

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



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

Rodrigo Ribeiro Cardoso

Agosto de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

Rodrigo Ribeiro Cardoso[‡]

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

Prof. João Batista Destro Filho, Dr.

Orientador

Prof. Alexandre Cardoso, Dr.

Coordenador do curso de Pós-Graduação

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

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

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

Orientador: João Batista Destro Filho.

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

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

CDU: 62:61

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

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

Rodrigo Ribeiro Cardoso[§]

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

Banca Examinadora:

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

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

Prof. José Hiroki Saito, Dr. (UFSCar)

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

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

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

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

Albert Einstein

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

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

Abstract

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

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

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

Conteúdo

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

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

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

Lista de Figuras

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

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

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

Lista de Tabelas

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

Lista de Acrônimos

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

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

Capítulo 1

Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1 Motivação

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

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

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

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

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

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

1.2 Objetivo

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

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

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

1.3 Estrutura da dissertação

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

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

Capítulo 2

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

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

2.1 Introdução

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

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

2.2 Fisiologia da Sinapse de um Neurônio

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

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

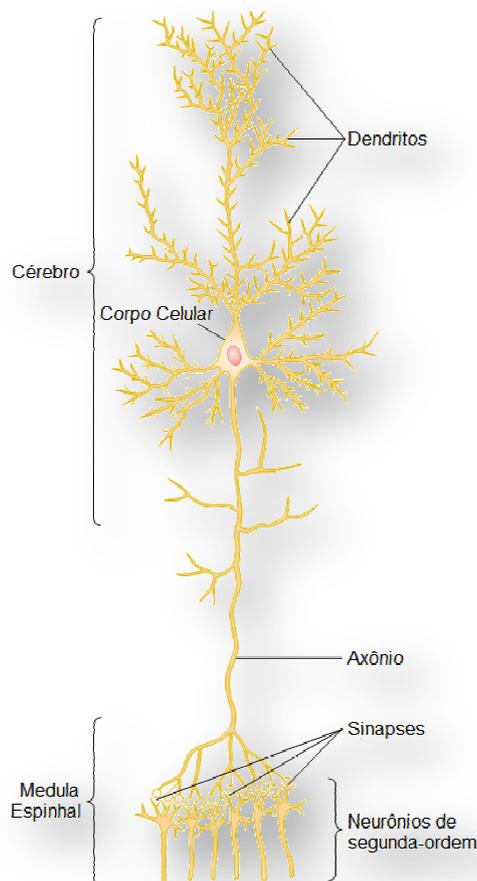


Figura 2.1 – Neurônio: partes funcionais importantes (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).

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

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

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

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

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

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

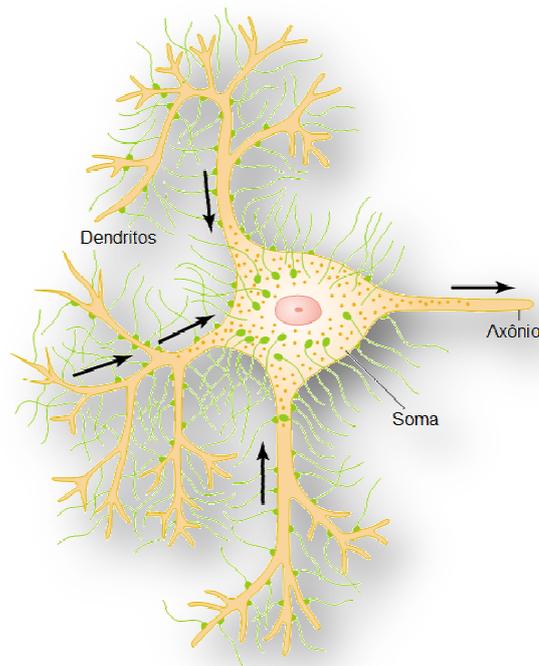


Figura 2.2 – Neurônio motor típico do SNC (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).

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

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

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

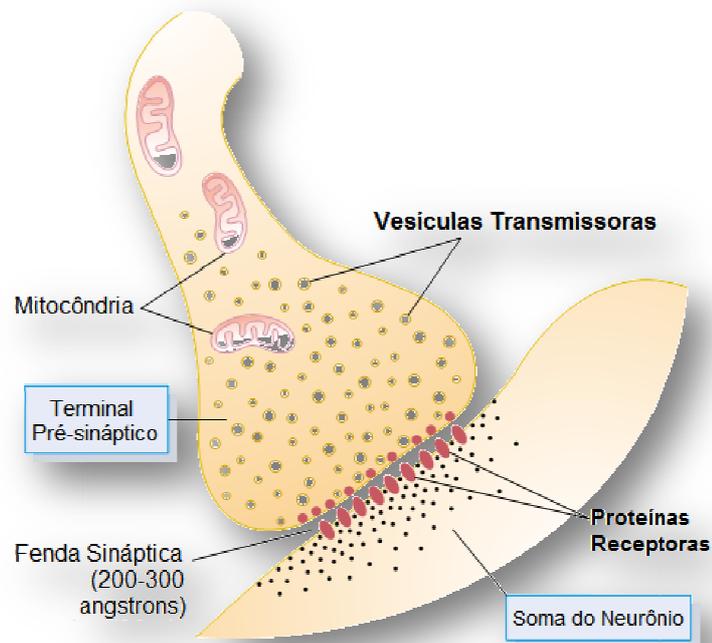


Figura 2.3 – Anatomia fisiológica de uma sinapse (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).

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

2.3 Eletroencefalografia (EEG)

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

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

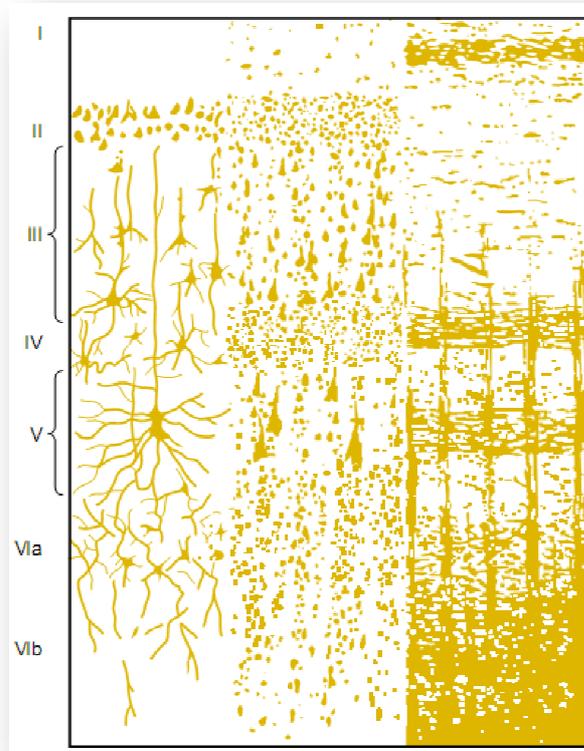


Figura 2.4 – Estrutura do córtex cerebral (Modificado de (Guyton & Hall, 2006)).

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

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

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

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

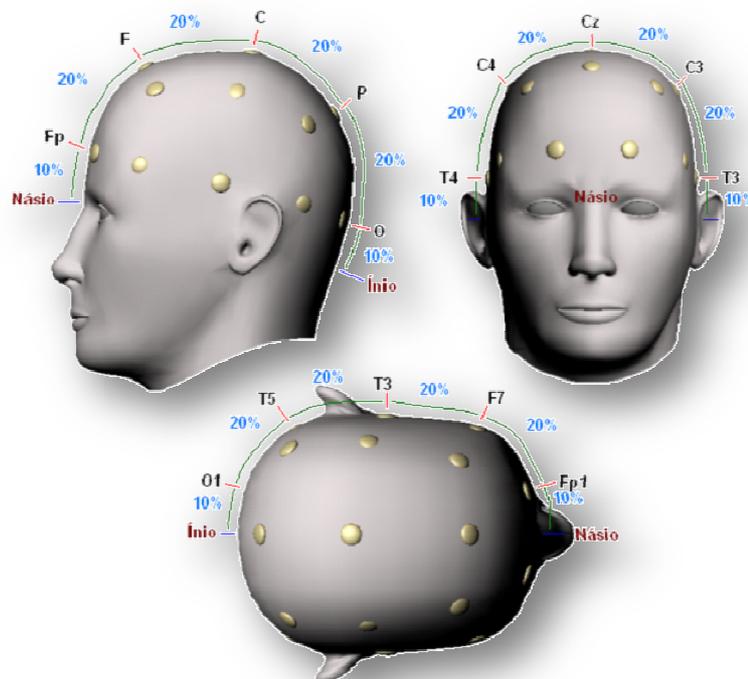


Figura 2.5 – Sistema Internacional 10/20 (Modificado (Cardoso, 2005)).

Capítulo 3

Matriz Multieletrodo (MEA) e seu Sinal

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

3.1 Introdução

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

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

Na Figura 3.1 são apresentadas fotografias de uma MEA.



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

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

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

3.2 Histórico da MEA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3 MEA: Visão Geral

3.3.1 Gravação Extracelular com a MEA

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

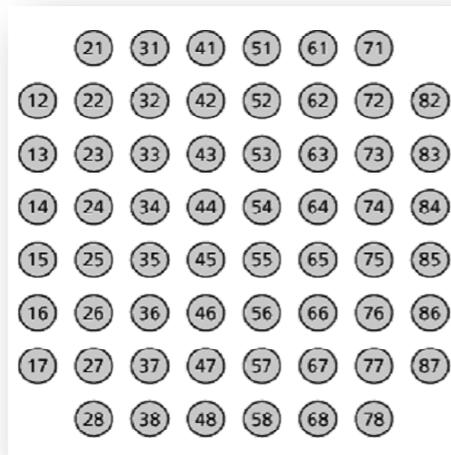


Figura 3.2 – Modelo padrão de posicionamento dos eletrodos (Modificado de (Systems, 2005)).

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

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

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

3.3.2 Projeto e Produção da MEA

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

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

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

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

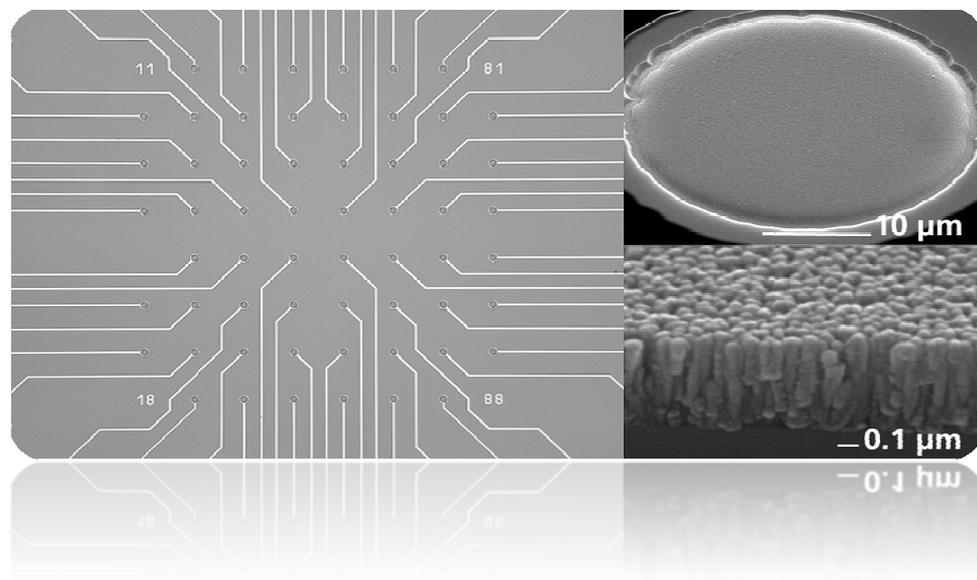


Figura 3.3 – Posicionamento e dimensão dos eletrodos de uma MEA padrão (Modificado de (Systems, 2005)).

3.3.3 Eletrodos, Trilhas e Isolamento

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

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

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

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

3.4 Tipos de MEAs e *Layouts*

Os tipos de MEAs se diferem por:

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

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

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

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).

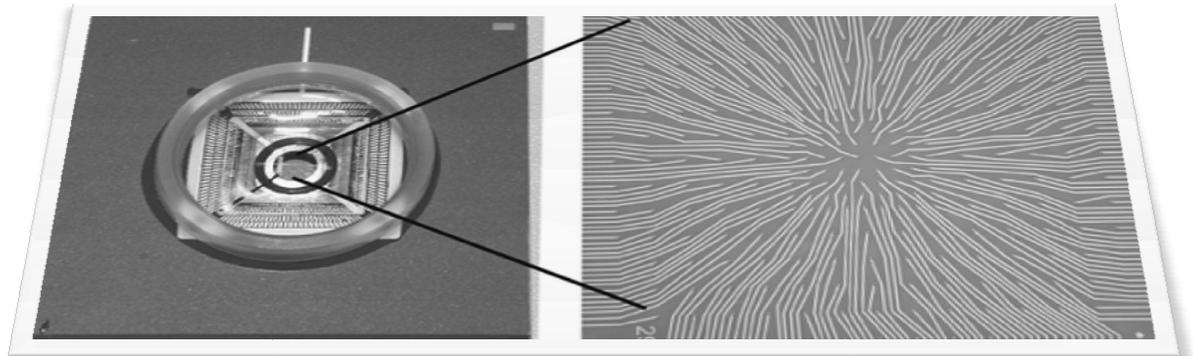


Figura 3.4 – *High-Density MEA* (Modificado de (Taketani & Baudry, 2006)).

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 *Johnson 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 *Patch-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:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m_\infty(V_m) - m}{\tau_m(V_m)} \quad (3.2)$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_\infty(V_m) - h}{\tau_h(V_m)}$$

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).

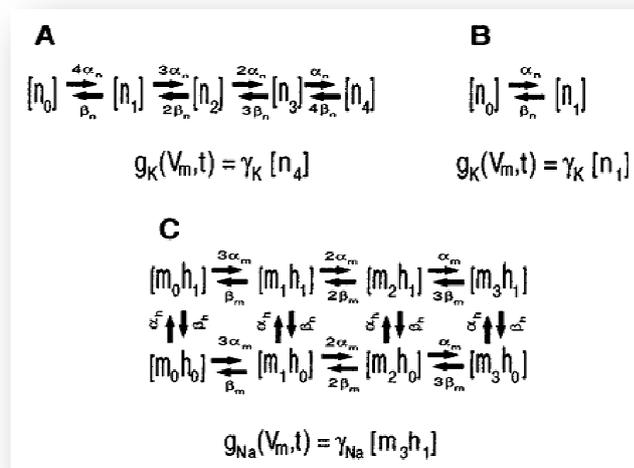


Figura 3.5 – Esquema de Cadeia de Markov para canais iônicos voltagem-dependentes. (Modificado de (Steinmetz, Manwani, Koch, London, & Segev, 2000)).

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.

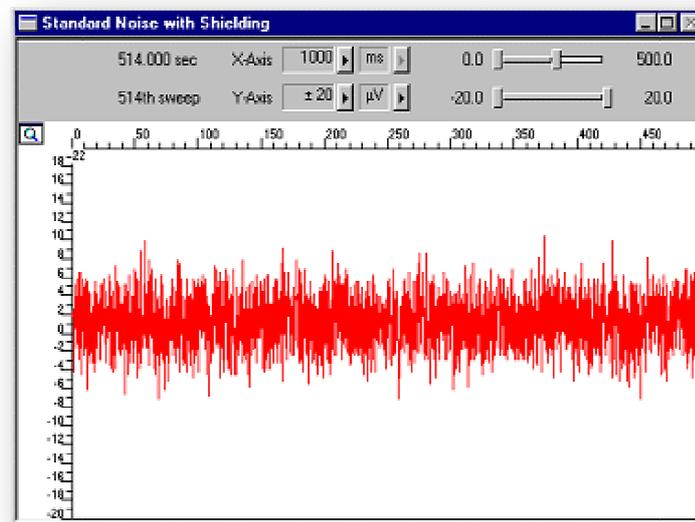


Figura 3.6 – Nível padrão de ruído de uma MEA (Modificado de (Systems, 2005)).

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.

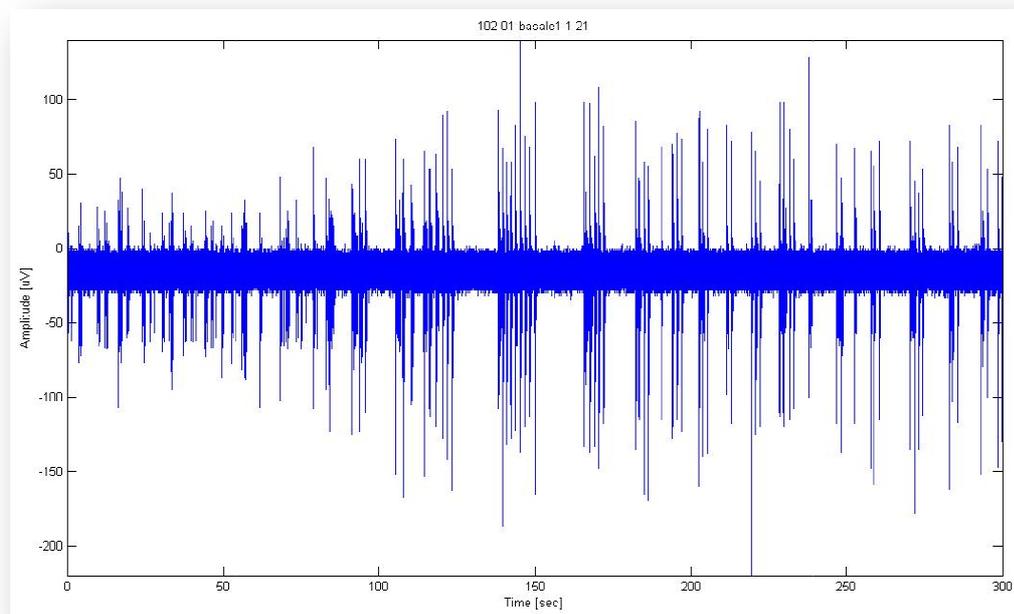


Figura 3.7 – Registro de um canal de uma MEA. Ruído biológico e spikes (picos).

Um conjunto de *spikes*, então, é uma sequência de impulsos nervosos ou potencias 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.

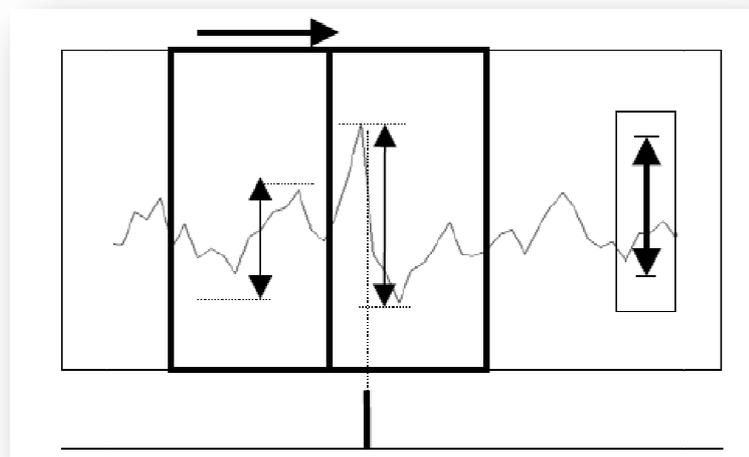


Figura 3.8 – Identificação de um Spike (Modificado de (Chiappalone, 2003)).

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.

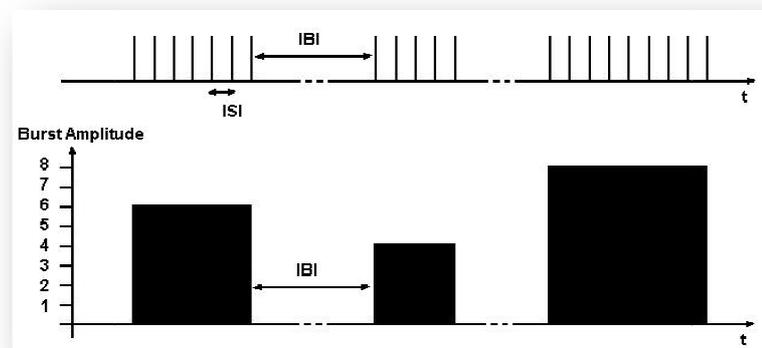


Figura 3.9 – Intensidade e Intervalo entre Bursts (Modificado de (Chiappalone, 2003)).

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).

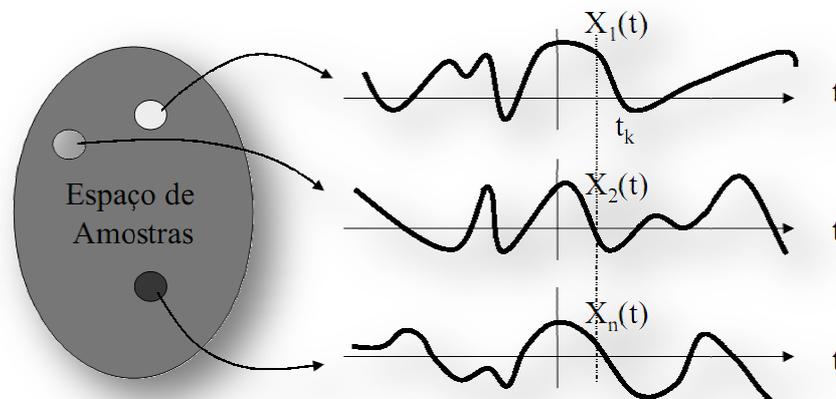


Figura 4.1 – Espaço amostral de um processo estocástico (Modificado de (Roger, 2009)).

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.

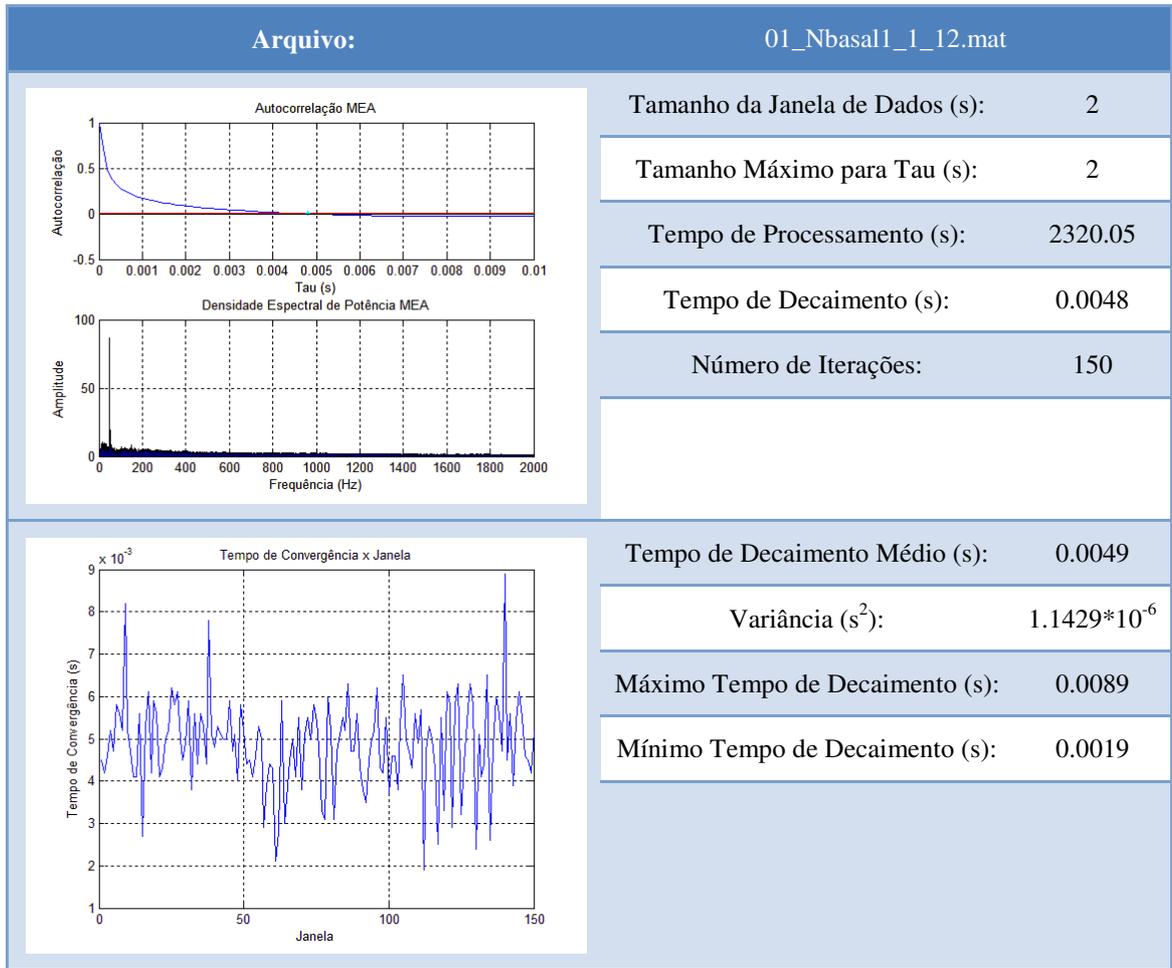
Os tamanhos de janelas utilizados foram:

- 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 conseqüentemente 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.



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

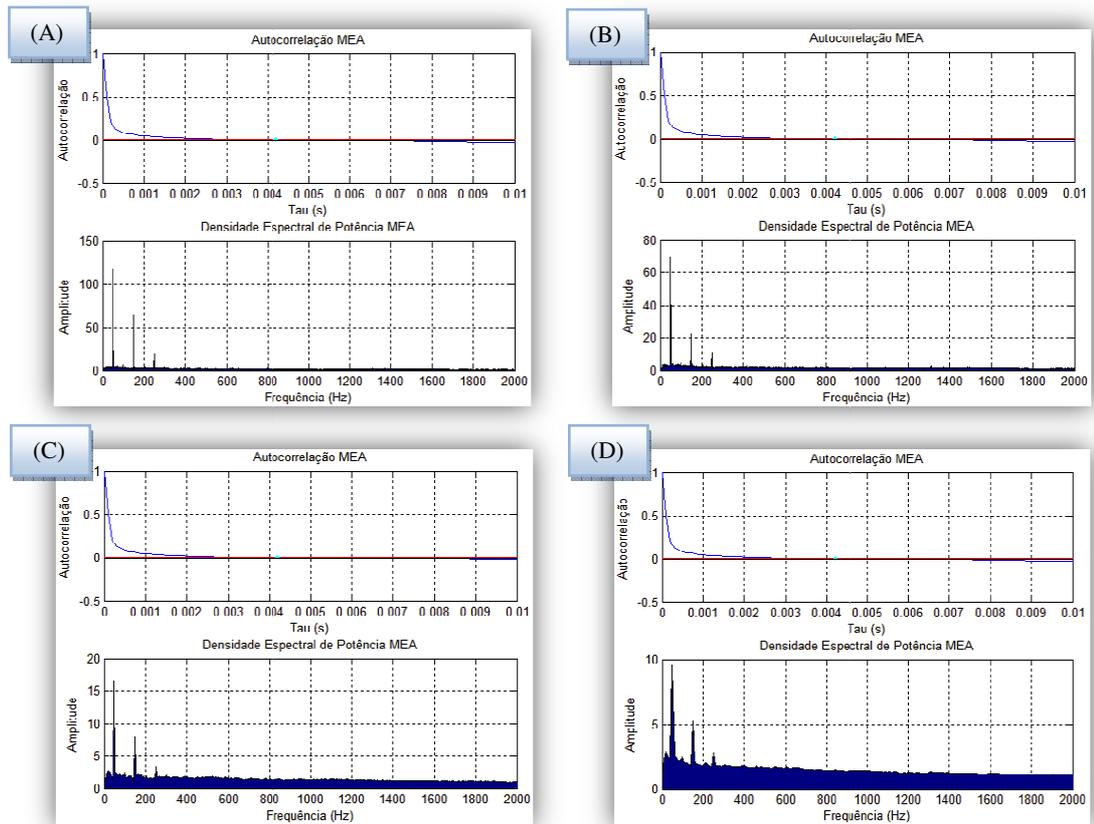


Figura 4.2 – Autocorrelação para o Sinal 01_NoNeurons_01_12: janelas de (A) 2 s, (B) 1 s, (C) 0,2 s e (D) 0,1 s.

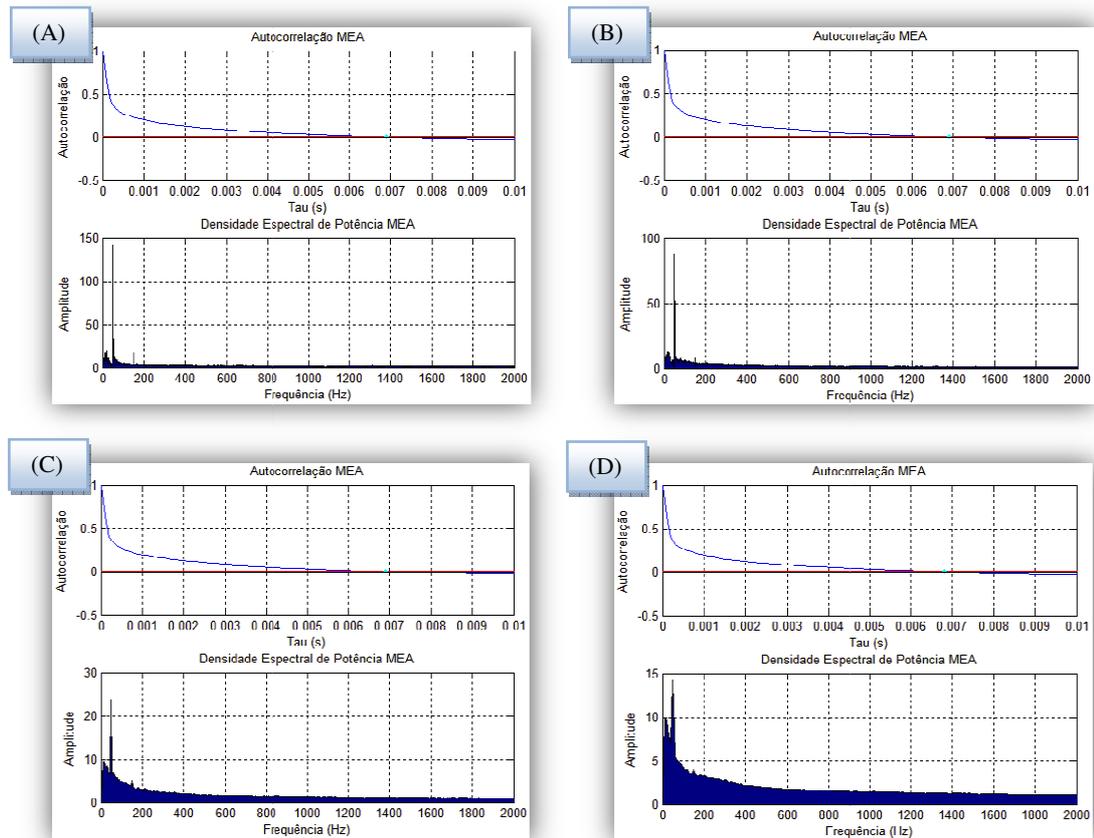


Figura 4.3 – Autocorrelação para o Sinal *Exp2_01_DIV41_nbasal1_1_12*: janelas de (A) 2 s, (B) 1 s, (C) 0,2 s e (D) 0,1 s.

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.

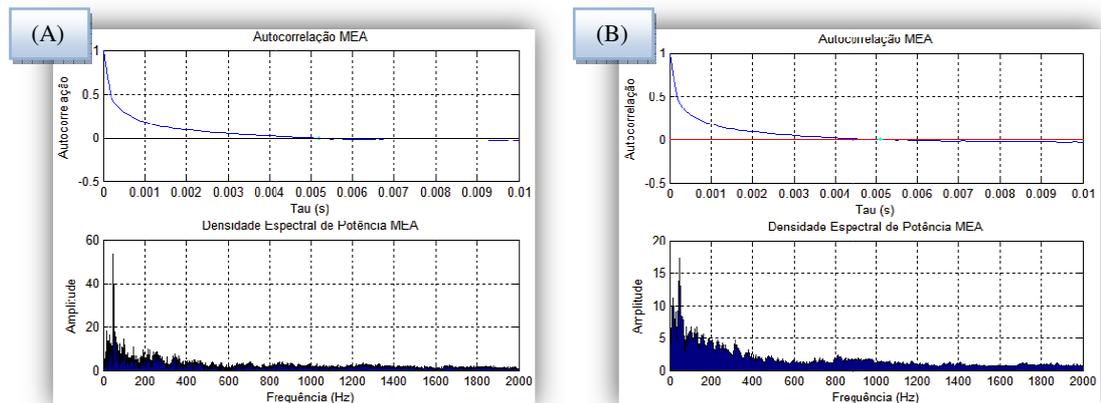


Figura 4.4 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Ruído Biológico: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

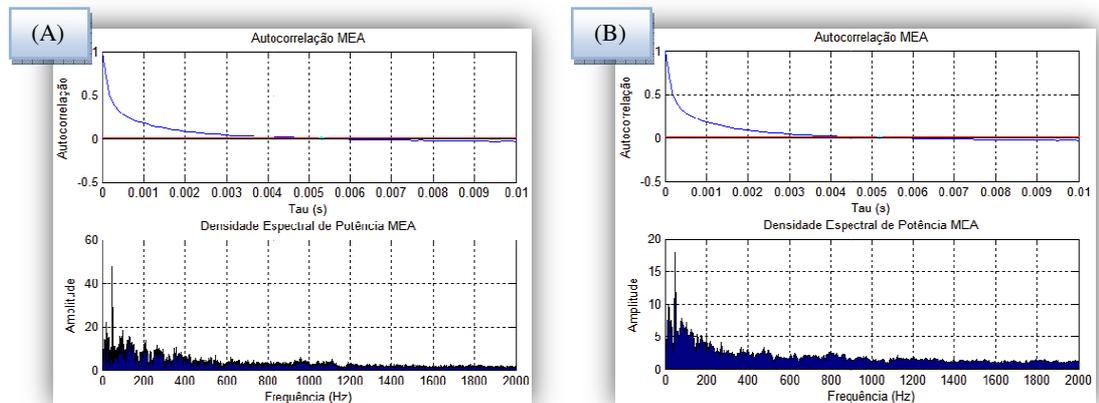


Figura 4.5 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Bursts: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

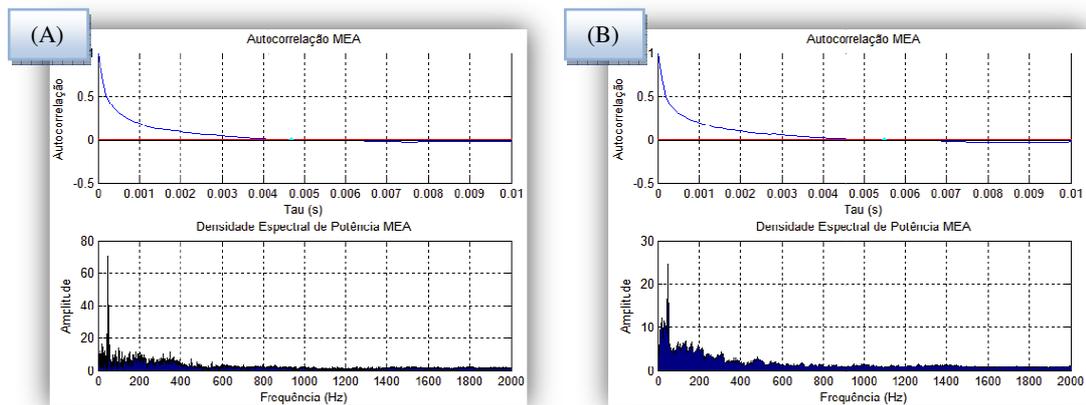


Figura 4.6 – Autocorrelação para o Trecho do Sinal com Spikes: janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

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.

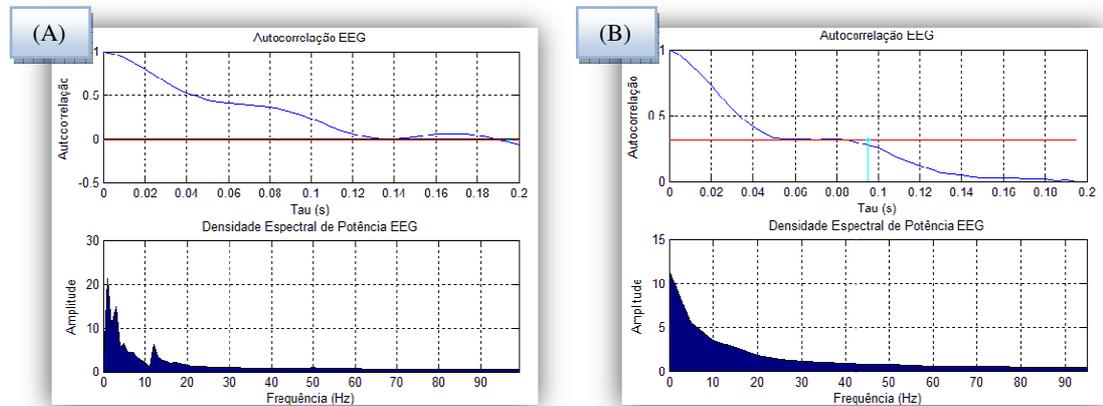


Figura 4.7 – Sinal EEG Com Evidência de Crise Epiléptica (Eletrodos F7-C3): janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

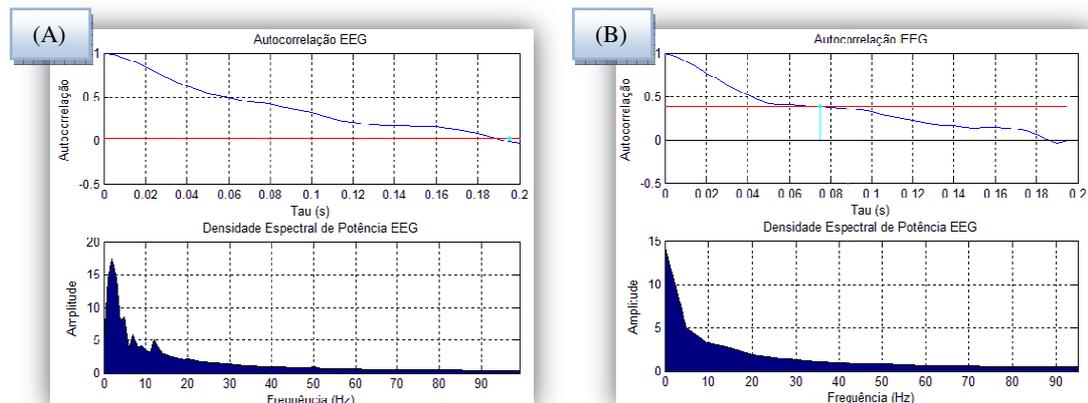


Figura 4.8 – Sinal EEG Com Atividade Normal (Eletrodos F7-C3): janelas de (A) 1 s, (B) 0,2 s.

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	<i>135 ms</i>	<i>130 ms</i>	<i>205 ms</i>	<i>170 ms</i>
Janela de 1,0 s	<i>195 ms</i>	<i>190 ms</i>	<i>125 ms</i>	<i>150 ms</i>
Janela de 0,5 s	<i>115 ms</i>	<i>130 ms</i>	<i>215 ms</i>	<i>130 ms</i>
Janela de 0,2 s	<i>95 ms</i>	<i>90 ms</i>	<i>55 ms</i>	<i>65 ms</i>

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	<i>195 ms</i>	<i>220 ms</i>	<i>220 ms</i>	<i>470 ms</i>
Janela de 1,0 s	<i>195 ms</i>	<i>205 ms</i>	<i>210 ms</i>	<i>155 ms</i>
Janela de 0,5 s	<i>195 ms</i>	<i>195 ms</i>	<i>190 ms</i>	<i>85 ms</i>
Janela de 0,2 s	<i>75 ms</i>	<i>50 ms</i>	<i>60 ms</i>	<i>55 ms</i>

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.

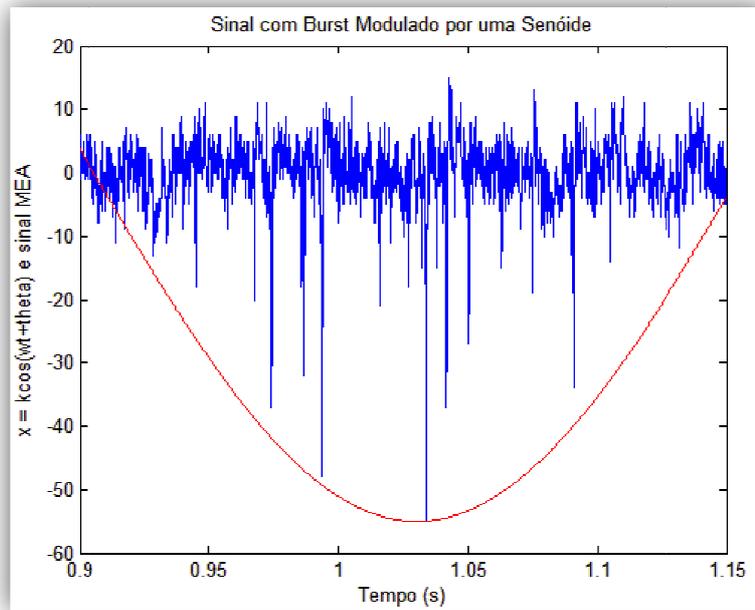


Figura 4.9 – Sinal da MEA: trecho com sequência de spikes que formam um burst modulado por uma senoide de 2 Hz.

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, Bodenstern, & 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 .

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

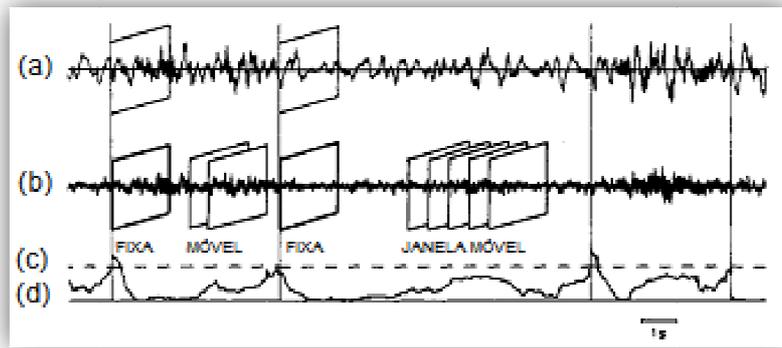


Figura 5.1 – Processo de segmentação. (a) Sinal EEG bruto. A barra indica a seção onde o filtro de predição linear é adaptado. (b) Resultado do erro de predição. A função de autocorrelação do erro de predição inicial é computada a partir da janela fixa; a função de autocorrelação corrente corresponde 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.

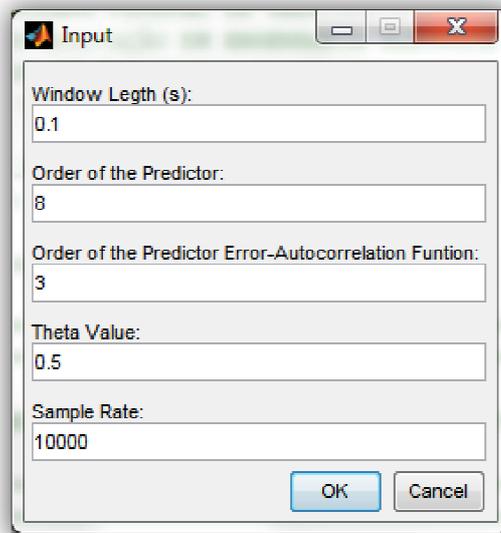


Figura 5.2 – Janela de entrada de dados do programa de segmentação do sinal da MEA.

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.

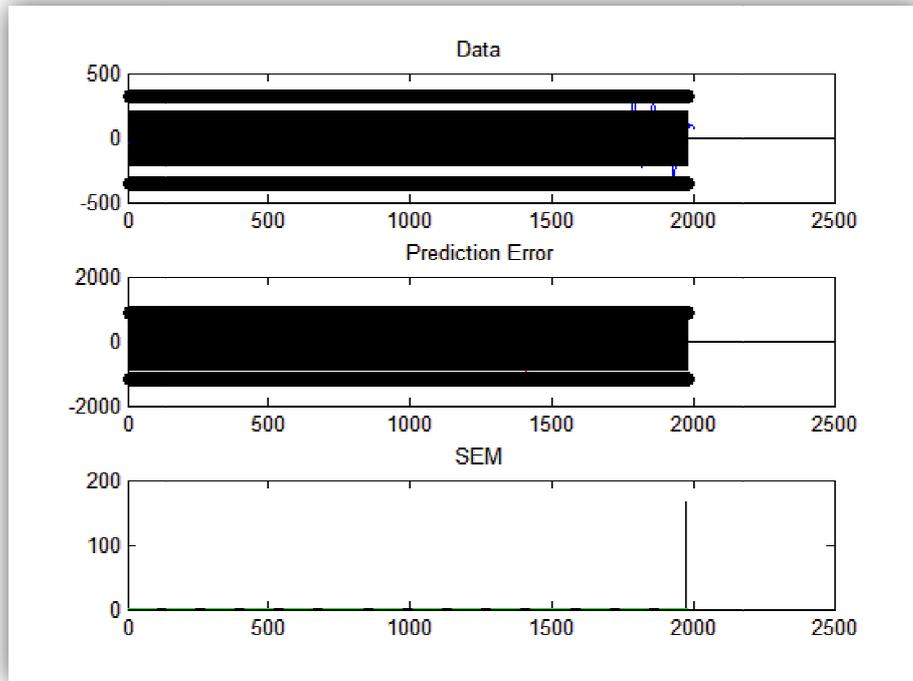


Figura 5.3 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epilética. Eletrodos T5-C1, com duração de 10 s (Teste 1).

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.

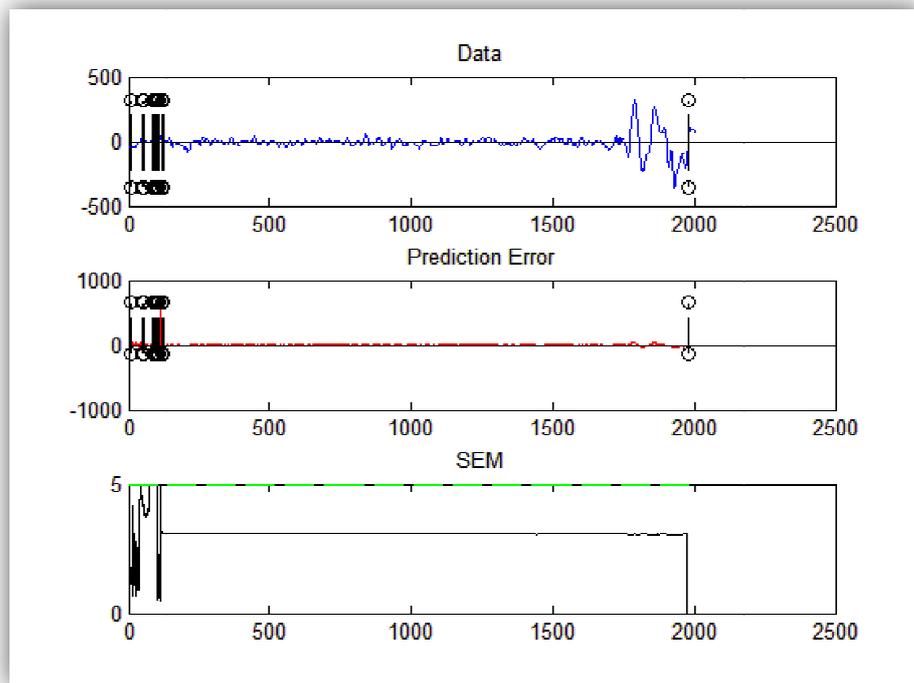


Figura 5.4 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epiléptica. Eletrodos T5-C1, com duração de 10 s (Teste 2).

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 epiléptica.

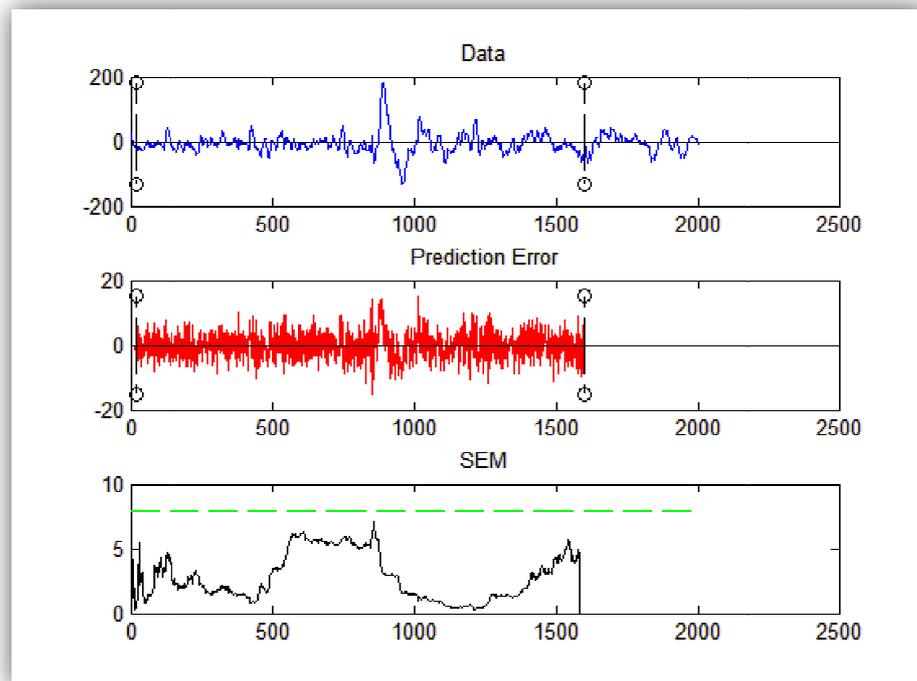


Figura 5.5 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epiléptica. Eletrodos T6-C2, com duração de 10 s. O ajuste de parâmetros não conseguiu identificar a presença de uma alteração (nesse caso uma espícula) entre as amostras 850 e 1000, aproximadamente.

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.

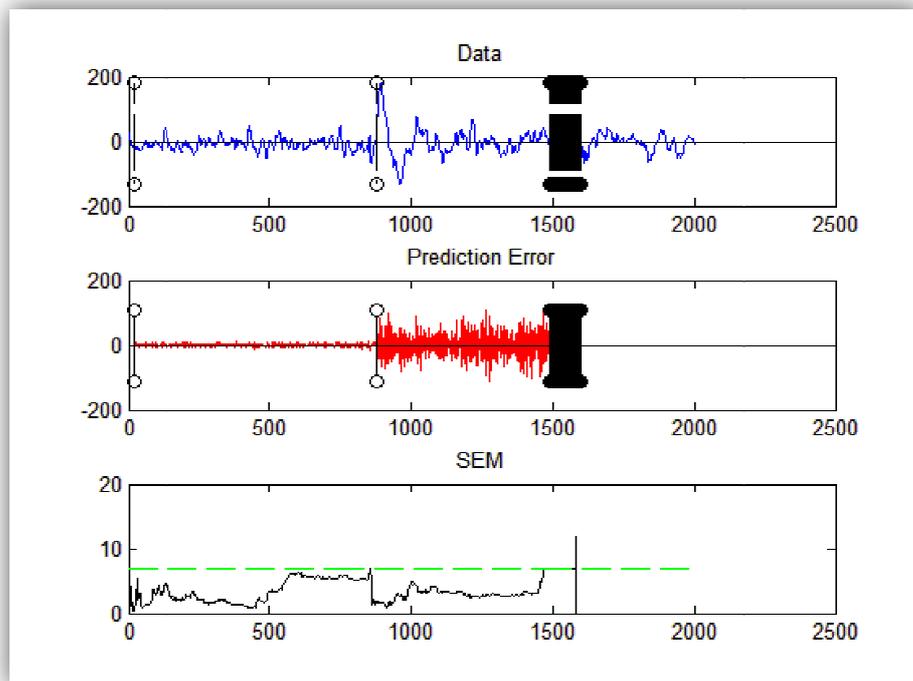


Figura 5.6 – Segmentação de sinal EEG com evidência de crise epiléptica. Eletrodos T6-C2, com duração de 10 s. Uma pequena alteração no valor de Θ é suficiente para identificar a espícula e segmentar o sinal de forma mais eficiente.

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.

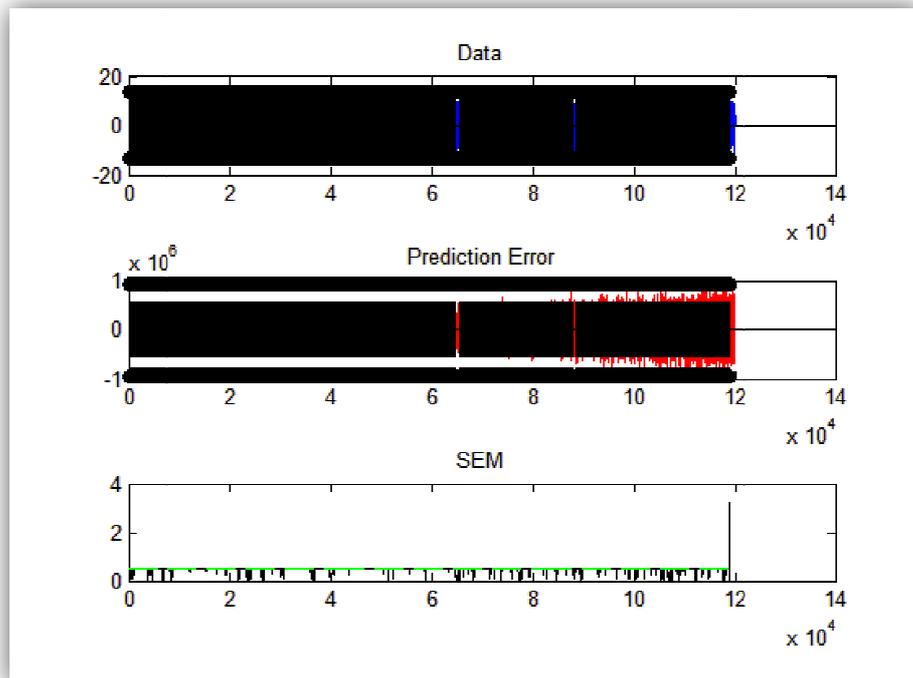


Figura 5.7 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com ruído biológico. Imprecisão no ajuste dos parâmetros não permite segmentar de forma correta o sinal.

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.

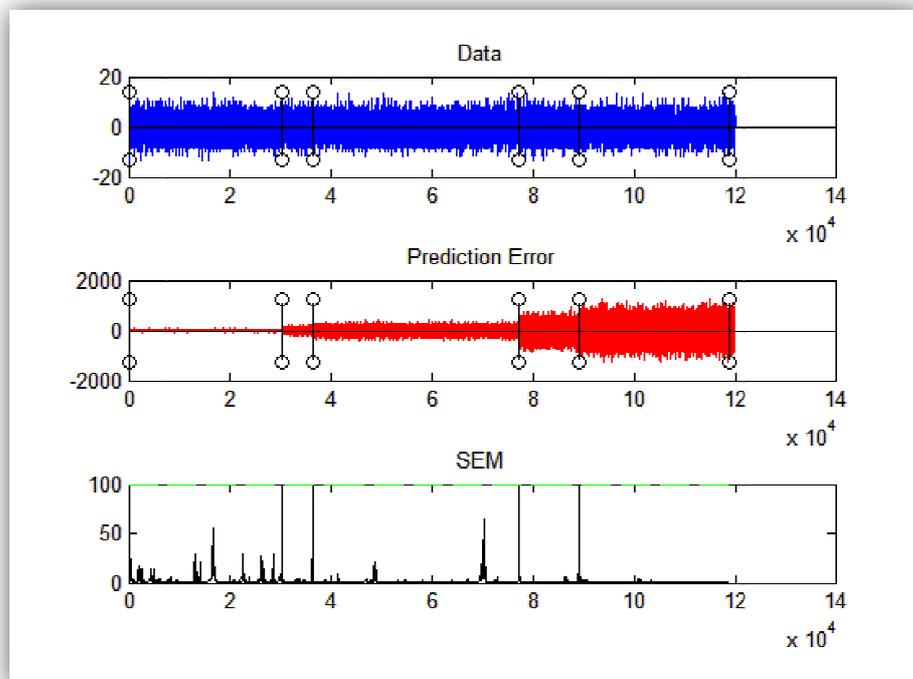


Figura 5.8 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com ruído biológico. Apesar de não ser possível identificar as mudanças no sinal, o programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos.

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.

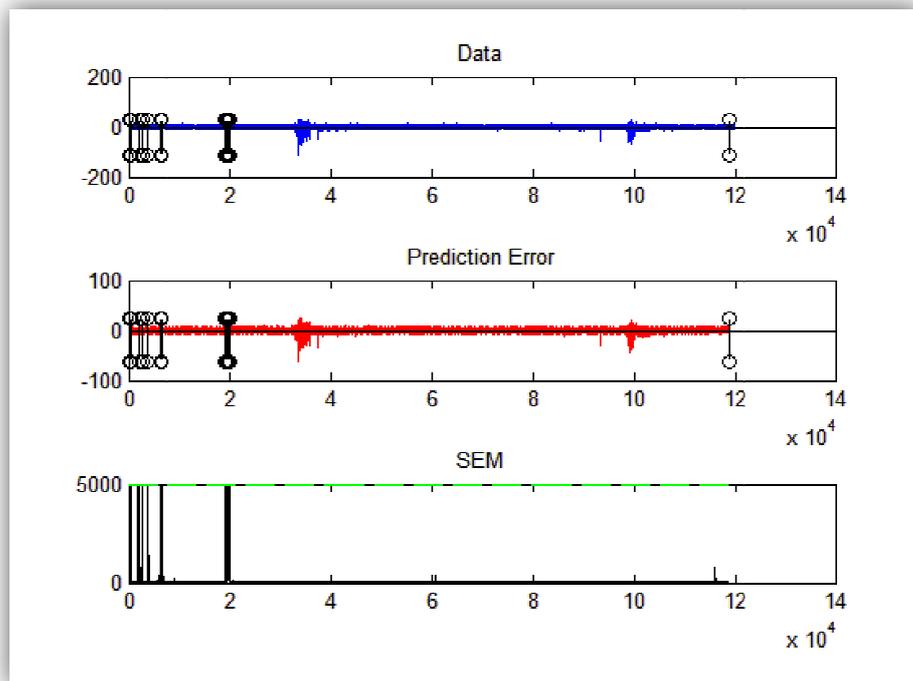


Figura 5.9 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com spikes isolados. O programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos, entretanto, não é possível perceber alterações que justifiquem determinados segmentos.

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

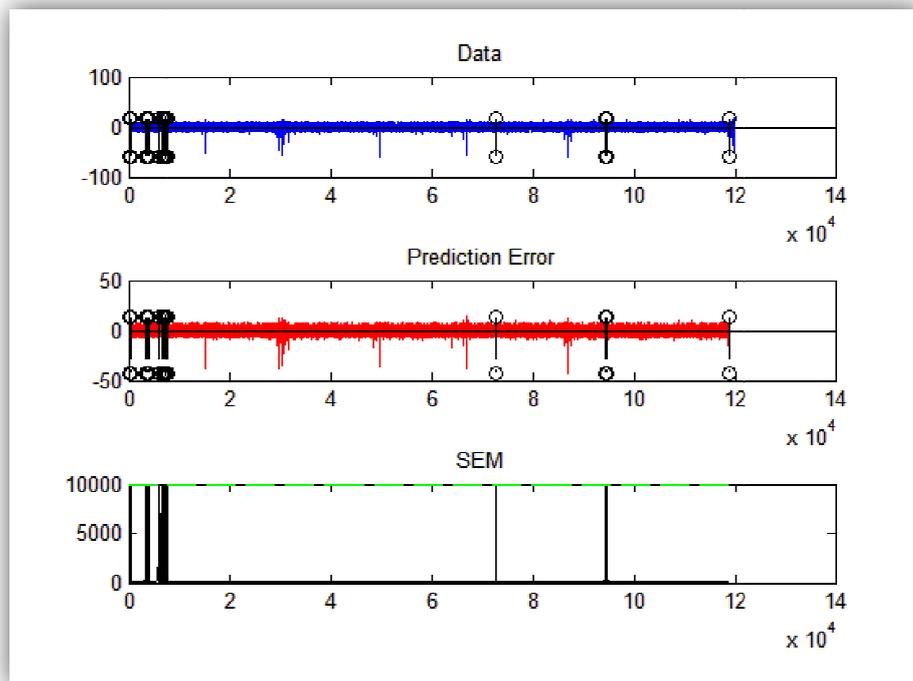


Figura 5.10 – Segmentação de sinal MEA: Trecho com bursts. O programa foi capaz de segmentar o sinal da MEA em alguns trechos, entretanto, outros segmentos não conseguiram ser identificados.

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=yCw6HNz1Y7eM_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 anestésiar uma rato prena 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 hemocítmetro 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).

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)