da membrana do neurônio seguinte, permitindo assim a troca de informações entre duas células nervosas.

Por exemplo, um neurônio motor colinérgico cujo neurotransmissor principal é a acetilcolina, e que inerva uma célula muscular esquelética, produzirá uma ação sináptica excitatória nesta célula. Já um neurônio motor, também colinérgico, que inerva

uma célula muscular cardíaca, produzirá uma ação sináptica inibitória (LENT, 2001), permitindo que a ação do neurônio pós-sináptico seja restringida ou estimulada.

As sinapses químicas são extremamente importantes porque permitem a condução do impulso nervoso numa única direção: o impulso segue do neurônio pré-sináptico (transmissor) ao neurônio pós-sináptico (receptor). A importância dessa transmissão unidirecional se justifica pela necessidade do sinal ser enviado a determinadas áreas específicas do sistema nervoso, bem como pela necessidade de atuação de controle em determinados grupos musculares, ou em glândulas secretoras.

No terminal pré-sináptico, temos duas estruturas bastante importantes: as *vesículas sinápticas*, que contêm as substâncias neurotransmissoras a serem liberadas na fenda sináptica; e as *mitocôndrias*, que fornecem energia (ATP – trifosfato de adenosina) para a síntese desses mesmos neurotransmissores (Figura 2.7). Estes últimos apresentam ação rápida. Cada vez que um potencial de ação atinge o terminal pré-sináptico, algumas vesículas liberam, ao mesmo tempo, o transmissor para o interior da fenda sináptica, dentro de um intervalo de 1 ms ou menos. A ação desses transmissores sobre os canais iônicos da membrana do neurônio pós-sináptico também ocorre dentro de 1 ms ou menos.

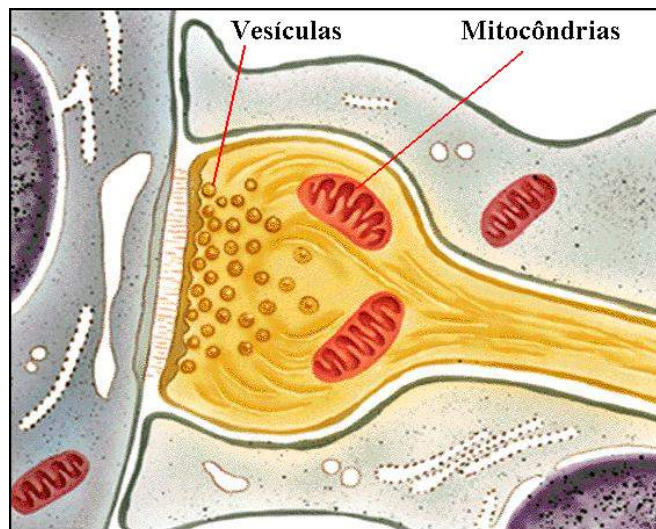


Figura 2.7 – Botão sináptico em detalhe, evidenciando as vesículas e as mitocôndrias. Na fenda sináptica estão os neurotransmissores (adaptada de (FRISÓN, 1999))

2.4 Potencial de membrana dos neurônios

A membrana do neurônio apresenta uma propriedade muito particular que o distingue da maioria das células do organismo. Essa propriedade, a excitabilidade, permite que o neurônio produza e transmita a outros neurônios os sinais elétricos em código, que constituem a linguagem do sistema nervoso (LENT, 2001).

Os biopotenciais encefálicos podem ser diferenciados em dois tipos (BUTTON, 2000): o Potencial de Ação e o Potencial Pós-Sináptico (PPS). O primeiro caracteriza a transmissão dos impulsos eletroquímicos pelos axônios, ocorrendo de forma assíncrona e em direções ortogonais à superfície do escalpo. O segundo é o potencial de membrana resultante no neurônio pós-sináptico, com amplitude muito reduzida (LENT, 2001).

2.4.1 Potencial de ação

Os pesquisadores britânicos Alan Hodgkin (1914-1998) e Andrew Huxley (1917) foram os pioneiros em estudos para desvendar a bioeletrogênese do impulso elétrico do neurônio (LENT, 2001). Na conversão entre a energia bioelétrica, que ocorre na sinapse, os potenciais de ação convergem para o terminal sináptico, e a energia química, representada pela quantidade de neurotransmissor, é liberada na fenda sináptica.

O potencial de ação é uma alteração rápida e brusca da diferença de potencial transmembrana. A membrana do neurônio é polarizada em repouso em torno de -70 mV. O potencial de ação consiste de uma redução rápida da negatividade da membrana até 0 mV e inversão deste potencial até valores de aproximadamente de +30 mV, seguido de um retorno também rápido até valores negativos entre zero e o potencial de repouso, -70mV, conforme a Figura 2.8.

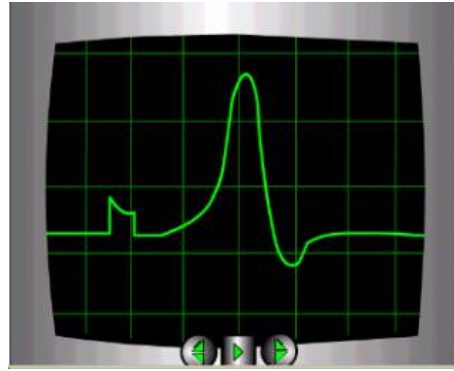


Figura 2.8 - Potencial de ação exibido em um osciloscópio (adaptada de (URL 4))

O potencial de ação é um fenômeno de natureza eletroquímica e ocorre devido a modificações na permeabilidade da membrana do neurônio, que permitem a passagem de íons de um lado para o outro da membrana. Como os íons são partículas carregadas eletricamente, ocorrem também modificações no campo elétrico gerado por essas cargas.

A membrana de alguns tipos de neurônios é polarizada em repouso com valor cerca de -90 mV (GUYTON, 2002). Com a despolarização, há um pico de até cerca de +35 mV. Observa-se um aumento rápido do potencial de membrana; seguido de uma descida também rápida, até um valor inferior ao valor de repouso (cerca de -100 mV), e, por fim, um lento retorno até o valor de repouso de -90 mV (Figura 2.9).

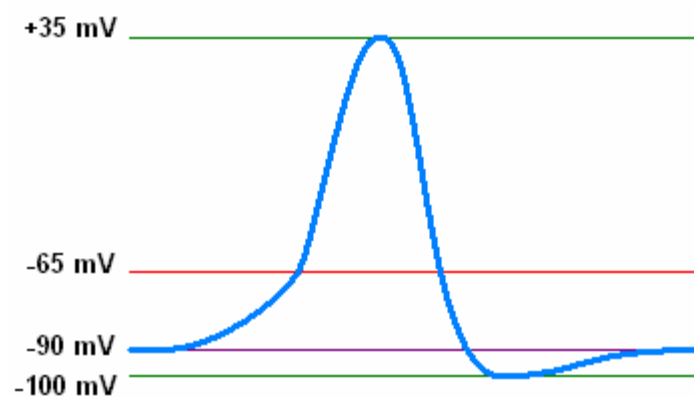


Figura 2.9 – Representação de uma onda de despolarização e repolarização associada ao potencial de ação (adaptada de (GUYTON, 2002))

No entanto, para que seja deflagrado um potencial de ação ao longo do axônio, é necessário que o estímulo sofrido pela membrana do neurônio (no dendrito, no corpo, ou no cone axonal) seja capaz de elevar abruptamente o potencial da membrana de 15 a

30 mV (GUYTON, 2002), ou seja, o potencial deve chegar a cerca de -65 mV (*potencial de limiar*).

Apesar do impulso nervoso ocorrer no sentido do axônio, a onda de despolarização/repolarização da membrana se propaga em todos os sentidos a partir do ponto em que foi deflagrada (Figura 2.10). Todavia esta onda cessa ao atingir a região da membrana próxima ao corpo do neurônio, bem como aos dendritos. Com relação ao axônio, a onda segue até os botões sinápticos e lá desencadeia uma reação química, que caracterizará a comunicação do neurônio com a célula seguinte.

Em virtude do gradiente de concentração e da carga negativa do fluido extracelular, os íons entram na fibra através dos canais iônicos. A entrada de sódio despolariza a membrana, isto é, a face da membrana imersa no fluido extracelular das fibras se torna menos negativo, em relação ao interior. Se esta despolarização, denominada potencial gerador, alcança o nível crítico (limiar), a membrana irá gerar um potencial de ação.

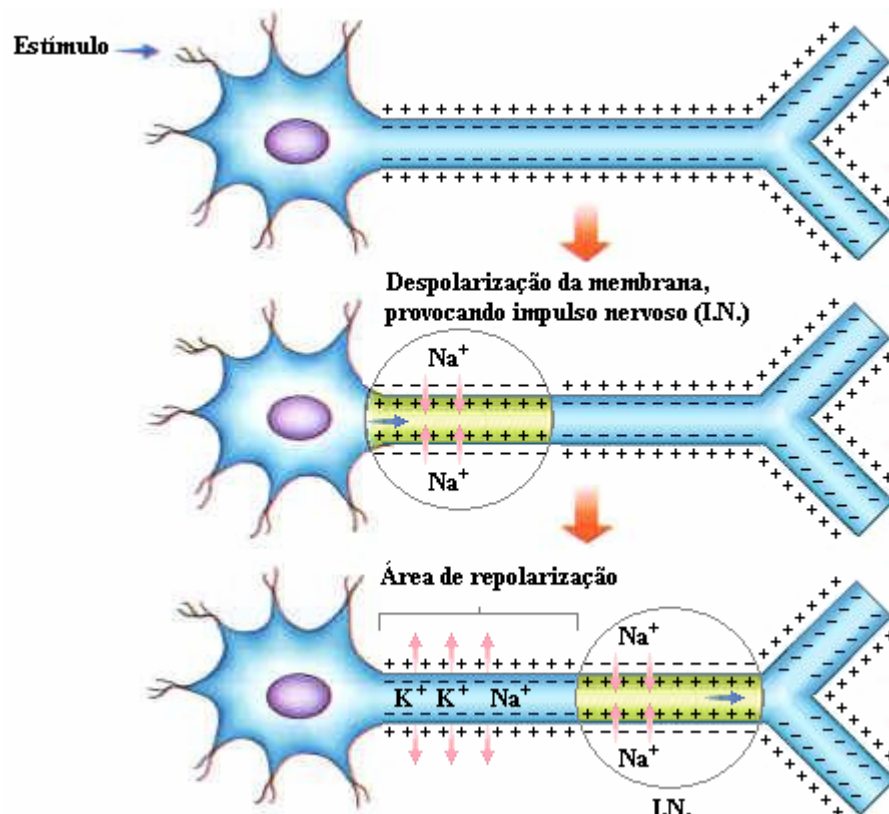


Figura 2.10 – Potencial de ação (adaptada de (VILELA, 2005))

Uma vez atingido o limiar, o potencial de ação ocorre com amplitude e duração fixas. Se o limiar não for atingido, ou seja, a despolarização ou o influxo de sódio não forem suficientemente fortes, não ocorre o potencial de ação (Figura 2.11). Este fenômeno é conhecido como princípio do *tudo-ou-nada* (GUYTON, 2002).

Ocasionalmente, o potencial de ação alcança um ponto na membrana onde não gerará voltagem suficiente para estimular a área adjacente da membrana. Quando isso ocorre, a propagação da despolarização é interrompida. Portanto, para que a propagação de um impulso continue, a proporção entre o potencial de ação e o limiar de excitação deve ser, a qualquer tempo, maior que 1.

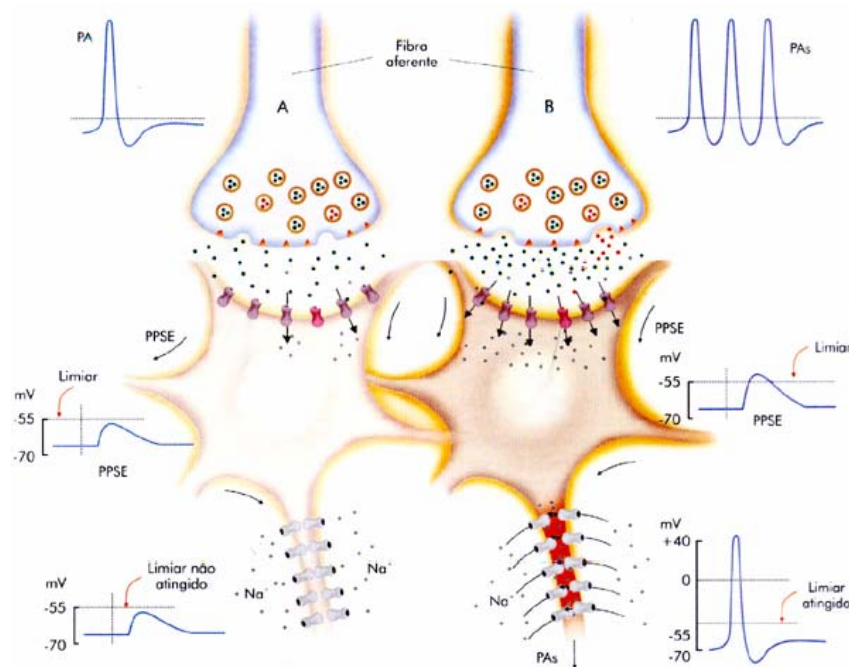


Figura 2.11 – Princípio do “tudo-ou-nada”: em A), o potencial de ação (PA) do neurônio pré-sináptico gera um potencial pós-sináptico excitatório (PPSE) que não chega a atingir o limiar; em B), um trem de PAs gera um PPSE que ultrapassa o valor de limiar, o que faz com que seja deflagrado um PA no neurônio pós-sináptico (adaptada de (LENT, 2001))

À medida que se abrem os canais de sódio, abrem-se também os canais de potássio, entretanto de forma mais lenta. Quando os canais de sódio estão completamente abertos, os de potássio ainda estão se abrindo, ou seja, com o passar do tempo, aumenta a quantidade de potássio que sai da célula, fazendo com que a amplitude do potencial de ação comece a diminuir. Quanto menos positivo o potencial de membrana, menos sódio entra na célula, e com a saída de mais potássio, mais o potencial avança no sentido negativo, retornando ao repouso.

Porém, antes da membrana se repolarizar, o potencial ultrapassa o potencial de repouso, devido ainda à lentidão dos canais de potássio, que estão se fechando novamente. Desta forma, o potencial vai lentamente retornando ao valor de repouso. Isso pode ser observado na Figura 2.9.

2.4.2 Potencial Pós-Sináptico (PPS)

Para uma sinapse excitatória, o resultado do potencial de ação do neurônio pré-sináptico é a geração de um PPS *despolarizante*, ou seja, um potencial que tende a aproximar-se do potencial de limiar. Isso faz com que o neurônio pós-sináptico tenha mais facilidade em disparar potenciais de ação.

Quando sinapses excitatórias descarregam sobre as superfícies dos dendritos ou do soma de um neurônio, gera-se um potencial pós-sináptico que persiste por muitos milissegundos, especialmente quando alguma das substâncias transmissoras sinápticas de longa duração está envolvida. Esse potencial pode continuar a excitar o neurônio, fazendo com que ele transmita uma salva de impulsos de saída (GUYTON, 2002).

Já no caso de uma sinapse inibitória, o resultado do potencial de ação do neurônio pré-sináptico é a geração, no neurônio seguinte, de um PPS *hiperpolarizante*, ou seja, um potencial que tende a afastar-se do potencial de limiar. Isso faz com que o neurônio pós-sináptico tenha mais dificuldade em disparar potenciais de ação (LENT, 2001).

Como o neurônio pós-sináptico recebe inúmeras ações sinápticas, sua atividade depende do somatório de todos os potenciais gerados por todas as sinapses que ocorrem em sua membrana. Este processo de somação é denominado de *integração sináptica*. Por exemplo, o potencial de repouso da membrana do soma neuronal de alguns tipos de neurônios é de cerca de -65 mV (Figura 2.12). Na sinapse excitatória, este potencial sobe para -45 mV (potencial pós-sináptico excitatório – PPSE). Entretanto, a descarga de um só terminal não é capaz de elevar o potencial desta forma, assim, são necessárias várias descargas simultâneas de muitos terminais, por exemplo de 40 a 80 terminais para um neurônio motor comum (GUYTON, 2002). Na sinapse inibitória, o potencial

cai a -70 mV (potencial pós-sináptico inibitório – PPSI), impedindo a ação do neurônio pós-sináptico, ou seja, impedindo que os outros neurônios possam ativá-lo.

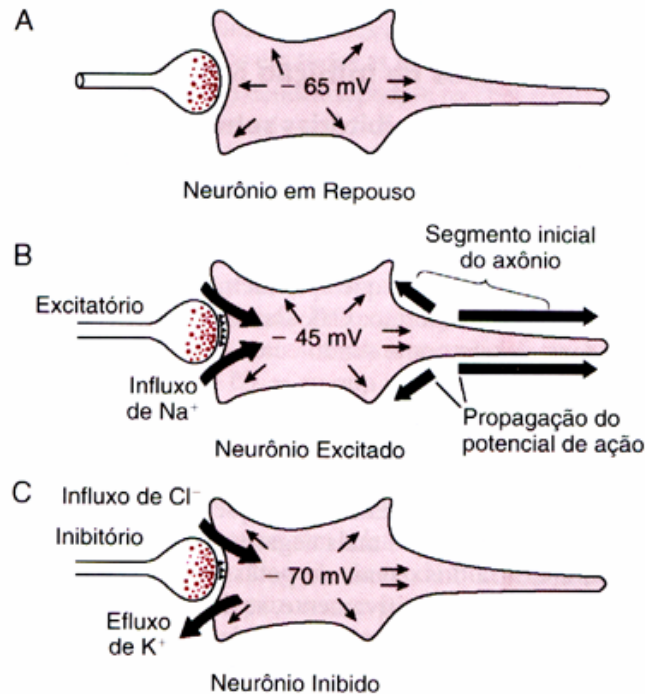


Figura 2.12 – Eventos eletroquímicos da sinapse excitatória e sinapse inibitória (adaptada de (GUYTON, 2002))

2.5 Medidas Neurofisiológicas: Matrizes Multieletrodo (MEA)

2.5.1 Culturas celulares

Em condições apropriadas, a maior parte das células vegetais e animais poderão viver, multiplicar-se e até mesmo expressar propriedades diferenciadas em uma placa de cultura de tecidos. As células podem ser observadas sob o microscópio e várias análises analisadas bioquimicamente, e os seus aspectos morfológicos, imunológicos e farmacêuticos podem ser explorados. Experimentos com células oriundas de cultura são, às vezes, ditos como tendo sido conduzidos *in vitro* para contrastá-los daqueles experimentos com organismos intactos, os quais são referidos como conduzidos *in vivo*. Os termos podem ser confusos porque são freqüentemente utilizados com sentidos diferentes por bioquímicos, para quem *in vitro* é aplicado em referência a reações

bioquímicas ocorrendo em cultura; enquanto *in vivo* é aplicado para qualquer reação que ocorra dentro de célula no seu ambiente natural.

A técnica de cultura celular foi inaugurada por Ross Granville Harrison, no início do século XX (BEADLE, 1988). Ele realizou experimentos com sapos e posteriormente com pintinhos, mostrando que fibras nervosas desenvolvem-se a partir de corpos celulares individuais, ao contrário do que até então se acreditava. Entretanto, há apenas trinta anos atrás, os métodos de cultura de células começaram a ganhar proeminência na neurobiologia, motivados por duas descobertas. A primeira, os neuroblastos, são células embrionárias do tecido nervoso que originam outras células nervosas, obtidos de um tumor, que podiam ser investigados e controlados quando mantidos em cultura, de forma a induzir a diferenciação neural (SCHUBERT, 1969). A segunda, as culturas monitoradas *in vitro*, pela elongação axonal (BRAY, 1970).

Existem basicamente três métodos para cultura de células: o uso de células *dissociadas*, *cultura organotípica* e de *reagregação* (BANKER, 1991). A cultura de células dissociadas ou dispersas apresenta como vantagem a manutenção das propriedades morfo e fisiológicas presentes no tecido de origem. A cultura organotípica se refere à transplantação de tecido; sua vantagem principal é a preservação da arquitetura do tecido. Por outro lado, esta técnica é aplicável apenas se o tecido é ou pode ser manipulado na forma laminar. As células reagregadas são dissociadas e mantidas em suspensão; elas tendem a se reagregar em pequenas esferas se mantidas em frascos e centrifugadas. Este tipo de cultura é adequado para o estudo do amadurecimento neural (STIER, 1993). A técnica mais adequada para avaliação de crescimento axonal e formação de sinapses entre neurônios é a dissociação. Nesta técnica, as culturas podem ser primárias, sendo utilizadas nos experimentos diretamente logo após extração, sem qualquer alteração; e de linhagens celulares, em que o processo de mitose é induzido. Neste último caso, as células se multiplicam originam várias gerações, criando uma população com características genéticas homogêneas e bem conhecidas.

2.5.2 Interface bioeletrônica

Uma interface bioeletrônica corresponde a um sistema onde um pedaço de tecido nervoso, geralmente mantido vivo em cultura celular, é conectado a um circuito elétrico, na tentativa de se estabelecer um intercâmbio bidirecional de informação.

A Figura 2.13 ilustra o funcionamento dessa interface, ou seja, a integração do sistema neural à eletrônica digital (BONIFAZI, 2002). No primeiro passo (a), é ilustrada a interface individual das células nervosas. No próximo passo, o par de células nervosas é acoplado. No arranjo (b), a estimulação do neurônio A induz a transferência do potencial de ação pela rede neural para o neurônio B, cujo sinal é gravado através do transistor. No arranjo (c), o registro do sinal do neurônio A ocorre pelo transistor, sendo transferido posteriormente para o chip de microeletrônica, até atingir o neurônio B, que é então estimulado. No último passo (d), as redes neurais são definidas e a criação do chip para a comunicação é estabelecida, fornecendo uma rede dinâmica e computacional para as comunicações bidirecionais entre os sinais. Portanto, a conexão neurônio – circuito – neurônio é o passo elementar da interface bioeletrônica.

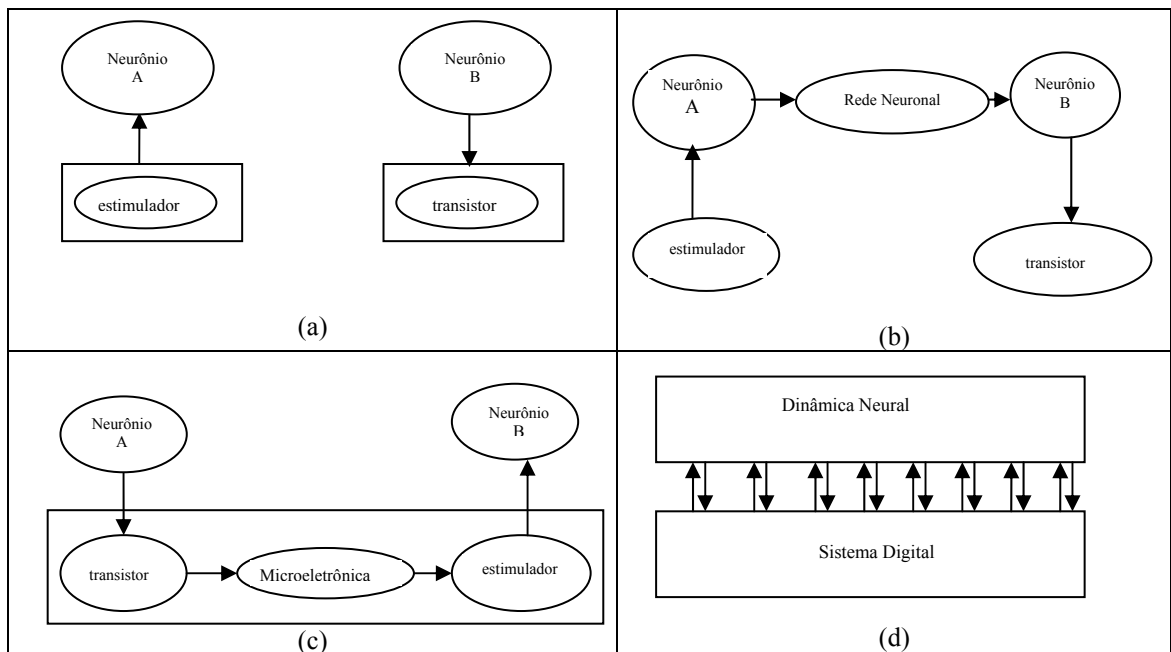


Figura 2.13 – Interface bioeletrônica (adaptada de (FROMHERZ, 2003))

Dentro do que foi acima exposto e, considerando dois circuitos híbridos com neurônios baseados em chip de silicone (arranjo (c) da Figura 2.13), a Figura 2.14 ilustra a dinâmica de cada neurônio A e B. No item (a) desta última figura, apresenta-se

o potencial de ação do neurônio A, correspondente à atividade elétrica basal ou espontânea, a qual é captada e amplificada por um circuito, gerando a onda (c). Em seguida, os picos da última onda, correspondentes à ocorrência de um potencial de ação no neurônio A, são detectados através de algoritmos de processamento, resultando na onda (e). Após um ajuste de amplitude e de frequência, de forma a garantir uma coerência biológica, o sinal (e) é transformada em (f) através de circuitos lógicos, os quais, finalmente, geram uma onda de estimulação (d). Esta última é aplicada ao neurônio B através de outra interface bioeletrônica, induzindo potenciais de ação em B, como mostrado em (b).

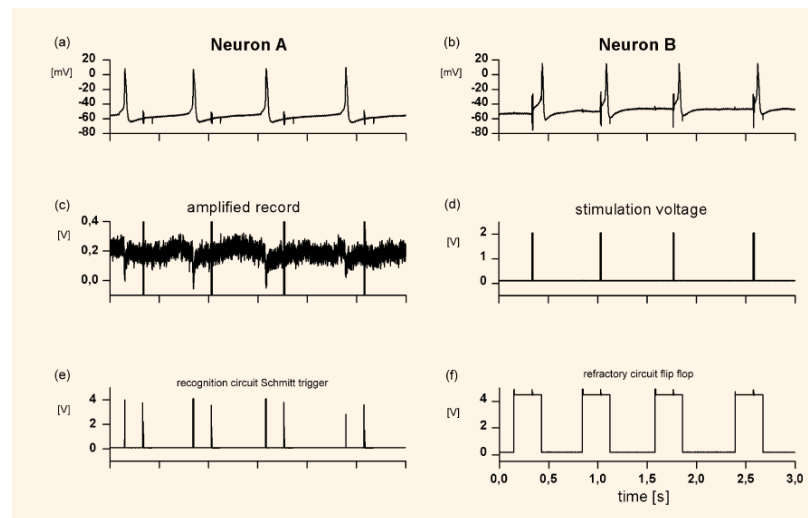


Figura 2.14 – Caminho neurônio- chip - neurônio (adaptada de (FROMHERZ, 2003)).
Vide arranjo (c) da Figura 2.13

2.5.3 Matrizes Multieletrodo (MEA)

A atividade elétrica em sistemas biológicos é tradicionalmente monitorada com eletrodos, como por exemplo, na técnica de “*patch-clamp*”(GUEDES, 1989).

Matrizes Multieletrodo correspondem a um refinamento do conceito de interface bioeletrônica ((FROMHERZ, 2003), (BONIFAZI, 2002)), e consistem em circuitos de dimensões micrométricas montados sobre um substrato, e dotados de um conjunto de eletrodos, os quais são colocados no soma do neurônio (Figura 2.15). A condição ideal para o uso destas estruturas exige que o corpo celular se localize sobre um eletrodo, ou entre dois eletrodos vizinhos. Para que isto ocorra, é necessário o posicionamento da célula no local do eletrodo, bem como o tratamento adequado do substrato, de forma a

promover a aderência celular, ou seja, o substrato é uma das variáveis a serem consideradas no processo de fabricação.

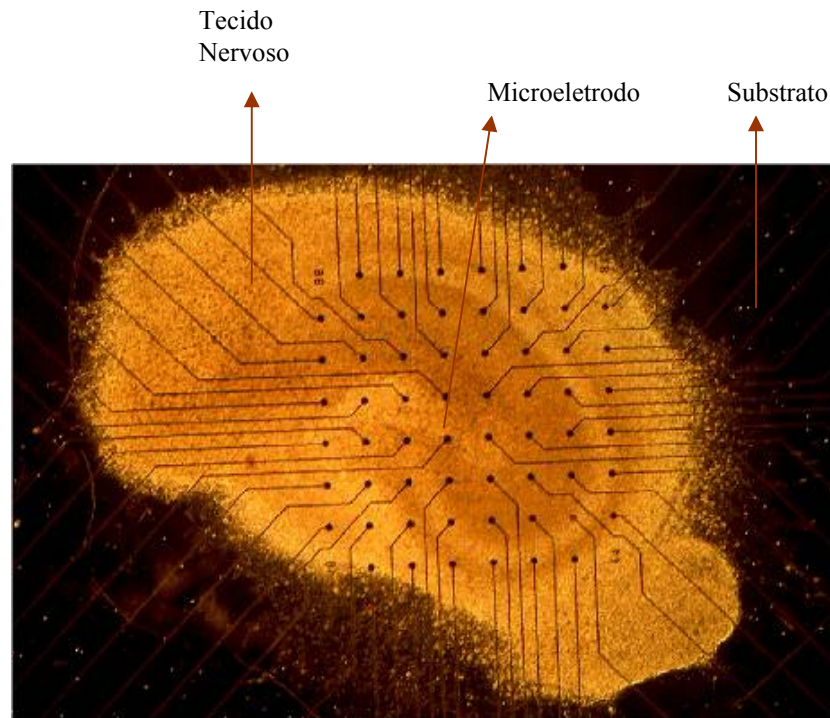


Figura 2.15 - Conjunto de eletrodos em um tecido nervoso (adaptada de (RENNAKER, 2005))

As MEAs são utilizados para acessar de forma sistemática e seletiva os potenciais de ação associados a feixes ou fibras nervosas, sendo que vários testes em modelos animais já são realizados em diversos centros de pesquisa (URL 5). Elas permitem registrar simultaneamente a atividade elétrica de cerca de centenas de neurônios. Os eletrodos da MEA podem também ser usados para estimular neurônios, de forma não-invasiva, seguindo uma conexão entre a rede neuronal de cultura e um computador.

A Figura 2.16 ilustra a aplicação de MEAs em outros métodos de cultura. Na primeira (a), um extrato da massa branca do cerebelo é posicionado sobre um substrato contendo microeletrodos, para extração dos sinais. Já na segunda (b), os eletrodos (representados por hastes negras) são posicionados sobre os axônios de embriões de ratos, após 14 dias em cultura, evidenciando o número de células acessíveis que foram atingidas.