

Leonardo Bonato Felix

Detecção objetiva de respostas auditivas em regime permanente: aplicação em exames audiológicos

Texto submetido à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

Orientador: Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes - Departamento de Engenharia Eletrônica/UFMG

Co-Orientador: Márcio Flávio Dutra Moraes - Departamento de Fisiologia e Biofísica/UFMG

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da
Universidade Federal de Minas Gerais

Ruminanças

"Sapo não pula por boniteza, mas por precisão."

(Guimarães Rosa)

I went to the woods because I wished to live deliberately, to front only the essential facts of life, and see if I could not learn what it had to teach, and not, when I came to die, to discover that I had not lived. I did not wish to live what was not life, living is so dear; nor did I wish to practice resignation, unless it was quite necessary. I wanted to live deep and suck out all the marrow of life, to live so sturdily and Spartan-like as to put to rout all that was not life, to cut a broad swath and shave close, to drive life into a corner, and reduce it to its lowest terms, and, if it proved to be mean, why then to get the whole and genuine meanness of it, and publish its meanness to the world; or if it were sublime, to know it by experience, and to be able to give a true account of it in my next excursion.

(Henry David Thoreau)

O que tem sido, isso é o que há de ser; e o que se tem feito, isso se tornará a fazer; nada há que seja novo debaixo do sol.

(Eclesiastes 1:9)

Agradecimentos

Caro leitor,

O escriba que aqui vos fala já inicia esta missiva pesaroso das eventuais injustiças que serão cometidas no decorrer desta escritura. Com este receio, tentei protelar os agradecimentos até esta versão mais final e, neste instante primo, atiro-me a esta interessante aventura, emocionante e de introspecção fundamental.

Indivíduo extraordinário o Sr. Márcio Flávio Dutra Moraes. Antes do adjetivo anterior cheguei a tecer umas quatro laudas de deferências e mais umas três aspas de citações para definir minha admiração por esse Grande Mineiro. Todavia, percebendo a impraticabilidade de descrevê-lo, e, mais provavelmente, devido à incapacidade (intelectual, do escriba) de alcançá-lo em palavras, conformei-me apenas com o contido vocábulo. Durante o tempo em que estive sob sua tutela, utilizei de várias alcunhas (carinhosas, sem permissão!) para referenciar-me a este amigo - Mestre do magos, Montezuma, *Boss* etc - mas nenhuma seria mais adequada que Capitão, ou *My Captain*:

*"O Captain! My Captain! Our fearful trip is done;
The ship has weather'd every rack, the prize we sought is won"*

Foi uma honra e um prazer, Capitão. Agradeço pela convivência e amizade, por compartilhar nessas mesas do universo (estivemos em várias!) conversas enriquecedoras e pelas transformações; por mostrar-nos que a ciência e a educação são o caminho para desenvolvimento da sociedade, para a minimização de fronteiras sociais ("O cientista, ele tem um genuíno compromisso com a humanidade ..."); Obrigado pela paciência e pela poesia; Agradeço também pela orientação nos trabalhos de pós-graduação.

Dos professores, inicio pelo Hani Camille Yehia, que sempre acompanhou-me durante a pós-graduação. Agradeço pela perspicácia e pelas críticas construtivas. Agradeço também ao Murilo Eugênio Duarte Gomes, que herdou-me de Hani e orientou-me no início dos trabalhos do doutorado. Em seguida,

o fardo de me orientar foi repassado ao Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes, indivíduo pelo qual sempre nutri grande apreço e admiração desde nossos convívios no LabSis da extinta FUNREI, ao qual agradeço pelo essencial ambiente de trabalho que me proporcionou, pelos ótimos conselhos e pela paciência. Espero ter consolidado com vocês as bases para profícuas colaborações futuras. Antônio Maurício Ferreira Leite Miranda de Sá: grande mestre, agradeço pela presteza que sempre reservou para comigo, pelo seu exemplo de homem de ciência que acompanho desde 1999.

Em janeiro de 2006 fui integrado ao corpo docente do departamento de Engenharia Elétrica e de Produção da Universidade Federal de Viçosa e por todos esses colegas de trabalho gostaria de externar meu agradecimento, tanto pela compreensão na distribuição de encargos didáticos, quanto pelas funções administrativas que me foram poupadas durante o doutoramento.

No outubro de 2003 adentrei o Núcleo de Neurociências (NNC) da UFMG para realizar uma coleta de dados necessária para meu mestrado. A empatia foi óbvia e irresistível. Isso, em grande parte, devido às presenças dos Profs. Márcio Flávio Dutra Moraes, André Ricardo Massensini, da Maria Carolina Doretto e do Fernando Pimentel de Souza. Hoje, terminado o doutorado, devo retirar-me como aluno do NNC; porém garanto: saio do NNC mas o NNC não sai de mim! Levarei comigo as lições de boa convivência, de fraternidade e alegria no ambiente de trabalho.

Que fique aqui registrada uma deferência ao Clã de Lordes do NNC, uma confraria idônea e imparcial, uma sociedade pseudo-secreta detentora de fastidioso objetivo: entender como o cérebro funciona. Nos intervalos, nos foi sempre permitido e prazeroso compartilhar experiências fundamentais, sempre regados por comedidos tragos e modestas comezainas.

Dos amigos: agradeço a todos, apesar de não saber quem me sonho. Ao José Elvano Moraes e Gabriel Perfeito Castro. Indivíduos da maior supim-pitude, comparsas meus, meta-onanistas: cristalizo aqui um abraço amigo, pesado, mineiro ... que é para combater a saudade inabalável que carrego dos distintos. Gostaria de lembrá-los a todo tempo de nossas contradições, perplexidades e hipocrisias, pois elas são o motivo, a essência e o sentido. Talvez não necessariamente nessa ordem ... Fica aqui um abraço na querida Maira de Castro Lima, pela terna amizade e companheirismo. Ubi-rajara Fumega, Andrea Haibara e Lívia, Vinícius Cota, Alexandre Batista, Eric Liberato, João Doretto, Luciana Drummond, Sérgio Jacobovitz, Patrícia Guidine, Aline Lima, Guilherme Cunha, Daniela, Thiago Fuscaldi (com deferência especial pela "ajuda" na coleta de dados do Capítulo 5), Gioconda Assumpção, Tupete, Gustavo Henrique, Mariele, Maura, Fernanda Caldeira, Fernanda Sada, Cláudia Byrro, André Cavatoni, Christopher Kushmerick, José Eustáquio de Oliveira, Roberto Tavares, Aila e Fred, Túlio, Newton

Godoy, José Maurício, Deoclécio Chianca, Jerusa, Tasso Moraes, Maria e Delba, Kátia Daniela, Priscila Elisa, Ricardo Ceará, Aline Conceição, Renato Teixeira, Gustavo Menezes, Lúcio, Dante, Viviane, Simonton, Cláudio, Heitor, Baltazar, Virgínia, Daniel, Dan, Gonzaga, Ana Luíza, Mel: agradeço e lembrem-se: Embriagai-vos! De vinho, de poesia ou de virtude, como achardes melhor. Ao não incluído neste panteão, ou àquele que sinta seu agradecimento diminuído, e que por mim nutra apreço, por favor, faça-me recordar de minha insignificância no nosso próximo encontro e, gentileza, releia o primeiro parágrafo destes agradecimentos, para que tenha uma medida de meu pesar ao aceitar findar este parágrafo.

Agradeço às famílias Bonato e Felix. Todos vocês, ao seu modo, contribuíram para meu trabalho. Tenho um sentimento de que não mudaria as coisas que fiz, mas, a forma como fiz esta diretamente relacionada à maneira como fui embalado pelas pessoas destas famílias. Nossas felicidades, tristezas, carácteres, os bons e maus exemplos são parte de mim, então, humildemente, peço que considerem esta tese como sua também. É preciso fazer aqui consideração especial a Vovó Zezé, que teve sempre mão carinhosa para com este neto muitas vezes relapso, aos avôs João e Antônio e à Vovó Ana, que não pôde presenciar a conclusão destes meus percalços acadêmicos, mas cuja lembrança vive em mim tão forte que suplanta até mesmo essa irreparável maior das saudades.

Quando dos momentos difíceis, pude sempre sentir o abraço protetor de minha mãe, o beijo acolhedor do meu pai e o sorriso do meu irmão. Espero que as mal traçadas linhas que seguem o sumário deste trabalho sejam dignas de vocês, pois dedico esta tese aos meus pais, Hamilton de Oliveira Felix e Maria Bonato Pereira Felix, e ao meu irmão, Eduardo Bonato Felix. Isto é o mínimo que posso oferecer, por se importarem comigo, pelos sacrifícios, pelo amor incondicional e pela felicidade tranqüila de saber que nossa casa é o melhor recanto do universo.

Boa leitura.

Resumo

No campo das neurociências, o teste da presença ou ausência de uma resposta evocada é uma ferramenta útil para avaliações da função e integridade de vias sensoriais. As respostas evocadas auditivas em regime permanente (ASSRs, do inglês *Auditory Steady-state Responses*) são atividades elétricas cerebrais desencadeadas por, ou em função de, estímulos auditivos apresentados em uma taxa de repetição suficientemente elevada. Estas respostas têm ajudado no diagnóstico de diversas disfunções relacionadas ao sistema nervoso central, além de contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos neurais da percepção. Contudo, os métodos atuais de quantificação das ASSR não permitem uma associação biunívoca com os substratos neurais responsáveis pelo potencial evocado (ao contrário de técnicas como o ABR - *Auditory Brainstem Response*). Tampouco a utilização de ferramentas matemáticas para detecção de resposta evocada nas ASSR pode perfeitamente substituir a audiometria nos pacientes. Este trabalho estuda a aplicabilidade das técnicas de detecção objetiva de respostas (ORD) nas ASSRs para exames audiológicos. Nesse sentido, limitações das técnicas ORD foram identificadas e métodos de prevenção e correção de espalhamento espectral foram desenvolvidos. As ASSRs foram registradas em ratos Wistar para diferentes estímulos, com vistas a determinar a relação entre os parâmetros dos sons de estimulação e as respectivas respostas evocadas. Os resultados permitem concluir que a aplicação de técnicas espectrais objetivas são úteis para a detecção de ASSRs, desde que tomadas as devidas precauções contra o espalhamento espectral. A variação dos parâmetros de estimulação realizada concomitante a novas propostas de análise das ASSR é promissora no que se refere tanto à questão da localização dos geradores das respostas evocadas, quanto à quantificação dos limiares auditivos através dos registros eletrofisiológicos. Desta forma, com base nos dados coletados, métodos alternativos para diagnósticos são propostos.

Abstract

In neuroscience, testing for the presence or absence of evoked response is a useful tool to assess sensorial pathways integrity and for function evaluation. The auditory steady-state responses (ASSRs) are brain electrical activities driven by auditory stimuli repeated at sufficiently high rate. These responses help the diagnoses of several pathologies related to the central nervous system and contributes for the study of the neural mechanisms of perception. However, current methods for quantifying the ASSR fail to associate these responses with its neural substrates (this task can be archived, for example, by Auditory Brainstem Responses - ABR). Furthermore, the use of mathematical tools for detection of such responses is still a matter of study. In this work, objective response detection (ORD) techniques were applied to ASSRs for auditory evaluation. Accordingly, limitations of such tools were identified and methods for prevention and correction of spectral leakage were developed. The ASSRs were recorded from Wistar rats for different stimuli, regarding the determination of the relationship between the stimulus parameters and the respective evoked responses. The results allow us to conclude that the application of spectral objective tools are useful for detection of ASSRs. However, care must be taken against the spectral leakage. The parameter variations and the new analysis procedures proposed in this work are promising tools regarding localization of neural generators of evoked responses and quantification of auditory thresholds using electrophysiological recordings.

Conteúdo

Agradecimentos	ii
Resumo	v
Abstract	vi
Nomenclatura	xvii
Abreviações	xviii
1 Introdução	1
1.1 Respostas evocadas	1
1.1.1 Resposta auditiva em regime permanente	2
1.2 Fisiologia auditiva	3
1.2.1 Anatomia e fisiologia orelha	3
1.2.2 Frequência característica dos neurônios auditivos	5
1.2.3 Vias auditivas aferentes	5
1.3 Detecção objetiva de respostas	8
1.4 Objetivos do trabalho	11
1.4.1 Geral	11
1.4.2 Específicos	11
1.5 Estrutura da tese	11
2 Detecção objetiva de ASSRs em ratos Wistar	13
2.1 Considerações iniciais	13
2.2 Materiais e métodos	14
2.2.1 Magnitude quadrática da coerência (MSC)	14
2.2.2 Estímulo auditivo	16
2.2.3 Animais	17
2.2.4 Procedimento cirúrgico	17
2.2.5 Aquisição de dados	18
2.3 Resultados	19

2.4	Discussão	22
3	Lidando com o espalhamento espectral	24
3.1	Considerações iniciais	24
3.2	Espalhamento espectral	25
3.3	Amostragem sincronizada (<i>Coherent Sampling</i>)	25
3.4	Correção do espalhamento <i>a priori</i>	26
3.4.1	Estudos de simulação	26
3.4.2	Aplicação ao LFP de ratos Wistar	28
3.4.3	Procedimentos experimentais	28
3.4.4	Resultados da aplicação ao LFP	29
3.4.5	Discussão	29
3.5	Correção do espalhamento <i>a posteriori</i>	32
3.5.1	Técnicas ORD	35
3.5.2	Método de correção espectral por diferença de fase	37
3.5.3	Estudos de simulação	37
3.5.4	Resultados das simulações	37
3.5.5	Discussão	43
4	Avaliação da ASSRs através da varredura dos parâmetros do estímulo	46
4.1	Considerações iniciais	46
4.1.1	Procedimentos experimentais	47
4.2	Varredura de profundidade	47
4.2.1	Estímulo	47
4.2.2	Resultados	47
4.3	Varredura de amplitude	52
4.3.1	Estímulo	52
4.3.2	Resultados	52
4.4	Varredura de portadora	55
4.4.1	Estímulo	55
4.4.2	Resultados	55
4.5	Varredura de moduladora	58
4.5.1	Estímulo	58
4.5.2	Resultados	58
4.6	Discussão	62
5	Envolvimento das intra-ligações GABAérgicas coliculares nas ASSRs	65
5.1	GABA	65
5.2	Considerações iniciais	65

5.3	Materiais e métodos	66
5.3.1	Animais	66
5.3.2	Procedimento cirúrgico	66
5.3.3	Confeção dos eletrodos	67
5.3.4	Estímulo	67
5.3.5	Aquisição de sinais	68
5.3.6	Protocolo experimental	68
5.3.7	Processamento dos sinais	68
5.4	Resultados	69
5.4.1	Micro-injeção de salina	69
5.4.2	Micro-injeção de bicuculina	70
5.5	Discussão	74
6	 Discussão e conclusão finais	75
6.1	Trabalhos futuros	77
7	 Anexo	79
	 Bibliografia	85

Lista de Tabelas

2.1	(A): Frequências de teste originais. (B): Correção para número inteiro de oscilações na janela de análise. A frequência de amostragem do LFP e o tamanho da janela considerados foram 1 kHz e 1024 pontos, respectivamente.	17
3.1	(A): Frequências de teste originais. (B): Correção das frequências de teste pelo critério de CS (número primo). (C): Correção para número inteiro de oscilações na janela de análise. A frequência de amostragem e o tamanho da janela considerados foram 1 kHz e 1024 pontos, respectivamente.	27
3.2	(A) Frequências de teste corrigidas de acordo com o número inteiro de oscilações próximo. (B) Correção das frequências de amostragem, <i>a posteriori</i> , pelo critério de CS (número primo). A frequência de amostragem original foi 1 kHz.	33
3.3	Aplicação do teste F em sinais gerados de acordo com CS (SNR = -15 dB). O '*' superposto indica significância estatística ($\alpha = 5\%$).	39
3.4	Aplicação do teste F em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB). O '*' superposto indica significância estatística ($\alpha = 5\%$).	41
3.5	Aplicação do teste F em sinais gerados de acordo com CS (SNR = -15 dB) e pré-processados pelo algoritmo de Kang. O '*' superposto indica significância estatística ($\alpha = 5\%$).	43

Lista de Figuras

1.1	Todos os níveis do SNC apresentam componentes do sistema auditivo. A é uma vista dorsal do tronco encefálico, do ângulo assinalado pela luneta no pequeno encéfalo acima. No encéfalo estão também representados os planos de corte (números circulados) mostrados em B . Tanto em A como em B , os neurônios auditivos estão representados em preto (os aferentes) e vermelho (os eferentes) (Adaptado de Lent, R., <i>Cem Bilhões de Neurônios</i> , 2004).	7
2.1	Vistas dorsal e lateral do crânio de um rato Wistar de 290 g. As posições do bregma e do lambda são mostradas. (Adaptado de Paxinos, G. e Watson, C., <i>The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates</i> , 1998).	18
2.2	Funções $\hat{\kappa}_y^2(f)$ obtidas de registro típico de LFP de rato Wistar (A) $\hat{\kappa}_y^2(f)$ do LFP registrado com a oclusão do tubo que conecta a barra estereotáxica perfurada durante estimulação de 4 kHz modulada em 104,49 Hz. (B) $\hat{\kappa}_y^2(f)$ do LFP registrado durante estimulação de 4 kHz modulada em 104,49 Hz. (C) $\hat{\kappa}_y^2(f)$ do LFP registrado durante estimulação de 3 kHz modulada em 104,49 Hz. (D) $\hat{\kappa}_y^2(f)$ do LFP registrado durante estimulação de 4 kHz modulada em 69,34 Hz. O valor crítico associado a cada detecção é mostrado em linhas pontilhadas.	20
2.3	(A) $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência moduladora do estímulo para todos os animais do estudo (portadora fixa de 4 kHz e correção da moduladora para o número inteiro de ciclos mais próximo na janela).(B) Amplitude das respostas evocadas em μV na frequência moduladora. Todos os valores são estatisticamente significativos. O tamanho da janela foi 1024 pontos.	21

2.4	(A) $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência portadora do estímulo para todos os animais do estudo (moduladora fixa em 102,54 Hz). (B) Amplitude das respostas evocadas em μV na frequência moduladora. Todos os valores são estatisticamente significativos. O tamanho da janela foi 1024 pontos.	22
3.1	Valores de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função de diferentes tamanhos de janelas e frequências moduladoras. (A) Correção da moduladora para um número inteiro de ciclos mais próximo em cada janela. (B) Correção da moduladora para um número primo de ciclos mais próximo em cada janela. Em ambos casos, $M60$. Os valores mostrados nos valores intermediários de tamanho da janela (1024, 2048 e 4096) e frequência de teste são interpolações lineares dos resultados de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ usadas para traçar as superfícies.	28
3.2	$\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência moduladora para todos os animais do estudo (portadora fixa de 4 kHz). (A) Correção da moduladora para o número inteiro de ciclos mais próximo na janela. (B) Correção da moduladora para o número primo de ciclos mais próximo na janela. Em ambos os casos, o tamanho da janela foi 1024 pontos. (C) Amplitude das respostas evocadas em μV na frequência moduladora.	30
3.3	$\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência portadora para todos os animais do estudo (moduladora fixa em 105 Hz). (A) Correção da moduladora para o número inteiro de ciclos mais próximo na janela ($f_m = 102, 54$). (B) Correção da moduladora para o número primo de ciclos mais próximo na janela ($f_m = 104, 49$). Em ambos os casos, o tamanho da janela foi 1024 pontos. (C) Amplitude das respostas evocadas em μV na frequência moduladora.	31
3.4	Valores de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função de diferentes tamanhos de janelas e frequências moduladoras. A Correção da frequência de amostragem foi realizada para um número primo de ciclos mais próximo em cada janela. Foi utilizada interpolação linear para adequar os sinais às novas frequência de amostragem.	34
3.5	Aplicação de $\hat{\rho}_y^2(f)$ em sinais gerados de acordo com CS (SNR = -15 dB). Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$).	38
3.6	Aplicação de $\hat{\kappa}_y^2(f)$ em sinais gerados de acordo com CS (SNR = -15 dB). Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$).	39

3.7	Aplicação de $\hat{\rho}_y^2(f)$ em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB). Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$).	40
3.8	Aplicação de $\hat{\kappa}_y^2(f)$ em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB). Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$).	41
3.9	Aplicação de $\hat{\rho}_y^2(f)$ em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB) e pré-processados pelo algoritmo de Kang. Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$). Nota-se detecção significativa somente em 250 Hz.	42
3.10	Aplicação de $\hat{\kappa}_y^2(f)$ em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB) e pré-processados pelo algoritmo de Kang. Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$). Nota-se detecção significativa somente em 250 Hz.	43
3.11	$\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência moduladora (portadora fixa de 4 kHz e correção da moduladora para o número inteiro de ciclos mais próximo na janela). Este resultado é o mesmo mostrado na Fig. 2.3A. (B) $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ após pré-processamento para correção do espalhamento.	45
4.1	Espectrograma típico calculado a partir de LFP coletado no CI de rato Wistar durante estimulação por varredura retró- grada da profundidade de modulação (0 a 100 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1]. As setas indicam a banda da resposta evocada (fundamental). As amplitudes estão em dB.	48
4.2	Respostas evocadas por varredura anterógrada da profundi- dade de modulação (0 a 100 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).	49
4.3	Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura anterógrada da profundidade de modulação (0 a 100 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); ampli- tude ± 1].	50
4.4	Respostas evocadas por varredura retrógrada da profundidade de modulação (100 a 0 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m =$ 105 Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).	50

4.5	Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura retrógrada da profundidade de modulação (100 a 0 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1].	51
4.6	Respostas médias ($n = 3$) evocadas por varreduras anterógrada (linha contínua) e retrógrada (linha pontilhada) da profundidade de modulação (100 a 0 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1].	51
4.7	Respostas evocadas por varredura anterógrada da amplitude (± 0 a ± 1) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).	53
4.8	Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura anterógrada da amplitude ($pm0$ a $pm1$) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%].	53
4.9	Respostas evocadas por varredura retrógrada da amplitude (± 0 a ± 1) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).	54
4.10	Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura retrógrada da amplitude (± 0 a ± 1) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%].	54
4.11	Respostas médias ($n = 3$) evocadas por varreduras anterógrada (linha contínua) e retrógrada (linha pontilhada) da amplitude (± 0 a ± 1) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%].	55
4.12	Respostas evocadas por varredura anterógrada da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).	56
4.13	Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura anterógrada da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%].	56

4.14	Respostas evocadas por varredura retrógrada da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [f_c] (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).	57
4.15	Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura retrógrada da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [f_c] (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%].	57
4.16	Respostas médias ($n = 3$) evocadas por varreduras anterógrada (linha contínua) e retrógrada (linha pontilhada) da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%].	58
4.17	Espectrograma típico calculado a partir de LFP coletado no CI de rato Wistar durante estimulação por varredura anterógrada da moduladora (30 a 1000 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%). As setas indicam a banda da resposta evocada (fundamental). As amplitudes estão em dB.	59
4.18	Respostas evocadas por varredura anterógrada da frequência moduladora (30 a 1000 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%). As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).	60
4.19	Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura anterógrada da frequência moduladora (30 a 1000 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%).	60
4.20	Respostas evocadas por varredura retrógrada da frequência moduladora (1000 a 30 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%). As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).	61
4.21	Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura retrógrada da frequência moduladora (30 a 1000 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%).	61
4.22	Respostas médias ($n = 3$) evocadas por varreduras anterógrada (linha contínua) e retrógrada (linha pontilhada) da frequência moduladora de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%).	62

5.1	Protocolo experimental para avaliação do efeito da inibição GABAérgica no CI de ratos Wistar.	68
5.2	ASSRs de todos os animais medidas antes da micro-injeção de salina.	69
5.3	ASSRs de todos os animais medidas após a micro-injeção de salina.	70
5.4	Médias das ASSRs pré-salina (linha contínua) e pós-salina (linha pontilhada).	70
5.5	ASSRs de todos os animais medidas antes da micro-injeção de bicuculina.	71
5.6	ASSRs de todos os animais medidas após da micro-injeção de bicuculina.	71
5.7	Médias das ASSRs pré-bicuculina (linha contínua) e pós-bicuculina (linha pontilhada).	72
5.8	Ruído médio nas bandas adjacentes à frequência moduladora. Ruído anterior a micro-injeção de salina (linha contínua) e ruído posterior a micro-injeção de salina (linha pontilhada) . .	72
5.9	Ruído médio nas bandas adjacentes à frequência moduladora. Ruído anterior a micro-injeção de bicuculina (linha contínua) e ruído posterior a micro-injeção de bicuculina (linha pontilhada)	73
5.10	Deltas pós - pré microinjeção	73

Nomenclatura

$\gamma_{xy}(f)$	Função de coerência.
$\kappa_y^2(f)$	Magnitude quadrática da coerência entre um sinal periódico e um aleatório.
$F_{2,2(M-1)}$	Distribuição F com 2 e $2(M - 1)$ graus de liberdade.
$\hat{\kappa}_{ycrit}$	Valor crítico para $\kappa_y^2(f)$.
$\kappa_y^2(fm)$	Magnitude quadrática da coerência na frequência fm .
$\rho_y^2(f)$	Medida de componente síncrona de um sinal.
$\theta_i(f)$	Ângulo de fase da transformada de Fourier de um sinal.
χ_2^2	Distribuição chi-quadrada com 2 graus de liberdade.
α	Nível de significância.
$\hat{\rho}_{ycrit}$	Valor crítico para $\rho_y^2(f)$.
λ	Profundidade de modulação.

Abreviações

AM	Modulação em amplitude.
ASSR	Resposta auditiva em regime permanente.
ABR	Resposta auditiva de tronco encefálico.
BMF	Frequência característica de moduladora.
CFAR	Taxa de alarme falso constante.
CI	Colículo inferior.
CS	Amostragem sincronizada.
CSM	Medida de componente síncrona.
DFT	Transformada discreta de Fourier.
EEG	Eletroencefalograma.
FC	Frequência característica de portadora.
FFT	Transformada rápida de Fourier.
GABA	Ácido Gama-amino-butírico.
H0	Hipótese nula de ausência de respostas.
H1	Hipótese alternativa de presença de respostas.
LFP	Potencial de campo local.
MSC	Magnitude quadrática da coerência.
NT	Neurotransmissor.
ORD	Detecção objetiva de respostas.
PE	Potencial evocado.
SFT	Teste F espectral.
SNC	Sistema nervoso central.
SNR	Relação sinal/ruído.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Respostas evocadas

Em neurociência, um potencial evocado (PE) é uma atividade bioelétrica registrada em um organismo biológico desencadeada por um estímulo externo (Chiappa, 1997). A ordem de grandeza de potenciais bioelétricos é, geralmente, de unidades-dezenas de microvolts; o que é considerado baixo quando comparado com as dezenas-centenas de microvolts do eletroencefalograma (EEG) de fundo e com as unidades de milivolts do eletrocardiograma (Chiappa, 1997). A rede neural envolvida no processamento de um estímulo sensorial pode ser indiretamente monitorada pela análise do respectivo PE registrado no escalpo, em uma forma não-invasiva de monitoração de integridade de vias neurais. Após algumas centenas de milisegundos da apresentação do estímulo, seja devido à divergência da rede, seja devido à alta complexidade do processamento neural, os sinais do PE são indistinguíveis da atividade elétrica basal do encéfalo. Assim, é comum considerar que um potencial evocado por um estímulo sensorial breve geralmente dure algumas dezenas de milisegundos (Chiappa, 1997).

Os PEs podem ser subdivididos em transitórios e de regime permanente. No PE transitório, os estímulos são apresentados a uma taxa de repetição suficientemente lenta para que cada resposta termine antes da chegada do próximo estímulo, ou seja, o PE transitório tem um início e fim bem demarcados. Este tipo de sinal é usado na clínica médica, por exemplo, como teste da integridade das vias auditivas (Chiappa, 1997), visuais (Celesia, 1998) e somato-sensitivas (Simpson et al., 2000). No caso de o estímulo ser apresentado a uma taxa suficientemente elevada, onde cada resposta se sobrepõe temporalmente à subsequente, considera-se que a rede neuronal alcançou um equilíbrio de excitabilidade e que, então, um PE em regime permanente é

alcançado.

1.1.1 Resposta auditiva em regime permanente

Uma resposta auditiva em regime permanente (ASSR, do inglês *auditory steady-state response*) ocorre quando um som é apresentado a uma taxa suficientemente elevada, de modo que a resposta a qualquer som sobreponha-se à resposta ao som anterior. A modulação senoidal da amplitude de um tom contínuo (tom AM) é um exemplo de estímulo acústico que evoca uma resposta auditiva em regime permanente (Kuwada et al., 1986). De acordo com Dolphin e Mountain (1992), a ASSR evocada por tom AM é caracterizada por um aumento de energia na frequência da moduladora (e seus harmônicos) no espectro de potência do sinal registrado. Joris et al. (2004) atestam que, em comparação com os estímulos auditivos transitórios, o tom AM tem a vantagem de ser mais próximo dos sons que acontecem na natureza, tornando as ASSRs evocadas mais próximas das situações cotidianas e contribuindo para uma abrangência maior de um eventual teste.

Em humanos, as ASSRs evocadas por tons AM mais estudadas são as com frequência de modulação entre 70 e 110 Hz (Cohen et al., 1991; Levi et al., 1993) bem como a 40 Hz (Galambos et al., 1981). Essas respostas a modulações de 40 Hz são amplamente estudadas, apresentando as seguintes características:

- Sua amplitude decai consideravelmente durante o sono (Linden et al., 1985).
- É difícil de se registrar em crianças (Stapells et al., 1988).
- É significativamente atenuada por anestesia (Plourde e Picton, 1990).

Embora a amplitude da resposta a 70-110 Hz tenha uma intensidade 2 a 3 vezes menor que a resposta a 40 Hz durante vigília (John et al., 1998), tais respostas apresentam as seguintes vantagens:

- Muito menos afetadas pelo sono (Aoyagi et al., 1993) e pelo despertar (Levi et al., 1993).
- Prontamente registradas em crianças (Rickards et al., 1994).

1.2 Fisiologia auditiva

Os sons que entram no meato acústico externo são conduzidos até a cóclea por diversas estruturas que funcionam como um casador de impedâncias acoplando as ondas de rarefação e compressão do ar a movimentos de fluido no interior da cóclea (Hudspeth, 2000; Azevedo, 2003). Os neurônios sensoriais da cóclea apresentam atividade quando ondas sonoras de frequência específica atingem esta estrutura, numa forma de decomposição espectral do estímulo sonoro. A informação elétrica ascende até o córtex pelas vias auditivas, gerando, neste caminho, os sinais elétricos correspondentes ao potencial evocado auditivo.

1.2.1 Anatomia e fisiologia orelha

Nos mamíferos, a transdução da pressão sonora em sinais neurais é realizada por meio de processos mecânicos, químicos e elétricos pela cóclea (caracol em grego), um órgão sensitivo complexo, que se encontra envolvido pelo osso mais resistente do corpo. Apenas no século XIX, as pesquisas de Alfonso Corti levaram a uma descrição mais precisa do funcionamento da cóclea, modificando a idéia de uma transdução simples de ondas de pressão.

Após entrar na orelha pelo meato, as ondas são guiadas pela parede deste canal até membrana timpânica. O movimento desta membrana desloca os ossos da orelha média (na seqüência de acionamento: martelo, bigorna e estribo), os quais são responsáveis pela condução de energia sonora até a orelha interna. A conexão entre a platina do estribo e a cóclea se dá através da janela oval.

De modo a otimizar a transferência de energia entre as orelhas externa e média, a membrana timpânica deve operar com a mesma pressão em ambas as faces. Essa equalização de pressão é realizada pela tuba auditiva, que liga a orelha média à nasofaringe e mantém a pressão atmosférica. Enquanto as orelhas externa e média são preenchidas de ar, a partir da janela oval a orelha interna é preenchida por líquido, configurando uma interface ar-fluido que provocaria uma perda de energia por reflexão. Entretanto, devido à membrana timpânica ser maior do que a janela oval, a redução de área entre estas duas superfícies leva a um aumento na pressão (que equivale à força dividida pela área) na entrada da cóclea, funcionando como um amplificador mecânico e compensando as perdas ocorridas na interface ar-fluido. Este mecanismo acrescenta em média 25 dB à eficiência auditiva, enquanto o efeito de alavanca da cadeia ossicular contribui aumentado em 2,5 dB a amplificação sonora (Ginsberg e White, 1999).

O órgão auditivo propriamente dito é a cóclea, uma estrutura em forma

espiral composta de duas voltas e meia nos seres humanos (aproximadamente 30 mm em adultos), localizada no interior do osso temporal. A cóclea consiste em uma câmara dividida em três compartimentos repletos de fluido, separados por duas membranas: a membrana de Reisner divide a câmara superior - a escala vestibular - da escala média, enquanto que a membrana basilar separa a escala média da escala timpânica. No ápice da cóclea, o helicotrema une as escalas vestibular e timpânica; assim, estas duas câmaras compartilham o mesmo fluido, formando uma via de passagem da onda de pressão, ao modo de um tubo de extremidade aberta. Um deslocamento no estribo, relacionado ao estímulo acústico, produz uma movimentação do fluido dentro das duas espiras e meia da escala vestibular, transmitindo uma onda de compressão até o ápice da cóclea. Ao atingir o helicotrema, a direção da onda é invertida, e a energia retorna através da escala timpânica, provocando um movimento correspondente ao longo da membrana basilar. Sustentado por esta membrana, encontra-se o órgão de Corti, que é o principal da audição. Devido à variação de reatância mecânica da membrana basilar desde a base (próxima à janela oval) até o ápice (próximo ao helicotrema), o deslocamento produzido ao longo do comprimento da membrana torna-se específico em relação à frequência: estímulos de alta frequência provocam um máximo movimento na extremidade basal da membrana, enquanto estímulos de baixa frequência provocam máximo deslocamento na extremidade apical.

Em função do estímulo auditivo, a característica física de reatância da membrana basilar produz uma vibração característica, na forma de uma onda viajante. Desta forma, a membrana basilar pode ser modelada como uma série de filtros passa-faixa, agindo como um analisador de frequências para o sinal acústico de entrada (Geisler, 1987). A movimentação da membrana basilar altera a excitação das células ciliadas internas, modulando sua frequência média de disparos e produzindo o impulso nervoso. As células ciliadas internas atuam como transdutores mecânico-neurais, quantificando o deslocamento da membrana basilar em informação para o sistema auditivo (Parkins, 1983). Esta característica de distribuição da população neuronal em função da frequência é chamada de tonotopia, conferindo à membrana basilar as propriedades de um analisador mecânico de espectro.

Praticamente toda a informação sensorial auditiva que segue para o sistema nervoso central provém das células ciliadas internas. Sabe-se que a quase totalidade das 30000 a 50000 fibras nervosas que se distribuem da cóclea para o sistema nervoso central fazem contato com as células ciliadas internas, mas somente uma pequena parte das fibras auditivas (5-10%) faz sinapse com as células ciliadas externas. Embora existam aproximadamente três vezes mais células ciliadas externas do que internas, parece que as células externas transmitem pouca informação sensorial para o sistema nervoso cen-

tral através de fibras aferentes. Estudos têm demonstrado que células ciliadas externas são móveis e podem alongar-se ou encurtar-se de forma lenta e sustentada ou oscilar rapidamente em frequências altas como 8 kHz (Brownell, 1990). Assim, acredita-se que estas células ajam primariamente como um sistema motor mais do que como transmissor de entrada sensorial para a via auditiva central, com a sua motilidade contribuindo para a sensibilidade do órgão auditivo e para o mecanismo preciso de sintonia da membrana basilar. Este fenômeno é chamado de *cóclea ativa* (Dallos, 1992).

1.2.2 Frequência característica dos neurônios auditivos

Na ausência de estimulação acústica, a maioria dos neurônios ligados às células ciliadas internas produz potenciais de ação espontâneos de forma estocástica. A medida de descarga espontânea da maioria das unidades (registros de neurônios isolados) varia normalmente de 0 a 120 disparos por segundo (Donald et al., 1999). Pelo fato de um potencial de ação e o período refratário subsequente durarem em torno de 2 ms, a maior taxa de disparo observada nestas células é de 500 disparos por segundo (Hudspeth, 2000). Quando um tom de uma determinada frequência e intensidade são apresentados ao indivíduo, observa-se que a frequência de descarga de uma fibra do nervo auditivo aumenta em relação à sua medida basal. O nível do estímulo que provoca uma resposta probabilisticamente maior do que a descarga espontânea é chamado de limiar da unidade. Se o limiar para uma fibra é medido ao longo de uma série de frequências de estimulação, obtém-se uma curva de sintonia daquela unidade; a frequência para a qual o limiar é mínimo é definida como sendo a sua frequência característica (FC). Assim, cada unidade funciona como um filtro passa-faixa estreito, com frequência central em FC.

Quando um tom AM é apresentado como estímulo, os disparos nas fibras tendem a sincronizar seu valor máximo com uma fase específica da onda modulante realizando, assim, uma espécie de retificação de meia-onda e, conseqüentemente, a demodulação do sinal acústico (Joris et al., 2004). Concomitantemente, os neurônios da via auditiva ainda possuem uma frequência de modulação para a qual sua taxa de disparo é máxima (BMF, do inglês *best modulation frequency*).

1.2.3 Vias auditivas aferentes

As vias auditivas aferentes iniciam-se nas sinapses das células ciliadas internas, no gânglio espiral. Os axônios do gânglio espiral, conjuntamente com as fibras advindas do sistema vestibular, compõem o nervo auditivo,

correspondente ao VIII nervo craniano. Cerca de 30000 a 50000 nervos conectam as células ciliadas internas e externas ao sistema nervoso. No sistema nervoso central (SNC), os neurônios aferentes do nervo auditivo entram no tronco cerebral na altura dos núcleos cocleares dorsal e ventral, ipsilaterais à cóclea na qual os axônios originaram-se. No esquema das conexões sinápticas do sistema auditivo aferente, mostrado na Fig. 1.1, cerca de 80% das fibras cruzam a linha média e fazem sinapse no complexo olivar superior em ambos os lados do tronco cerebral, enquanto outras passam pelo complexo olivar superior, atravessam a linha média e fazem sinapse no colículo inferior (CI) contralateral. Enquanto algumas sinapses ipsilaterais acontecem no lemnisco lateral e no CI, um grande número de neurônios do núcleo coclear se estende contralateralmente ao lemnisco lateral. Portanto, há uma representação bilateral paralela ao CI (Webster et al., 1985). Além disso, qualquer que seja a via percorrida pelas fibras auditivas, todas as vias aferentes convergem no CI e, deste ponto, prosseguem tanto ipsi como contralateralmente, enviando axônios ao núcleo geniculado medial do tálamo, que os projeta ao córtex auditivo, localizado no lobo temporal superior. O córtex auditivo primário organiza-se em uma distribuição tonotópica, ou seja, frequências sonoras sucessivas são representadas em regiões adjacentes (Hudspeth, 2000).

O colículo inferior

A informação auditiva é transmitida e processada na via auditiva primária e no córtex através de neurônios organizados de forma tonotópica. Estes interagem de acordo com a arquitetura de suas inter-ligações e também em função do tipo de neurotransmissores (NT) envolvidos em suas sinapses. A via auditiva primária é um sistema complexo composto por inúmeros circuitos paralelos e série que convergem num destino comum, o CI - importante núcleo localizado na placa quadrigêmea do mesencéfalo - (Pollak et al., 2003). Este núcleo recebe e projeta inervações excitatórias e inibitórias, sendo o glutamato e o Ácido Gama-Amino-Butírico (GABA), respectivamente, seus principais neurotransmissores. Além disso, inervações glicinérgicas e colinérgicas são observadas (Pollak et al., 2003; Joris et al., 2004). O CI é envolvido na codificação de sons complexos, como sons modulados em amplitude e frequência (Casparly et al., 2002). Adicionalmente, estudos de inibição das sinapses GABAérgicas no CI sugerem que a deficiência desta substância endógena está diretamente relacionada com crises epilépticas audiogênicas (Cairasco, 2002). Esta é uma informação interessante, pois associa uma desordem do sistema nervoso central a uma disfunção de grupos neuronais específicos. Portanto, conhecer o efeito da falta ou excesso de NTs em funções ou respostas é parte importante do processo de identificação de mecanismos neurais. Todavia,

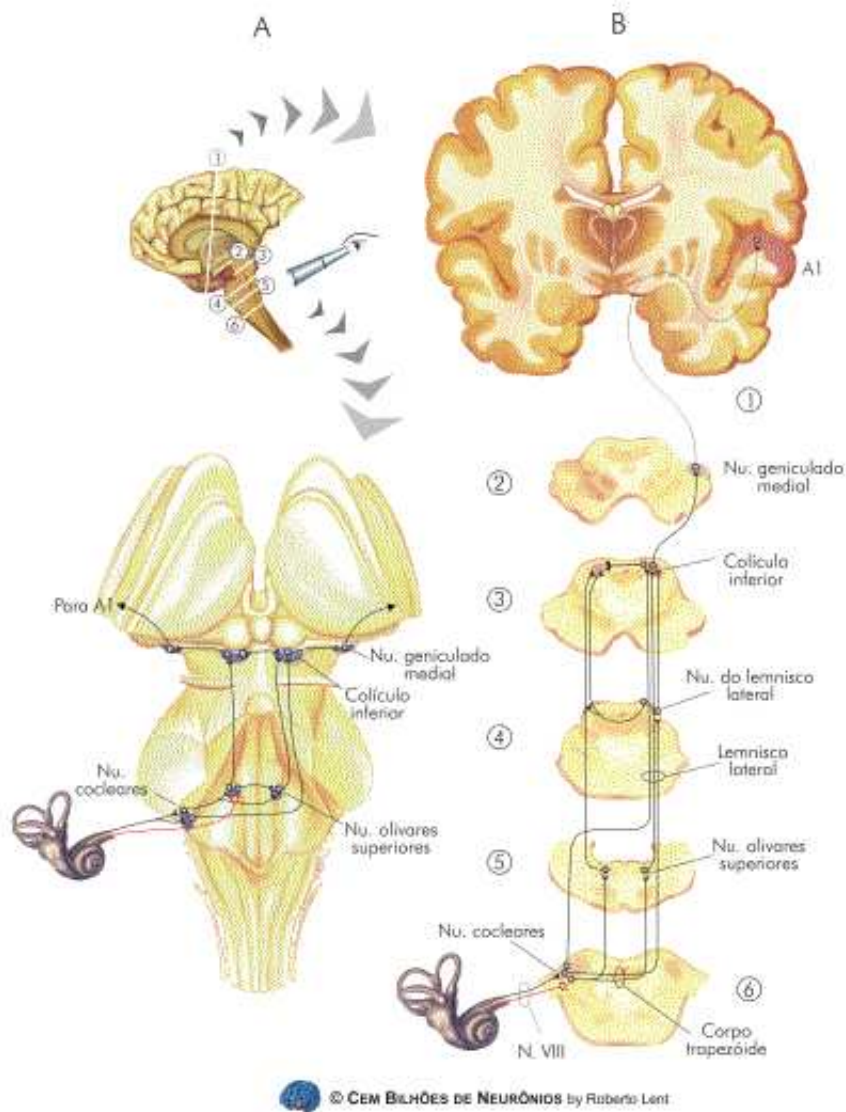


Figura 1.1: Todos os níveis do SNC apresentam componentes do sistema auditivo. **A** é uma vista dorsal do tronco encefálico, do ângulo assinalado pela luneta no pequeno encéfalo acima. No encéfalo estão também representados os planos de corte (números circulosados) mostrados em **B**. Tanto em **A** como em **B**, os neurônios auditivos estão representados em preto (os aferentes) e vermelho (os eferentes) (Adaptado de Lent, R., *Cem Bilhões de Neurônios*, 2004).

a associação direta entre neurotransmissor e função é perigosa, pois os circuitos neurais responsáveis pelas funções e comportamentos são compostos por vários neurônios com especialidades diferentes, e.g. neurônios com NTs diferentes numa mesma via. Assim, é preciso testar todos os NTs de uma via neuronal e suas inter e intra-conexões antes de se associar bioquímica à função neuronal.

Um tom AM ativa a membrana basilar da cóclea na região específica da portadora. Todavia, devido à demodulação que ocorre nas estereocilas das células ciliadas (Joris et al., 2004), uma análise espectral dos histogramas pós-estímulo das fibras nervosas auditivas mostram componentes na frequência de modulação e seus harmônicos, (Khanna e Teich, 1989). O CI é tonotopicamente dividido em função de frequência característica (portadora) e é particularmente responsivo às frequências de modulação de um estímulo, sendo que os neurônios coliculares apresentam funções de transferência que são sintonizadas em torno de BMFs estreitas (Krishna e Semple, 2000), i.e. os neurônios do CI possuem duas frequências principais que o caracterizam: FC (frequência característica de portadora) e BMF (frequência característica de moduladora). Estas funções de transferência estão relacionadas com a sensação psicofísica de "timbre" de um tom AM (Fastl, 1990). Picton et al. (2003) mencionam que um melhor entendimento das fontes intra-cerebrais das ASSRs é necessário para que este tipo de resposta possa ser usado para localização de anormalidades na via auditiva.

1.3 Detecção objetiva de respostas

Nesse ponto, pode-se dizer que, no campo das neurociências, o teste da presença ou ausência de uma resposta evocada é uma ferramenta útil para avaliações da integridade de vias sensoriais. O problema de detecção também pode ser estudado na área do processamento de sinais: a detecção de sinais em meios ruidosos. Para uma razão sinal-ruído (SNR) favorável, o sinal de interesse pode até ser reconhecido por inspeção. Todavia, as situações práticas geralmente fornecem séries temporais com SNR criticamente baixa, o que inviabiliza técnicas subjetivas. Além disso, muitas vezes o objetivo da análise é detectar sinais desconhecidos contaminados por ruído. Portanto, a implementação de um sistema automático de detecção de respostas evocadas é um problema importante a ser abordado.

A presença ou ausência de respostas é usualmente inferida utilizando-se métodos no domínio do tempo ou da frequência. As técnicas no domínio do tempo fornecem informações acerca da morfologia da onda, atrasos e correlações temporais. Estas metodologias geralmente utilizam promediações

sincronizadas com o início do estímulo. As técnicas no domínio da frequência fazem uso da transformada de Fourier dos PEs coletados e avaliam a presença ou ausência da resposta através do monitoramento do módulo e da fase do sinal coletado na frequência do estímulo.

Nesse sentido, e especificamente em relação ao sistema auditivo, técnicas no domínio do tempo como a resposta auditiva de tronco encefálico (em inglês, *Auditory Brainstem Response* ou ABR) são amplamente empregadas em exames neuro-otológicos, no auxílio da avaliação audiométrica e para avaliação de integridade de núcleos específicos. O ABR consiste na apresentação de estímulos auditivos breves numa taxa de repetição lenta, seguida de promediação do EEG coletado em eletrodos específicos (C_z por exemplo) e posterior análise visual do PE transitório obtido. Para realizar o diagnóstico, o clínico compara as amplitudes e latências do traçado obtido com padrões de normalidade. Percebe-se que, apesar de o ABR ser um exame objetivo, dado que seu resultado independe de resposta comportamental do paciente, sua interpretação subjetiva torna-o não-automático, pois depende da capacidade do profissional clínico em identificar e relacionar os picos e latências das promediações com disfunções do sistema auditivo. Além disso, o ABR é inespecífico em frequência, sendo o PE obtido um resultado médio da passagem de potenciais de ação por várias camadas tonotópicas diferentes. Para que o ABR seja utilizado com especificidade em frequência, é necessário restringir o conteúdo harmônico do estímulo e realizar um exame para cada valor de frequência de teste. Todavia, este artifício pode demandar um tempo proibitivo, pois são necessárias algumas centenas a milhares de promediações para se obter um registro analisável e é necessário repetir a exame para cada frequência, sendo que apenas uma orelha pode ser testada por vez. Além disso, devido a mecanismos de acomodação, um tempo de exame prolongado pode alterar a forma e latência dos sinais evocados, incluindo-se, assim, uma fonte indesejável de não-estacionariedade ao exame.

Alternativamente, as ASSRs evocadas por tons AM também podem ser usadas para teste de presença de respostas evocadas. Este tipo de resposta é geralmente avaliada no domínio da frequência (Dobie e Wilson, 1993; Picton et al., 2003; Felix et al., 2005), pois a sua presença é acusada pelo aumento de energia na frequência moduladora no espectro do sinal EEG coletado. Esta característica torna este tipo de resposta mais interessante, pois o processo de detecção é realizado através da avaliação de um único valor da transformada rápida de Fourier (FFT) do registro. Essa abordagem, além de ser objetiva, conta com a vantagem de ser automática, pois pode ser implementada usando-se apenas uma operação de comparação de um valor de FFT com um limiar de presença de resposta. Além disso, pode-se diminuir o tempo de exame, apresentando simultaneamente ao indivíduo mais de um tom AM

diferente (Lins e Picton, 1995). Picton et al. (2003) citam que até quatro faixas de frequência podem ser testadas simultaneamente em cada orelha sem que haja prejuízo de desempenho, quando comparado com a análise individual de cada tom AM. Esse arranjo pode diminuir o tempo de exame em até oito vezes (quatro estímulos simultâneos em cada orelha). Uma outra vantagem é que um exame que utilize ASSRs como base de dados é específico em frequência por natureza, pois os valores de frequência portadora e moduladora são parâmetros para construção do estímulo. Todavia, uma desvantagem dessa técnica é a inespecificidade espacial, i.e. uma alteração na resposta padrão não é facilmente associada a disfunções de estruturas neurais específicas. Este fato credencia as ASSRs para serem usadas em exames audiométricos em detrimento do ABR. Neste caso, os PEs transitórios do ABR são mais indicados para observar anormalidades em pontos distintos da via auditiva primária, pois cada pico e latência é associado à passagem da resposta neural por núcleos cerebrais específicos (Moraes et al., 2000; Moraes e Garcia-Cairasco, 2001).

As ASSR, assim como o ABR, são coletados em conjunto com outras atividades elétricas, derivadas do próprio cérebro, músculos adjacentes, respiração etc. Assim, devido à baixa SNR resultante, é necessário o emprego de técnicas de detecção mais apuradas (Dobie e Wilson, 1993). A detecção objetiva de respostas (ORD, do inglês *objective response detection*) engloba um conjunto de funções matemáticas, no domínio da frequência, que oferecem mais benefícios em relação às técnicas no domínio do tempo por tratarem o problema de detecção como um teste de hipótese estatístico, implementado de forma automática em função da SNR e do número de segmentos de sinal disponível. Estas técnicas executam um teste de hipótese automático, comparando o valor do detector a um limiar estatístico que independe do tipo de sinal periódico, dependendo apenas do número de janelas usado e do nível de significância estipulado *a priori*. A implementação dos detectores ORD faz uso do janelamento dos sinais no domínio do tempo, seguido de promediação na frequência. Esta estratégia é muito útil para aumento da SNR e conseqüente melhora da performance do detector. De fato, a probabilidade de se detectar uma resposta, caso ela esteja presente, é diretamente proporcional ao número de janelas utilizadas na estimativa do detector (Miranda de Sá e Felix, 2002). Além disso, o fato de se dividir o sinal a ser analisado em janelas ajuda a lidar com eventos não-estacionários presentes nos dados. Esse artifício é utilizado tanto para as técnicas ORD quanto para distribuições tempo-frequência, como o espectrograma.

1.4 Objetivos do trabalho

1.4.1 Geral

Estudo da aplicabilidade das técnicas ORD e das ASSRs para exames audiológicos.

1.4.2 Específicos

Neste trabalho, o comportamento de técnicas ORD é estudado na detecção de ASSRs. Estas técnicas possuem parâmetros de análise que, se escolhidos erroneamente, podem levar, devido a artefatos matemáticos, a resultados não condizentes com a realidade do sistema físico medido. Portanto, um estudo dos parâmetros ótimos de análise e de aquisição de dados se faz necessário visando a obtenção de sinais que possam ser analisados sem as influências desses artefatos.

Para eliciar uma ASSR é necessário a geração de um tom AM. Para isso, algumas variáveis - portadora, moduladora, profundidade de modulação e amplitude - precisam ser estabelecidas em função da necessidade de cada teste. É importante conhecer, por exemplo, como a resposta a uma dada moduladora é influenciada pela variação das outras variáveis do estímulo, de forma que se possa ter controle sobre as interações entre essas variáveis e os substratos neurais responsáveis pela geração das ASSRs.

Os neurônios da via auditiva são organizados de forma tonotópica, em isocamadas com neurônios com mesma frequência característica. As interconexões entre os neurônios do CI parecem estar relacionadas com a capacidade "sintonização" destas unidades individuais em torno de suas respectivas BMFs com o subsequente processamento neural da informação auditiva na via auditiva primária (Joris et al., 2004). O neurotransmissor GABA está presente nestas interconexões coliculares. Entender o papel deste NT, ou a falta dele, para as ASSRs é importante para o entendimento de como este tipo de informação é processada no cérebro, além de vislumbrar um método alternativo para avaliação de alterações cerebrais, especificamente alterações em sistemas químicos, de forma não-invasiva.

1.5 Estrutura da tese

No Capítulo 2, a técnica ORD "magnitude-quadrática da coerência" foi usada para detecção de ASSRs evocadas por tons AM em ratos Wistar. Nesse capítulo, a implementação do detector foi testada com dados reais e

a ferramenta de detecção avaliada para diferentes parâmetros de análise e de estímulo. Este estudo inicial trouxe à tona o problema de espalhamento espectral e suscitou perguntas e hipóteses que são exploradas no capítulo 3.

No Capítulo 3, o problema do espalhamento na análise espectral de ASSRs foi devidamente comprovado através de simulação de Monte-Carlo e, na Seção 3.4, é proposta uma metodologia para ajuste *a priori* do sinal de estimulação com vistas à minimização do espalhamento. Todavia, para o caso de sinais que já se encontram digitalizados e não seguiram os critérios indicados na Seção 3.4, a Seção 3.5 traz um procedimento de correção do espectro *a posteriori*, de forma que mesmo dados coletados de forma sub-ótima possam ser aproveitados numa eventual análise de detecção.

No Capítulo 4, a influência dos parâmetros do estímulo na ASSR foi estudada através da apresentação de estímulo contendo a varredura linear de um dado parâmetro enquanto os outros parâmetros eram mantidos constantes. Isso permitiu quantificar as contribuições individuais de cada parâmetro do estímulo nas ASSRs bem como avaliar efeitos de histerese em função da seqüência de apresentação do estímulo.

No Capítulo 5, as ASSRs foram medidas no CI de ratos Wistar durante desativação do sistema gabaérgico neste núcleo. É importante salientar que somente a contribuição deste NT foi removida, mantendo todas as outras inter-conexões do CI intactas. Dessa forma, pôde-se medir a contribuição destas conexões intra-coliculares na capacidade de sintonização das redes neurais responsáveis pela geração das ASSRs. Além disso, esta experiência permitiu verificar o efeito, na ASSR, de uma possível deficiência do GABA endógeno, o que pode ser utilizado para diagnóstico de enfermidades associadas à disfunção deste neurotransmissor.

O Capítulo 6 apresenta uma discussão geral dos resultados, as principais conclusões do trabalho e as propostas de continuação de estudo.

Capítulo 2

Detecção objetiva de ASSRs em ratos Wistar

2.1 Considerações iniciais

Este primeiro experimento foi conduzido com o objetivo de estudar as ASSRs através do registro de um sinal diferente para cada valor de moduladora e portadora fixos e posterior detecção objetiva. Devido às suposições de que a resposta é invariante no tempo (suposição 1) e de que a atividade de fundo, por ser o somatório de várias fontes intracerebrais independentes, segue uma distribuição gaussiana (suposição 2, levando em consideração o teorema do limite central), a primeira técnica empregada neste trabalho para a visualização da resposta foi a magnitude quadrática da coerência, uma técnica ORD. Os LFPs (potenciais de campo local, *local field potential*), que são sinais bioelétricos coletados de forma invasiva, advindos do CI de ratos Wistar, foram registrados durante a estimulação auditiva por tom AM e, em seguida, aplicados ao detector objetivo. A presença ou ausência da resposta é inferida pela amplitude do detector na frequência de estimulação.

Pelo fato de a SNR ser maior na frequência de estimulação (e em seus harmônicos), técnicas desenvolvidas no domínio da frequência são mais apropriadas para a rápida detecção de respostas evocadas. Os métodos apresentados neste trabalho comparam um valor estimado com um limiar, o qual é obtido com base na distribuição amostral sob a hipótese nula (H_0) de ausência de respostas (evocadas) da estimativa. A principal vantagem de tais técnicas está no fato do detector ser bastante robusto, pois o limiar de detecção é independente tanto da forma de onda da resposta quanto da SNR. Assim, a probabilidade de se detectar erradamente uma resposta (probabilidade de alarme falso) será constante e igual ao nível de significância do teste.

Estes tipos de detectores são chamados de CFAR (de *Constant False Alarm Rate*). O objetivo deste experimento é verificar a relação das ASSRs com diferentes valores de moduladoras e portadoras nos estímulos.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Magnitude quadrática da coerência (MSC)

A coerência entre o sinal de estimulação e o sinal EEG tem sido apontada como uma das técnicas de ORD mais eficientes no EEG durante estimulação periódica (Dobie e Wilson, 1989). Neste caso, a coerência pode ser estimada considerando-se apenas o sinal EEG. Recentemente, Miranda de Sá et al. (2004) propuseram a estimativa da coerência múltipla entre a estimulação e N sinais EEG como forma de aumentar a taxa de detecção para um número fixo de segmentos usados na promediação. As técnicas ORD podem fornecer dados audiométricos importantes quando aplicadas às ASSRs, desde que a frequência de teste (moduladora) seja fixa durante o exame (Picton et al., 2001). A aplicação destas técnicas de processamento de sinais fornecem informações audiométricas num intervalo de tempo curto (se comparado com técnicas no domínio do tempo, como as ABRs) e sem a necessidade de resposta comportamental do paciente.

A estimativa da coerência entre dois sinais aleatórios, de duração finita e discretos no tempo, $x[n]$ e $y[n]$, relacionados de acordo com um sistema univariável, pode ser obtida dividindo-se os sinais em M segmentos (Bendat e Piersol, 1986; Miranda de Sá e Infantosi, 2002),

$$\hat{\gamma}_{xy}^2(f) = \frac{\left| \sum_{i=1}^M X_i^*(f) Y_i(f) \right|^2}{\sum_{i=1}^M |X_i(f)|^2 \sum_{i=1}^M |Y_i(f)|^2}, \quad (2.1)$$

onde $X_i(f)$ e $Y_i(f)$ são as transformadas de Fourier das i -ésimas janelas (segmentos) e M é o número de janelas utilizado na estimação.

Para o caso particular onde $x[n]$ é um sinal determinístico e periódico, $X_i(f)$ tem o mesmo valor em cada janela utilizada na promediação, ou seja, $X_i(f) = X(f)$, levando às seguintes simplificações:

$$\hat{\gamma}_{xy}^2(f) = \frac{\left| \sum_{i=1}^M X_i^*(f) Y_i(f) \right|^2}{\sum_{i=1}^M |X_i(f)|^2 \sum_{i=1}^M |Y_i(f)|^2} = \frac{|X(f)|^2 \left| \sum_{i=1}^M Y_i(f) \right|^2}{M |X(f)|^2 \sum_{i=1}^M |Y_i(f)|^2} = \frac{\left| \sum_{i=1}^M Y_i(f) \right|^2}{M \sum_{i=1}^M |Y_i(f)|^2}. \quad (2.2)$$

Para distinguir da Eq.(2.1), a coerência entre um sinal aleatório e um sinal determinístico será denotada por $\hat{\kappa}_y^2(f)$. Dessa forma, a eq. (2.2) será escrita como:

$$\hat{\kappa}_y^2(f) = \frac{\left| \sum_{i=1}^M Y_i(f) \right|^2}{M \sum_{i=1}^M |Y_i(f)|^2}. \quad (2.3)$$

Assim, a coerência entre um sinal determinístico que se repete em intervalos regulares de tempo, e um sinal aleatório, pode ser estimada utilizando-se a eq. (2.3), desde que o sinal, neste caso $x[n]$, apresente o mesmo formato em todas as janelas, de modo que sua transformada de Fourier tenha sempre o mesmo valor $X(f)$ nas M janelas (Miranda de Sá, 2000, p. 18). Na aplicação ao EEG, $\hat{\kappa}_y^2(f)$ pode ser utilizado como um potencial detector de respostas a estímulos, desde que se garanta que o estímulo seja sempre o mesmo e a janela esteja sincronizada com ele.

Para uma análise quantitativa de respostas do EEG, é interessante obter os valores para os quais se pode dizer que não há resposta detectada (limiar estatístico), bem como o poder de detecção do detector empregado. Com este objetivo, a distribuição amostral sob ausência de componente periódica (hipótese H0) precisa ser obtida para obtenção dos valores críticos. Para o cálculo da probabilidade de detecção dos detectores, a distribuição amostral sob a hipótese alternativa de presença de resposta (H1) deve ser necessariamente obtida.

Para a hipótese nula (H0) de ausência de respostas, i.e. coerência zero entre $x[n]$ e $y[n]$, considerando $y[n]$ com distribuição gaussiana, a distribuição amostral de $\hat{\kappa}_y^2(f)$ é dada por (Miranda de Sá et al., 2002)

$$(M-1) \frac{\hat{\kappa}_y^2(f)}{1 - \hat{\kappa}_y^2(f)} \sim F_{2,2(M-1)}, \quad (2.4)$$

onde \sim denota "é distribuído segundo"; $F_{2,2(M-1)}$ é a distribuição F de Fisher

com 2 e $2(M - 1)$ graus de liberdade (Kay, 1998, p. 29). A partir da Eq. (2.4), valores críticos, os quais constituem limiares para a detecção objetiva, podem ser prontamente obtidos como:

$$\hat{\kappa}_{y_{crit}} = \frac{F_{\text{crit}\alpha,2,2(M-1)}}{M - 1 + F_{\text{crit}\alpha,2,2(M-1)}}, \quad (2.5)$$

onde $F_{\text{crit}\alpha,2,2(M-1)}$ é o valor crítico da distribuição F na Eq. (2.4) para um nível de significância α .

2.2.2 Estímulo auditivo

Cada estímulo consistiu de um tom senoidal puro modulado em amplitude. De acordo com John et al. (1998), os estímulos foram criados multiplicando-se duas senóides: uma portadora e uma moduladora. A senóide de alta frequência (f_c) é a portadora enquanto a de baixa frequência (f_m) é a moduladora. Este tipo de sinal pode ser escrito, para uma profundidade de modulação λ e amplitude máxima A , segundo:

$$x[t] = A \cdot \text{sen}(2\pi f_c t) \cdot (\lambda \cdot \text{sen}(2\pi f_m t) + 1)/(1 + \lambda) \quad (2.6)$$

Os estímulos foram gerados digitalmente, utilizando o Matlab@R13, com uma frequência de amostragem de 44100 Hz, limitando o tempo de estímulo em 1 minuto. Para testar o efeito de diferentes moduladoras, um tom de 4 kHz foi fixado como portadora e as moduladoras foram variadas de acordo com a Tabela 2.1 (para prevenir o espalhamento espectral, John et al. (1998) sugerem que a frequência da onda moduladora deve ser corrigida para que a modulante tenha um número inteiro de ciclos na janela de análise espectral). O efeito de diferentes portadoras foi avaliado fixando-se a moduladora em 105 Hz (corrigido para 102,54 Hz) e variando-se as portadoras de 500 a 8000 Hz.

Pode-se, então, dividir o experimento em dois protocolos: variação das moduladoras e variação das portadoras. As formas de onda foram convertidas em formato WAV (44,1 kHz;16 bits) e gravadas em CD em formato áudio. Cada estímulo acústico foi apresentado aos animais durante 1 minuto (*tweeter* Sellenium T-40; 88 dB SPL) na orelha contra-lateral ao hemisfério de registro da atividade bioelétrica.

Tabela 2.1: (A): Freqüências de teste originais. (B): Correção para número inteiro de oscilações na janela de análise. A freqüência de amostragem do LFP e o tamanho da janela considerados foram 1 kHz e 1024 pontos, respectivamente.

(A) Moduladora (Hz)	(B) Correção usando n° inteiro de oscilações mais próximo
70	68,36
75	73,24
80	78,13
85	83,01
90	87,89
95	92,77
100	97,66
105	102,54
110	107,42
115	112,31

2.2.3 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos ($n = 5$) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO), todos pesando entre 250-300 g. Os animais foram distribuídos em grupos de cinco ou seis por gaiola, com água e comida *ad libitum*, submetidos a um ciclo fisiológico de 10/14 horas claro/escuro controlado a temperatura de $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ$. Cuidados foram sempre tomados em relação ao manuseio dos animais durante os experimentos e buscou-se, de todos os meios disponíveis, evitar sofrimento desnecessário dos mesmos, bem como minimizar o número de animais utilizados. Todos os protocolos estão de acordo com a *Brazilian Society for Neuroscience and Behavior Guidelines for Animal Experimentation*.

2.2.4 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uretana (140mg/100 g i.p.), submetidos à tricotomia do escalpo, receberam uma injeção subcutânea de anestésico local (cloridrato de lidocaína a 3% + norepinefrina 1 : 50000) e foram posicionados em um aparelho de estereotaxia com fixação por meio de barras auriculares. Uma das barras usadas é perfurada longitudinalmente de ponta a ponta para conduzir o estímulo sonoro. As coordenadas do lâmbda (ver

Fig. 2.1) foram anotadas e então o acesso cirúrgico feito por uma trepanação para passagem de eletrodo. A partir daí, o eletrodo foi introduzido até o núcleo central do colículo inferior (AP: +2,3 mm; MM: -1,4 mm; DV: -4,6 mm) usando coordenada esterotáxicas de acordo com Paxinos e Watson (1998). A temperatura retal do animal durante todo o procedimento cirúrgico e de registro era periodicamente avaliada e mantida em 37°C por meio de uma bolsa térmica. Os registros foram realizados no interior de uma gaiola de Faraday com atenuação acústica.

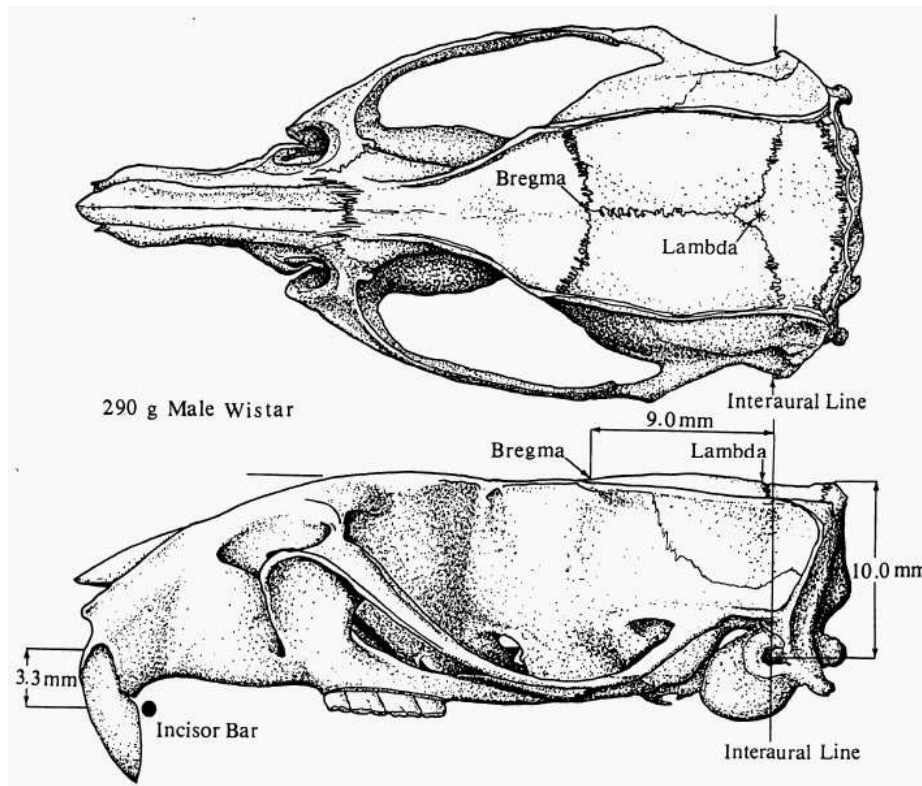


Figura 2.1: Vistas dorsal e lateral do crânio de um rato Wistar de 290 g. As posições do bregma e do lambda são mostradas. (Adaptado de Paxinos, G. e Watson, C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 1998).

2.2.5 Aquisição de dados

O sinal bioelétrico foi coletado com eletrodo em configuração bipolar (referência no músculo temporal) por um pré-amplificador (AI 401 x10 Amplifier, Axon Instruments). Durante os registros, o sinal foi filtrado na banda

de $30Hz - 300Hz$, com amplificação total de 5000 vezes e digitalizado a uma frequência de amostragem de 1 kHz com resolução de 12 bits (NIDAQ 6023-E, National Instruments). A aquisição dos sinais foi realizada durante um minuto por um programa desenvolvido no Núcleo de Neurociências, em linguagem C++. Os dados foram estocados em disco rígido para análises posteriores. O uso de cobaias nesse tipo de experimento é interessante devido a alta SNR das respostas no LFP.

Em seguida, o detector $\hat{\kappa}_y^2(f)$ e o valor crítico associado foram obtidos segundo as eqs. (2.3) e (2.5), respectivamente.

2.3 Resultados

Casos típicos de detecção usando $\hat{\kappa}_y^2(f)$ são mostrados na Fig. 2.2. Para confirmar a natureza estritamente bioelétrica das respostas evocadas, o resultado da detecção em LFP coletado durante oclusão total do tubo que conecta o *tweeter* a barra estereotáxica é mostrado na Fig. 2.2A durante estimulação igual a da Fig. 2.2B. Note que na Fig. 2.2A, o pico observado em 2.2B desaparece. Figs. 2.2C e 2.2D são exemplos de $\hat{\kappa}_y^2(f)$ para variações de portadora e moduladora do estímulo de 2.2B.

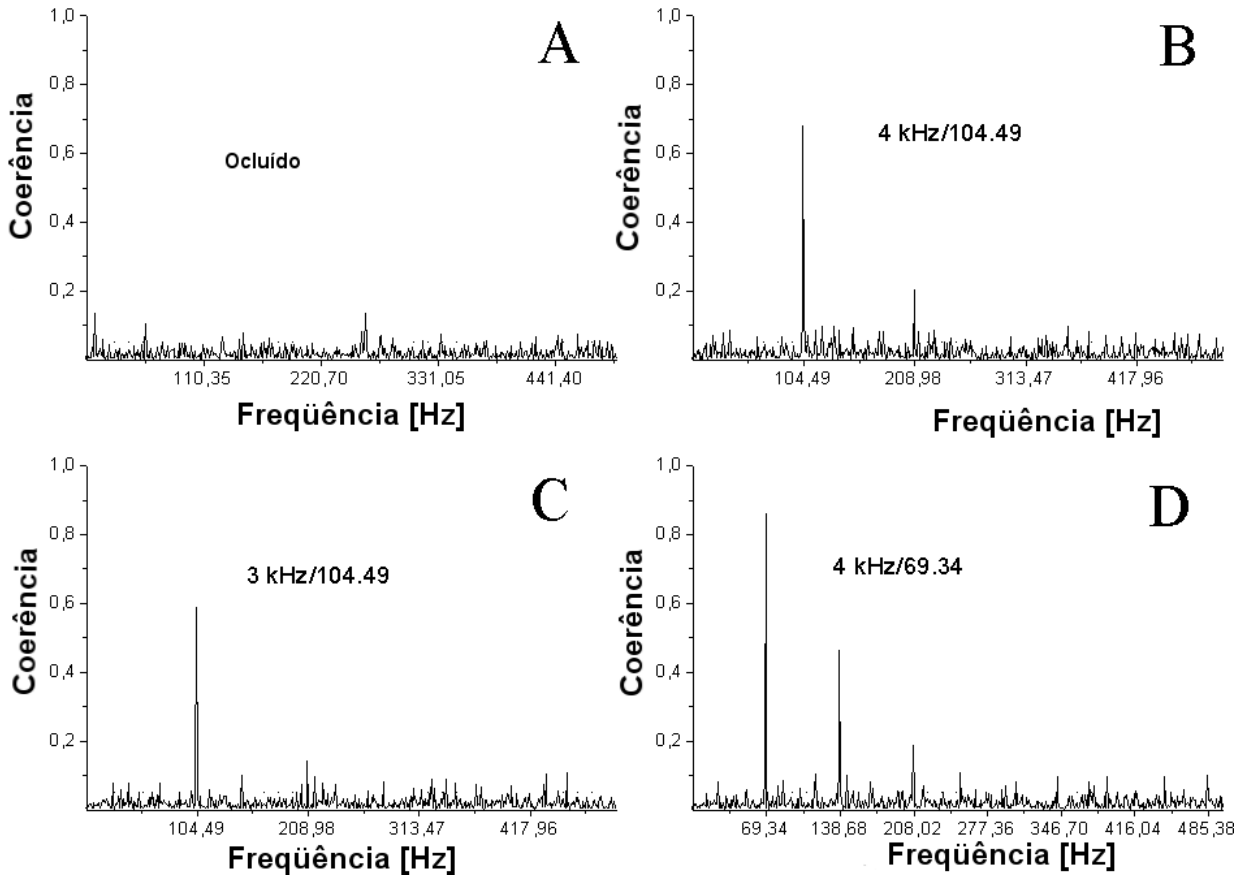


Figura 2.2: Funções $\hat{\kappa}_y^2(f)$ obtidas de registro típico de LFP de rato Wistar (A) $\hat{\kappa}_y^2(f)$ do LFP registrado com a oclusão do tubo que conecta a barra estereotáxica perfurada durante estimulação de 4 kHz modulada em 104,49 Hz. (B) $\hat{\kappa}_y^2(f)$ do LFP registrado durante estimulação de 4 kHz modulada em 104,49 Hz. (C) $\hat{\kappa}_y^2(f)$ do LFP registrado durante estimulação de 3 kHz modulada em 104,49 Hz. (D) $\hat{\kappa}_y^2(f)$ do LFP registrado durante estimulação de 4 kHz modulada em 69,34 Hz. O valor crítico associado a cada detecção é mostrado em linhas pontilhadas.

Os resultados deste experimento para todos os animais são mostrados nas Figs. 2.3 e 2.4. A Fig. 2.3A mostra os valores $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da moduladora utilizada no estímulo (portadora fixa em 4 kHz). Na Fig. 2.4A, $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ (valor do detector na frequência de teste 105 Hz) é mostrado como função da portadora utilizada no estímulo. As amplitudes das ASSRs em μV (os coeficientes de Fourier na frequência de modulação) são mostradas nas Figs. 2.3B e 2.4B para permitir a comparação com os valores da coerência.

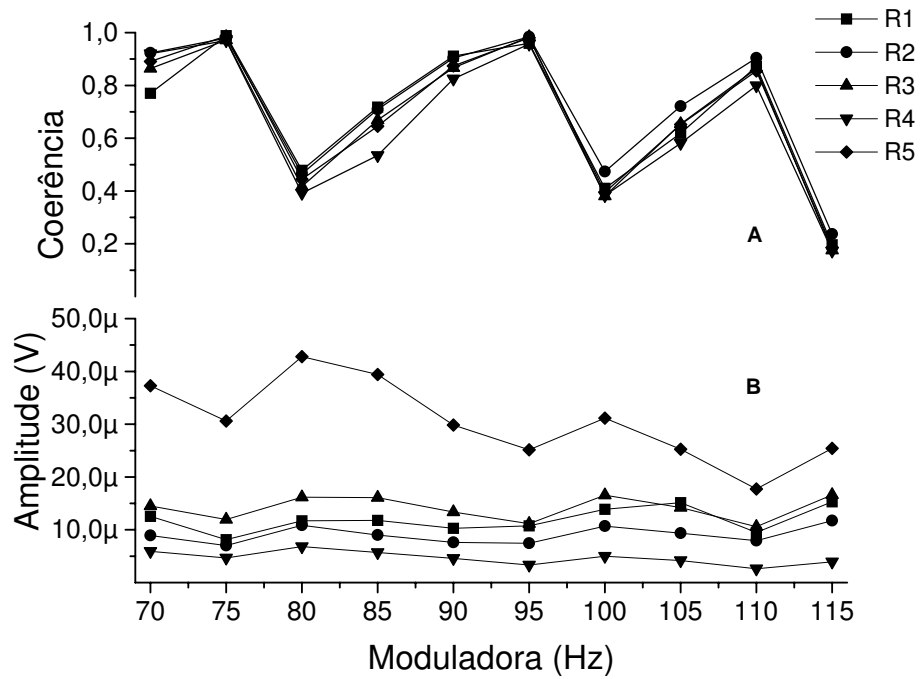


Figura 2.3: (A) $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência moduladora do estímulo para todos os animais do estudo (portadora fixa de 4 kHz e correção da moduladora para o número inteiro de ciclos mais próximo na janela). (B) Amplitude das respostas evocadas em μV na frequência moduladora. Todos os valores são estatisticamente significativos. O tamanho da janela foi 1024 pontos.

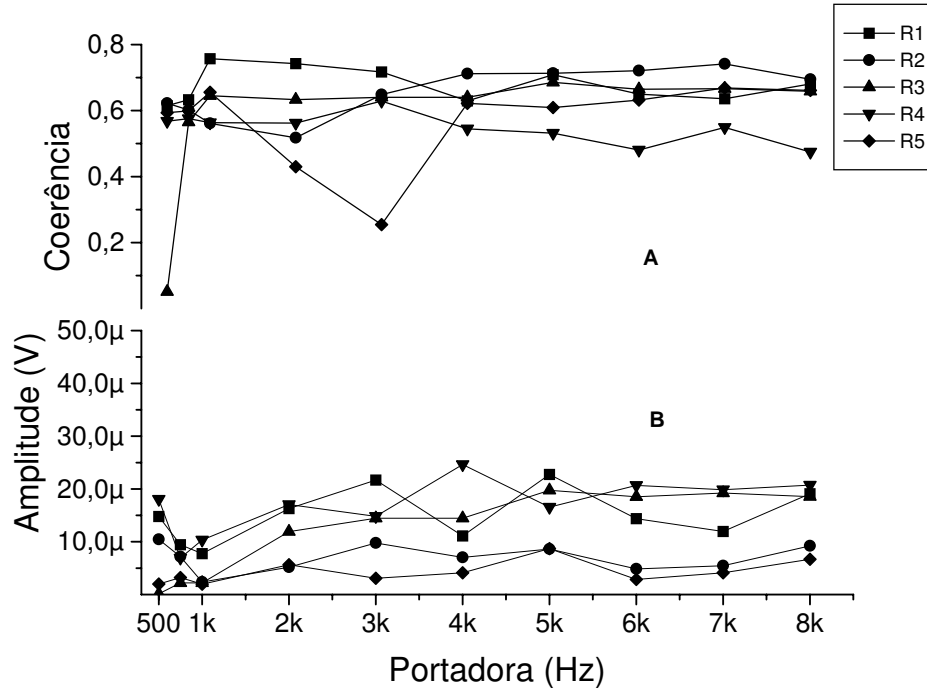


Figura 2.4: (A) $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência portadora do estímulo para todos os animais do estudo (moduladora fixa em 102,54 Hz). (B) Amplitude das respostas evocadas em μV na frequência moduladora. Todos os valores são estatisticamente significativos. O tamanho da janela foi 1024 pontos.

2.4 Discussão

As Figs. 2.4A e B mostram que os animais tem ASSRs no CI praticamente de mesma intensidade desde 500 a 8000 Hz. De fato, tanto $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ quanto a amplitude em μV mostraram um comportamento parecido para os diferentes valores de portadora. Este é um resultado esperado, dado que os ratos Wistar possuem uma faixa auditiva ampla (60-60000 Hz) e a faixa de frequências testadas foi relativamente pequena.

Esperava-se que a resposta evocada por uma portadora qualquer tivesse a mesma intensidade independentemente da sua frequência de modulação. Isso faz sentido, pois a mesma região da membrana basilar foi excitada durante todo o experimento e o eletrodo esteve sempre no mesmo ponto do CI durante os registros. Todavia, os resultados encontrados na Fig. 2.3A (painel superior) demonstraram acentuadas diferenças na detecção destas respostas em função moduladora usada, e.g. até 5 vezes entre as moduladoras de 73,24

Hz e 112,31 Hz no rato 1. Sob essa ótica, é possível concluir que o padrão da ASSRs mudaria com a mudança da moduladora. Dessa forma, o estudo dos mecanismos neurais das respostas evocadas, bem como exames clínicos em humanos, deveriam levar em consideração a moduladora usada para evocar a ASSR, dado que estas não seriam independentes da moduladora utilizada, i.e. os circuitos neurais recrutados por moduladoras diferentes seriam bastante diferentes.

A Fig. 2.3B mostra as amplitudes em μV da componente da ASSR na frequência da moduladora, ou seja, a FFT do sinal. Este resultado está de acordo com o esperado e mostra o mesmo padrão da Fig. 2.4. A diferença entre estas estimativas se situa no sub-janelamento usado na detecção objetiva (Fig. 2.3A); artifício este não utilizado na FFT pura dos sinais. Isto pode indicar que o janelamento pode ser uma fonte extra de artefatos, mesmo seguindo as orientações comuns na literatura para prevenção do espalhamento espectral (Stapells et al., 1987; Dobie e Wilson, 1989; Lins e Picton, 1995; Picton et al., 2001, 2003), para citar apenas alguns trabalhos.

Então, à luz dos resultados apresentados, concluir-se-ia, erradamente, que ASSRs medidas no CI são dependentes da moduladora usada, fato este que indicaria um processamento auditivo moduladora-dependente. Esta conclusão contraria a literatura citada no parágrafo anterior, sendo então suscitante de questionamentos extras acerca de sua abrangência.

Este estudo inicial motivou as seguintes perguntas: O janelamento, mesmo com a correção da frequência moduladora dos sinais pelo inteiro mais próximo, pode ser uma fonte de artefatos matemáticos para as técnicas ORD? Qual a maneira mais correta para correção de frequência *a priori* para extinguir o espalhamento? Mesmo se os dados forem coletados sem o devido ajuste seria possível usar um procedimento posterior para a correção do espectro e conseqüente ajuste do valor dos detectores? As duas primeiras perguntas serão respondidas na seção 3.4 enquanto a última questão será abordada na seção 3.5.

O uso da FFT com uma única janela sempre seria uma opção. Todavia, a FFT não possui um teste estatístico automático como a coerência das eqs. (2.3) e (2.5), necessitando de testes posteriores, além de sofrer mais com a não-estacionariedade dos dados.

Capítulo 3

Lidando com o espalhamento espectral

Em função da discussão apresentada na seção 2.4, neste capítulo, testar-se-á a hipótese do resultado obtido na Fig. 2.3 ser causado por artefato matemático de processamento de sinais.

3.1 Considerações iniciais

Conjuntamente com as melhorias obtidas pela ORD devido ao janelamento, um fato novo precisa ser, então, considerado: o espalhamento espectral (em inglês: *spectral leakage*). Este artefato matemático significa um vazamento de energia de uma banda de frequência para as adjacências, resultando numa distorção do espectro. O janelamento inadequado causa o espalhamento. O espalhamento pode ser minimizado através de janelamentos especiais aplicados aos dados, e.g. janelas Hanning, Kaiser etc. Todavia, a eficácia deste método é relacionada com o tipo de sinal, diminuindo-se a generalidade da ferramenta. Este fato é crucial para as medidas de ASSR, pois, para uma inferência correta sobre a amplitude e atraso da resposta evocada, é preciso garantir uma estimativa de espectro livre de artefatos matemáticos. Dessa forma, surgem as seguintes perguntas:

- Como ajustar, *a priori*, os parâmetros de registro e análise de sinais de forma a minimizar o espalhamento?
- Seria possível corrigir o espectro *a posteriori*, de forma a minimizar o espalhamento do módulo e da fase da FFT, além de ajustar os valores do vetor de frequências, em função dos parâmetros de análise (tamanho e tipo da janela)?

3.2 Espalhamento espectral

Em face dos questionamentos da seção 3.1, um estudo mais aprofundado do espalhamento espectral em técnicas de detecção se faz necessário. O espalhamento espectral que resulta dos algoritmos de processamento de sinal é um importante fator que pode influenciar a estimativa de técnicas ORD. A utilização da FFT para análise espectral de sinais é limitada pela resolução em frequência da ferramenta e pela SNR de sinais de interesse em presença de altos níveis de ruído. A primeira limitação leva ao fato que a FFT somente pode ser calculada para valores discretos de frequência (*FFT bins*).

O espectro teórico de uma onda senoidal pura é um delta de Dirac localizada em \pm a frequência do seno. Entretanto, quando se calcula o espectro de um sinal senoidal finito via FFT, o espectro, geralmente, mostrará um adicional conjunto de raias, que se espalham em torno da frequência fundamental. O espalhamento significa que a energia do sinal que deveria ser confinada a somente uma raia do espectro, em vez disso se divide por todo o espectro. Esta divisão da energia do sinal é chamado de espalhamento espectral.

A análise por FFT assume que o sinal é continuamente amostrado de $-\infty$ até $+\infty$. Na prática, temos uma amostra limitada do processo em questão e um procedimento comum é a utilização de janelamento posterior; conseqüentemente, os sinais janelados podem sofrer descontinuidades no seu final de registro e o espalhamento será maior quanto mais brusca for esta descontinuidade. É possível "projetar" sinais que não apresentam descontinuidades no fim ou início do janelamento, através do ajuste do número de ciclos do sinal de teste para que este seja inteiro e que não haja variações bruscas de janela para janela.

3.3 Amostragem sincronizada (*Coherent Sampling*)

Uma forma alternativa de se minimizar o espalhamento espectral é a utilização do amostragem sincronizada, *coherent sampling* (CS), o qual impõe restrições à análise/aquisição do sinal para minimizar o espalhamento na análise espectral janelada (Xi e Chicaro, 1996). Em relação ao CS, existem dois aspectos de sincronização que precisam ser considerados:

- A janela de análise deve cobrir um número inteiro (L) de oscilações do sinal, onde cada ciclo tem período T_0 . Posto isso, o tamanho da janela precisa ser LT_0 .

- O tamanho da janela deve ser um múltiplo inteiro do período de amostragem (T_s).

Em outras palavras, a seguinte condição deve ser satisfeita para garantir uma amostragem sincronizada e conseqüente minimização do espalhamento:

$$\frac{f_s}{f_0} = \frac{N}{L}, \quad (3.1)$$

onde N é o número de pontos em cada janela, enquanto f_s e f_0 são as freqüências de amostragem e fundamental do sinal, respectivamente.

Note que a eq. (3.1) mostra que o espalhamento espectral é minimizado escolhendo-se um tamanho de janela que comporte exatamente um número inteiro de oscilações do sinal. Inclusive, este é um método utilizado por vários autores (Aoyagi et al., 1993; Rickards et al., 1994; John et al., 1998; Dimitrijevic et al., 2002; Picton et al., 2003). Todavia, o ajuste da freqüência para comportar um número primo de oscilações é relatado como útil em Nunzi et al. (2003) e considerado indispensável, num critério de extinção do espalhamento, em Aude (1997).

3.4 Ajuste *a priori* da freqüência de modulação em função dos parâmetros da análise espectral

Combinando a discussão da seção 2.4 com as informações das seções 3.2 e 3.3, nesta seção se testará a hipótese de o artefato matemático de espalhamento poder ser diminuído ajustando-se *a priori* a freqüência de modulação do estímulo para que um número inteiro e primo de oscilações da moduladora aconteça dentro da janela temporal usada na análise espectral. A análise espectral de ASSRs pode se beneficiar deste procedimento, principalmente para a ORD. Nesse sentido, simulações de Monte-Carlo foram implementadas para avaliação do efeito corretivo dos números inteiro e primo de oscilações. Em seguida, para validação da metodologia, as ASSRs coletadas no CI de ratos Wistar foram submetidas a análise através da função da magnitude quadrática da coerência (eqs. (2.3) e (2.5)).

3.4.1 Estudos de simulação

Para verificar o efeito do espalhamento na estimativa da coerência $\hat{\kappa}_y^2(f)$, simulações de Monte Carlo foram implementadas para diferentes valores de

freqüências moduladoras (ver Tabela 3.1) e diferentes tamanhos de janela (1024, 2048, 4096; janelas retangulares), para cada método de correção.

Cada sinal simulado foi criado adicionando-se uma senóide (amplitude 0,1) a um ruído branco gaussiano (média zero e desvio padrão 1). Assim, a população das simulações foram constituídas por 1000 sinais simulados de cada freqüência de teste. Em seguida, a coerência foi estimada para cada sinal (de acordo com a eq. 2.3) e o valor médio do detector em cada freqüência foi obtido. O número de janelas usado na estimativa do detector foi 60.

Tabela 3.1: (A): Freqüências de teste originais. (B): Correção das freqüências de teste pelo critério de CS (número primo). (C): Correção para número inteiro de oscilações na janela de análise. A freqüência de amostragem e o tamanho da janela considerados foram 1 kHz e 1024 pontos, respectivamente.

(A) Moduladora (Hz)	(B) Correção usando CS (n^o primo de oscilações mais próximo)	(C) Correção usando n^o inteiro de oscilações mais próximo
70	69,34	68,36
75	77,15	73,24
80	81,06	78,13
85	86,91	83,01
90	90,82	87,89
95	94,73	92,77
100	100,59	97,66
105	104,49	102,54
110	110,35	107,42
115	114,26	112,31

O resultado das simulações é mostrado na Fig. 3.1. Na Fig. 3.1A é mostrado o valor da coerência na freqüência de teste, $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$, corrigido de acordo com o inteiro mais próximo enquanto os valores de coerência advindos dos sinais com protocolo de correção segundo o primo mais próximo é mostrado na Fig. 3.1B. Nota-se uma oscilação sistemática nos valores de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ na Fig. 3.1A para as diferentes freqüências de teste (corrigidas de acordo com o inteiro mais próximo), independente do tamanho de janela usada na estimativa de $\hat{\kappa}_y^2(f)$. Entretanto, estas oscilações não ocorreram para a correção segundo o CS (Fig. 3.1B).

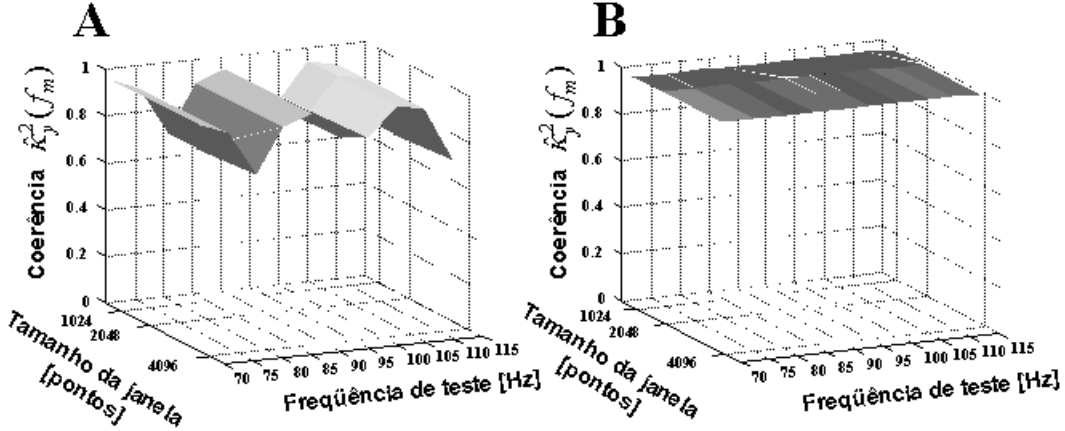


Figura 3.1: Valores de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função de diferentes tamanhos de janelas e frequências moduladoras. (A) Correção da moduladora para um número inteiro de ciclos mais próximo em cada janela. (B) Correção da moduladora para um número primo de ciclos mais próximo em cada janela. Em ambos casos, $M60$. Os valores mostrados nos valores intermediários de tamanho da janela (1024, 2048 e 4096) e frequência de teste são interpolações lineares dos resultados de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ usadas para traçar as superfícies.

3.4.2 Aplicação ao LFP de ratos Wistar

Objetivando comparar as técnicas com dados reais, os métodos de correção *a priori* das frequências de teste foram utilizados no ajuste da frequência de modulação de tons AM. Estes sons foram empregados como estímulo auditivo para evocação de ASSRs em ratos wistar (correção pelo inteiro: $n = 5$ animais; correção pelo primo: $n = 5$ animais) e posterior detecção via $\hat{\kappa}_y^2(f)$. O detector $\hat{\kappa}_y^2(f)$ e o valor crítico associado foram estimados segundo as eqs. (2.3) e (2.5), respectivamente.

3.4.3 Procedimentos experimentais

A geração dos estímulos seguiu os moldes da seção 2.2.2 usando as frequências da tabela 3.1. A aquisição dos dados, os cuidados com os animais e o procedimento cirúrgico seguiram foram os mesmos das seções 2.2.5, 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente.

3.4.4 Resultados da aplicação ao LFP

Os resultados para todos os animais são mostrados nas Figs. 3.2 e 3.3. Nas Figs. 3.2A e 3.3A as moduladoras foram corrigidas de acordo com o inteiro mais próximo enquanto que nas Figs. 3.2B 3.3B a correção usada seguiu o CS, conforme tabela 3.1. A Fig. 3.2 mostra os valores $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da moduladora utilizada no estímulo (portadora fixa em 4 kHz). Na Fig. 3.3, $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ (valor do detector na frequência de teste 105 Hz) é mostrado como função da portadora utilizada no estímulo. É interessante comparar o resultado mostrado na Fig. 3.2 com o da Fig. 3.1. O efeito oscilatório observado na simulação, em função do método de correção usado (ver tabela 3.1), é análogo ao encontrado nas detecções objetivas no LFP. As amplitudes das ASSRs em μV (os coeficientes de Fourier na frequência de modulação) são descritas nas Figs. 3.2C e 3.3C para permitir a comparação com os valores da coerência.

3.4.5 Discussão

A relação entre diferentes portadoras/moduladoras de um estímulo e o valor correspondente da magnitude quadrática da coerência $\hat{\kappa}_y^2(f)$ de ASSRs registradas no CI de ratos Wistar, foi estudada. Devido à robustez do método (i.e. pode ser aplicado na detecção de todo o sinal periódico, independentemente de seu conteúdo espectral) e da estatística de detecção bem definida (Miranda de Sá e Infantosi, 2002), a função de coerência é uma ferramenta valiosa para a detecção ASSRs evocadas por tons AM.

De acordo com a Fig. 3.2A, pode-se afirmar que os ajustes das frequências moduladoras para contemplar um número inteiro de ciclos na janela de análise (ver tabela 3.1C) não impediram as oscilações devido ao espalhamento espectral (comparar com a Fig. 3.1A). Entretanto, a correção de acordo com o critério de amostragem sincronizada, CS, usando o número primo mais próximo dos ciclos das frequências moduladoras mostrou ser uma maneira eficiente de evitar os desvios devido a estes artefatos matemáticos (Fig. 3.2B). Além disso, como visto, comparando-se com a simulação de Monte Carlo (Fig. 3.1), a discrepância nos valores da coerência devido às mudanças na frequência moduladora (Fig. 3.2) não é de natureza biológica, mas, sim, causada por um artefato matemático. Observando a acordância entre os dados simulados (Fig. 3.1) com dados experimentais (o Fig. 3.2), sugere-se que a simulação proposta é apropriada para o teste de algoritmos computacionais usados para estimar a coerência.

O caso típico descrito na Fig. 2.2 está de acordo com as simulações de Monte Carlo e com o modelo coclear proposto em Lins e Picton (1995)

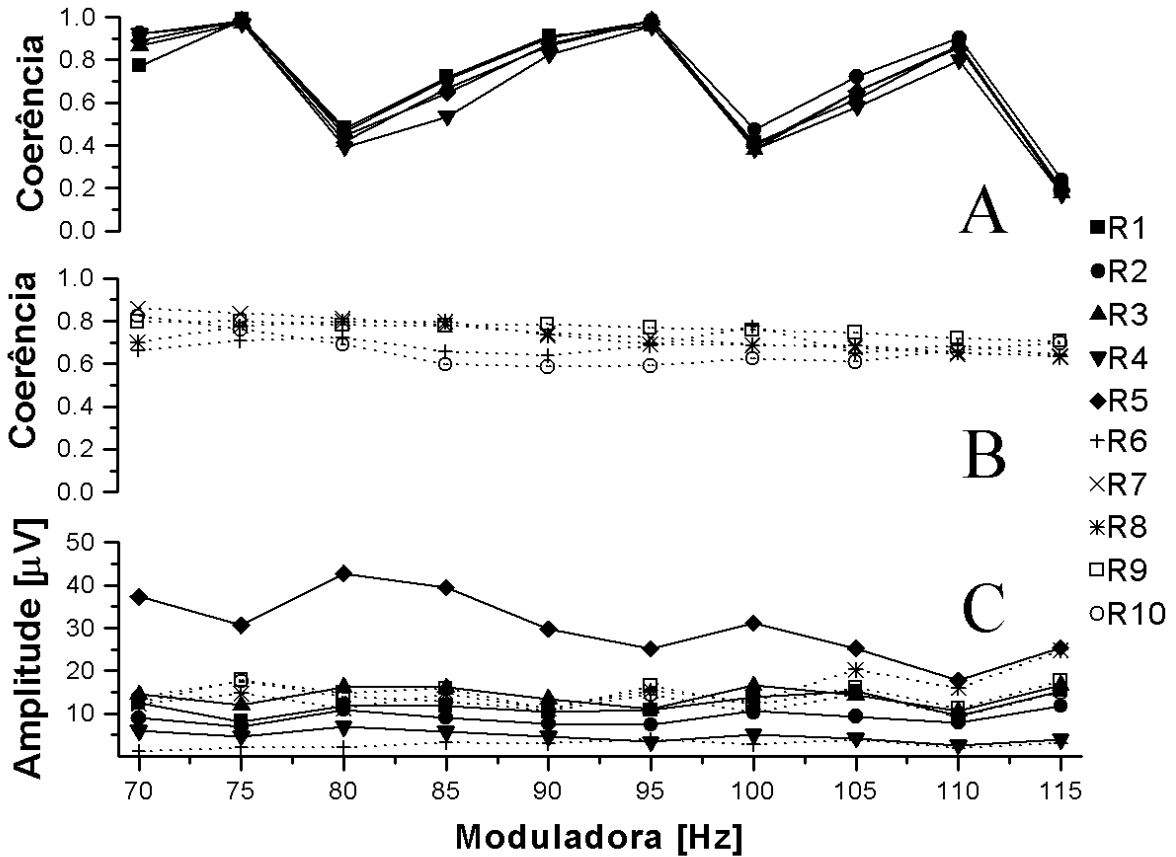


Figura 3.2: $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência moduladora para todos os animais do estudo (portadora fixa de 4 kHz). (A) Correção da moduladora para o número inteiro de ciclos mais próximo na janela. (B) Correção da moduladora para o número primo de ciclos mais próximo na janela. Em ambos os casos, o tamanho da janela foi 1024 pontos. (C) Amplitude das respostas evocadas em μV na frequência moduladora.

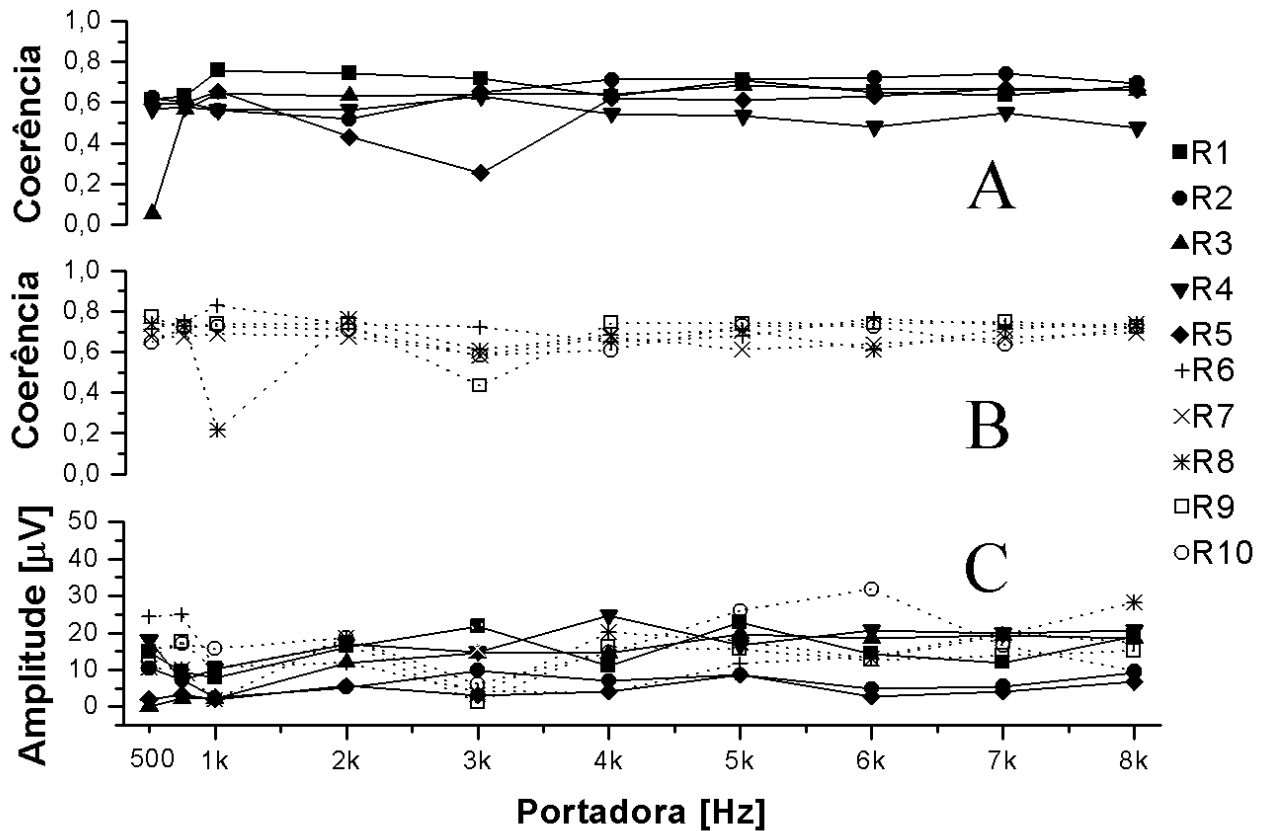


Figura 3.3: $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência portadora para todos os animais do estudo (moduladora fixa em 105 Hz). (A) Correção da moduladora para o número inteiro de ciclos mais próximo na janela ($f_m = 102, 54$). (B) Correção da moduladora para o número primo de ciclos mais próximo na janela ($f_m = 104, 49$). Em ambos os casos, o tamanho da janela foi 1024 pontos. (C) Amplitude das respostas evocadas em μV na frequência moduladora.

e em John et al. (1998). O fato de que a manobra de oclusão (Fig. 2.2A) compromete a detecção da resposta (Fig. 2.2B) com o som sendo reproduzido no *tweeter*, indica que não há nenhum artefato eletromagnético significativo contaminando o registro da atividade bioelétrica. Além disso, os resultados da manobra da oclusão indicam que um aumento gradual nos valores da coerência deve ser esperado se o nível de pressão sonora do estímulo for aumentado gradativamente.

Há uma tendência descendente dos valores de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ observados na Fig. 3.2, que não é evidente na Fig. 3.3 ($\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da portadora). Este efeito poderia ser a consequência da acomodação de uma rede neural que está sendo estimulada continuamente no tempo, pois os estímulos foram apresentados seqüencialmente, variando-se a moduladora do valor mais baixo até o mais alto. Alternativamente, no caso de diferentes portadoras (Fig. 3.3), camadas tonotópicas diferentes do CI (Steibler e Ehret, 1985) são recrutadas em cada estímulo, evocando, assim, diferentes processamentos neurais; o que, então, minimiza o efeito de acomodação. Adicionalmente, esta tendência em $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ é um indicativo de que o valor deste detector pode quantificar corretamente o nível de uma ASSRs.

Quando a frequência moduladora foi alterada (Fig. 2.2D), $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ apresentou picos nos harmônicos superiores da frequência moduladora (comparar com a Fig. 2.2B). Entretanto, este fenômeno de distorção foi menor quando uma portadora diferente foi usada, como visto na Fig. 2.2C, podendo representar a inserção de não-linearidades no sinal registrado no CI. Todavia, estudos adicionais são necessários para investigar os possíveis substratos neurais responsáveis pelas mudanças em $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$.

As discussões e os resultados mostrados nesta seção foram publicados em Felix et al. (2005) e o artigo completo encontra-se em anexo.

3.5 Ajuste *a posteriori* do espectro em função dos parâmetros da análise e de aquisição de dados

Os estudos da seção anterior mostraram que a escolha dos parâmetros de aquisição/análise de sinais é etapa crucial na detecção de respostas evocadas em regime permanente em meio ruidoso. Através da correta escolha *a priori* dos parâmetros - a saber: frequência de amostragem, frequência de estimulação ou tamanho da janela - pode-se evitar o espalhamento espectral.

Para sinais que foram coletados sem os cuidados mencionados na seção 3.2, porém tenham a frequência de interesse conhecida, existem possibilida-

des alternativas de minimização do espalhamento espectral: 1) escolha de um tamanho de janela adequado para análise ou 2) ajuste da frequência de amostragem, através de interpolação, de forma que se garanta exatamente um número primo de oscilações da frequência de interesse. O primeiro procedimento pode levar à utilização de uma janela espectral com número de pontos que não seja potência de dois. Isso levaria ao inconveniente uso da transformada discreta de Fourier (DFT) ao invés da FFT, o que aumentaria consideravelmente a complexidade computacional da análise [$O(n \log n)$ para a FFT e $O(n^2)$ para a DFT]. A alternativa 2 foi testada através de simulação de Monte Carlo. A simulação da seção 3.4.1 foi repetida para sinais interpolados com frequências de amostragem corrigidas de acordo com o número primo de oscilações mais próximo (ver tabela 3.2) e o resultado é mostrado na Fig. 3.4. Nota-se que o espalhamento foi extinguido, *a posteriori*, tal qual obtido através de ajuste da frequência de teste do sinal (ver Fig. 3.1). Este método possui a desvantagem de alterar o sinal original, através de algum método de interpolação. No resultado da Fig. 3.4 foi usada interpolação linear, procedimento este que altera o sinal. Portanto, procedimentos que não alterem o registro original necessitam ser testados.

Tabela 3.2: (A) Frequências de teste corrigidas de acordo com o número inteiro de oscilações próximo. (B) Correção das frequências de amostragem, *a posteriori*, pelo critério de CS (número primo). A frequência de amostragem original foi 1 kHz.

(A) Moduladora (Hz)	(B) Correção da frequência de amostragem (Hz) usando CS (n^o primo de oscilações mais próximo)
68,36	985,93
73,24	1027,37
78,13	1012,72
83,01	1024,12
87,89	1011,23
92,77	979,35
97,66	990,14
102,54	981,32
107,42	1009,16
112,31	1017,88

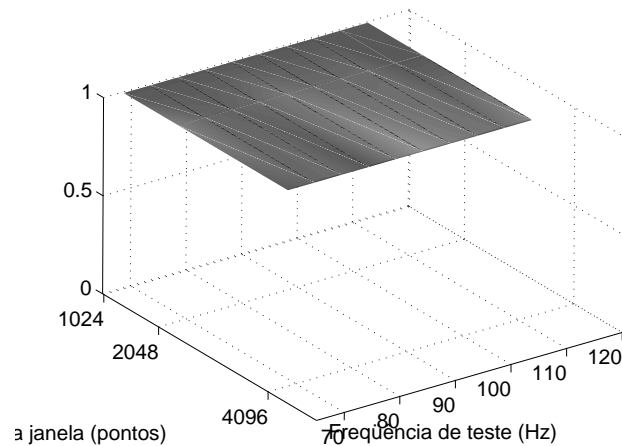


Figura 3.4: Valores de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função de diferentes tamanhos de janelas e frequências moduladoras. A Correção da frequência de amostragem foi realizada para um número primo de ciclos mais próximo em cada janela. Foi utilizada interpolação linear para adequar os sinais às novas frequência de amostragem.

Ademais, para a tarefa de detectar sinais desconhecidos em meio ruidoso, e que já se encontram digitalizados, a frequência de interesse não está disponível e não se tem controle sobre a frequência de amostragem do sinal. Assim, não se tem como adequar o tamanho da janela à frequência de interesse, pois esta frequência é desconhecida. Conseqüentemente, uma escolha desfavorável do tamanho da janela pode inviabilizar a aplicação de técnicas ORD devido ao espalhamento espectral causado. Dessa forma, o objetivo desta seção é corrigir o espectro *a posteriori* (Kang et al., 1999) em função apenas do tamanho da janela, de forma a minimizar o espalhamento do módulo e da fase da FFT do sinal janelado e, conseqüentemente, viabilizar a utilização de técnicas ORD. Após as correções, espera-se que as técnicas ORD possam ser aplicadas sem prejuízo de sua performance.

A seguir, discute-se o efeito do espalhamento espectral nas técnicas ORD através de simulações e testa a possibilidade de correção do espectro com vistas a reparar a performance dessas ferramentas computacionais. Três principais técnicas ORD serão testadas: magnitude quadrática da coerência (MSC), medida de componente síncrona (CSM) e Teste F espectral (SFT). A primeira é uma função que relaciona o módulo e a fase da FFT de um sinal janelado no tempo (ver seção 2.2.1), enquanto apenas fase e apenas módulo da FFT são as bases da CSM (seção 3.5.1) e do STF (3.5.1), respectivamente

(Dobie e Wilson, 1993).

3.5.1 Técnicas ORD

Como visto anteriormente, as funções ORD comparam, no domínio da frequência, a estimativa de um detector com um limiar estatístico. Devido ao fato do limiar não depender da forma de onda do sinal a ser detectado, este tipo de técnica fornece um teste automático e objetivo.

Medida de componente síncrona (CSM)

A CSM é uma função baseada na variância das fases das transformadas de Fourier de um sinal dividido em M segmentos. A variância da fase é descrita por Mardia (1972) como

$$\widehat{\text{var}}[\theta(f)] = 1 - \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \cos \theta_i(f) \right]^2 - \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \sin \theta_i(f) \right]^2, \quad (3.2)$$

onde $\theta_i(f)$ é o ângulo de fase na frequência f da transformada de Fourier da i -ésima janela de $y[n]$, o qual é dividido em M segmentos. De acordo com Fridman et al. (1984), o complemento da variância de fase é usado como uma medida de sincronismo entre as i -ésimas transformadas de Fourier. Sua equação é dada por:

$$\text{CSM}(f) = 1 - \text{var}[\theta(f)], \quad (3.3)$$

ou ainda,

$$\widehat{\text{CSM}}(f) = \frac{1}{M^2} \left\{ \left[\sum_{i=1}^M \cos \theta_i(f) \right]^2 + \left[\sum_{i=1}^M \sin \theta_i(f) \right]^2 \right\} = \hat{\rho}_y^2(f). \quad (3.4)$$

O símbolo $\hat{\rho}_y^2(f)$ (com $\hat{\cdot}$ sobrescrito denotando estimativa) será usado para a CSM para explicitar o sinal cuja coerência de fase dos segmentos esteja sendo medida. Esta quantificação varia entre 0 e 1 e, para o caso particular de $y[n]$ ter uma componente periódica, os ângulos de fase $\theta_i(f)$ terão o mesmo valor em todas as janelas na frequência desta componente, levando $\hat{\rho}_y^2(f)$ ao valor unitário. Por outro lado, um sinal aleatório sem componente periódica terá $\theta_i(f)$ uniformemente distribuído entre 0 e 2π e, portanto, os somatórios dos senos e cossenos na Eq. (3.4) tendem ao cancelamento, o que leva $\hat{\rho}_y^2(f)$ para próximo de zero.

Para a utilização de $\hat{\rho}_y^2(f)$ na detecção de respostas periódicas, sua distribuição amostral sob a hipótese nula H_0 deve ser estabelecida para permitir que os limiares para a detecção sejam obtidos. Neste caso, a hipótese H_0 implica $\theta_i(f)$ normalmente distribuído entre 0 e 2π . De acordo com Miranda de Sá e Felix (2003), esta distribuição aproxima-se assintoticamente, para M elevado, a:

$$2M \cdot \hat{\rho}_y^2(f) \sim \chi_2^2, \quad (3.5)$$

e, portanto,

$$\hat{\rho}_{y_{crit}} = \frac{\chi_{crit,2,\alpha}^2}{2M}, \quad (3.6)$$

onde $\chi_{crit,\alpha,2}^2$ é o valor crítico da distribuição chi-quadrada com 2 graus de liberdade para um nível de significância α . Esta aproximação é baseada no teorema do limite central, e é tanto mais precisa quanto maior o valor de M .

Teste F espectral

O nível de ruído de um sinal pode ser estimado através da atividade nas frequências adjacentes à frequência de teste. A comparação entre as energias na frequência do sinal e as energias em outras frequências é a base do teste F (Picton et al., 2003). A estimativa calcula uma razão F entre a energia na banda de frequência do sinal e a energia média nas bandas adjacentes:

$$F = \frac{N(Re_s^2 + Im_s^2)}{\sum_{j=s-N/2}^{j=s+N/2} Re_j^2 + Im_j^2}, \quad (3.7)$$

onde N é o número de frequências de ruído considerado, Re_s e Im_s são, respectivamente, as partes real e imaginária da FFT do sinal na frequência de teste, enquanto Re_j e Im_j representam as partes real e imaginária da j -ésima banda de frequência de ruído, respectivamente.

Esta razão é distribuída segundo uma distribuição F com 2 e $2N$ graus de liberdade. Um número alto de frequências de ruído aumentaria o poder do teste através do aumento dos graus de liberdade do denominador. Todavia, aumentando-se muito a faixa de ruído pode-se sofrer de não-gaussianidade do ruído (fato muito comum em situações práticas). Picton et al. (2003) sugerem que o uso de 16 bandas de ruído produz resultados semelhantes aos obtidos com 120 amostras.

Signal Coherence

Adicionalmente, o teste *signal coherence* descrito em Hinich (2000) poderia ser usado. Todavia, Felix et al. (2006) demonstraram que esta ferramenta é, na verdade, a raiz quadrada da MSC; o que mostra que a *signal coherence* tem o mesmo poder de detecção de MSC. O artigo publicado encontra-se em anexo.

3.5.2 Método de correção espectral por diferença de fase

O método proposto por Kang et al. (1999) corrige o módulo, a fase e o vetor de frequências da FFT de um dado sinal em função do número de pontos da janela usada para a estimação do espectro. Este procedimento é necessário para o caso onde não se sabe o valor exato de frequência que se deseja detectar, pois uma escolha desfavorável do número de pontos pode tornar o processo de detecção impraticável devido ao excessivo espalhamento espectral. Em linhas gerais, o método obtém o valor do espectro na frequência desejada, através de interpolação dos valores do espectro nas faixas laterais, em função do número de pontos da janela usada para estimação da FFT.

Uma grande vantagem deste método é que ele é aplicável a qualquer sinal, independentemente do tipo de janelamento usado na FFT. Neste trabalho, este método será testado como etapa de pré-processamento para aplicação das técnicas de detecção ORD em sinais simulados.

3.5.3 Estudos de simulação

Os sinais utilizados nas simulações consistiram de senóides (frequências: 25, 100, 250 e 350 Hz) adicionadas de ruído branco gaussiano de média zero e variância 1, numa SNR de -15 dB. Para a geração dos sinais de acordo com a CS, a frequência de amostragem e o tamanho da janela foram iguais a 1024. Os sinais sem CS foram simulados usando frequência de amostragem 1000 e tamanho de janela para FFT de 1024 pontos. A duração dos sinais foi de 30 s. Assim, dois conjuntos de sinais foram gerados: um de acordo com o critério de CS e outro sem CS. Em seguida, as técnicas de detecção foram aplicadas aos sinais de acordos com as eqs. (2.3), (3.4) e (3.7).

3.5.4 Resultados das simulações

Um primeiro grupo de simulações foi executado para estudar o efeito do espalhamento espectral nas técnicas ORD. Os resultados das detecções em

sinais gerados de acordo com CS são mostrados nas Figs. 3.5, 3.6 e tabela 3.3 enquanto detecções em sinais que não satisfazem o critério de CS são mostradas nas Figs. 3.7, 3.8 e tabela 3.4.

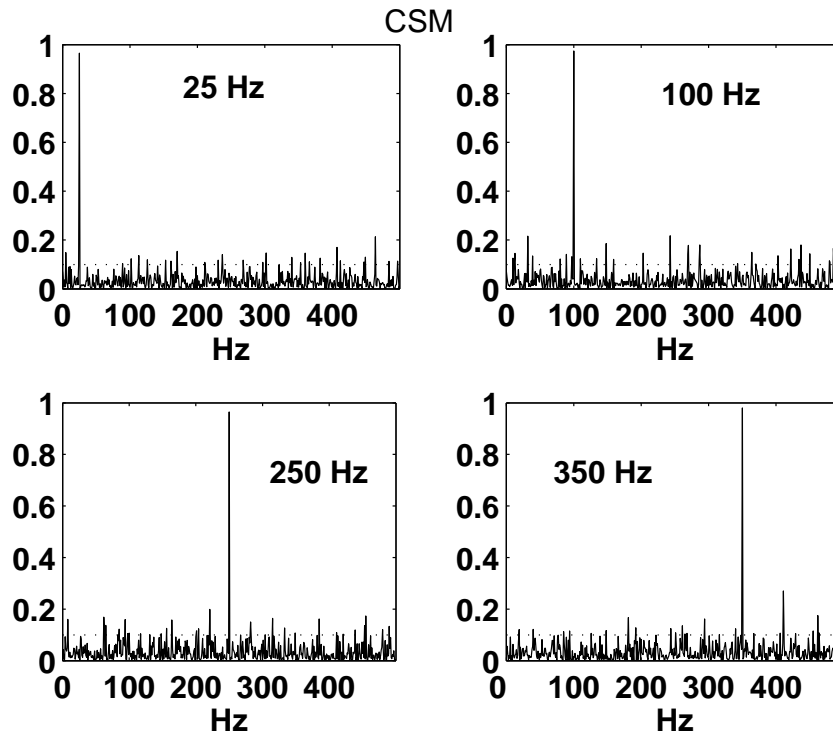


Figura 3.5: Aplicação de $\hat{\rho}_y^2(f)$ em sinais gerados de acordo com CS (SNR = -15 dB). Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$).

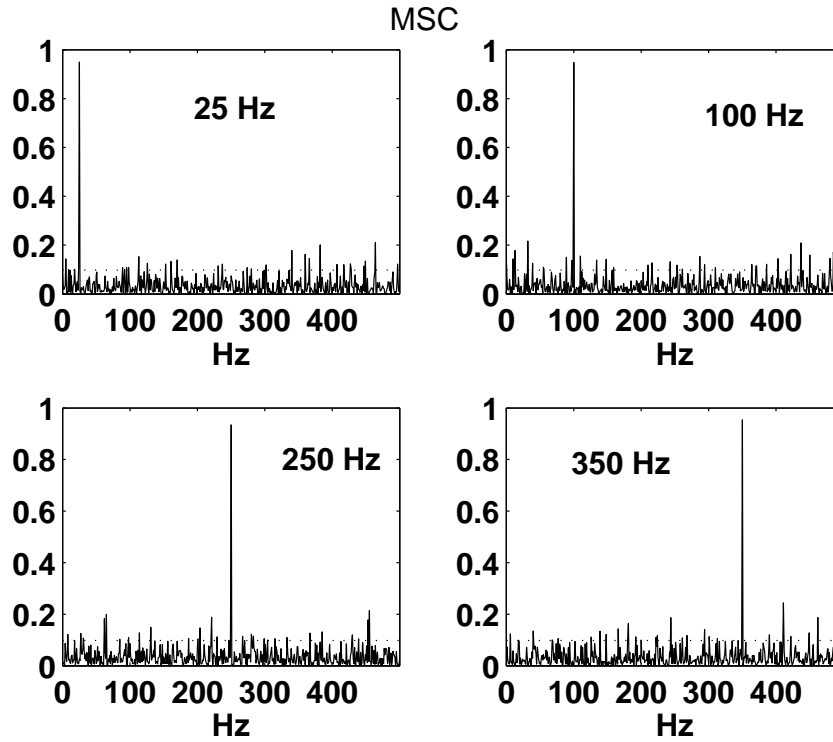


Figura 3.6: Aplicação de $\hat{\kappa}_y^2(f)$ em sinais gerados de acordo com CS (SNR = -15 dB). Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$).

Tabela 3.3: Aplicação do teste F em sinais gerados de acordo com CS (SNR = -15 dB). O '*' superposto indica significância estatística ($\alpha = 5\%$).

	25 Hz	100 Hz	250 Hz	350 Hz
F	4,6156*	4,6499*	4,6709*	4,6083*
Limiar	3,2317	3,2317	3,2317	3,2317

Nos casos acima, nota-se detecção significativa em todas as frequências de teste, como esperado.

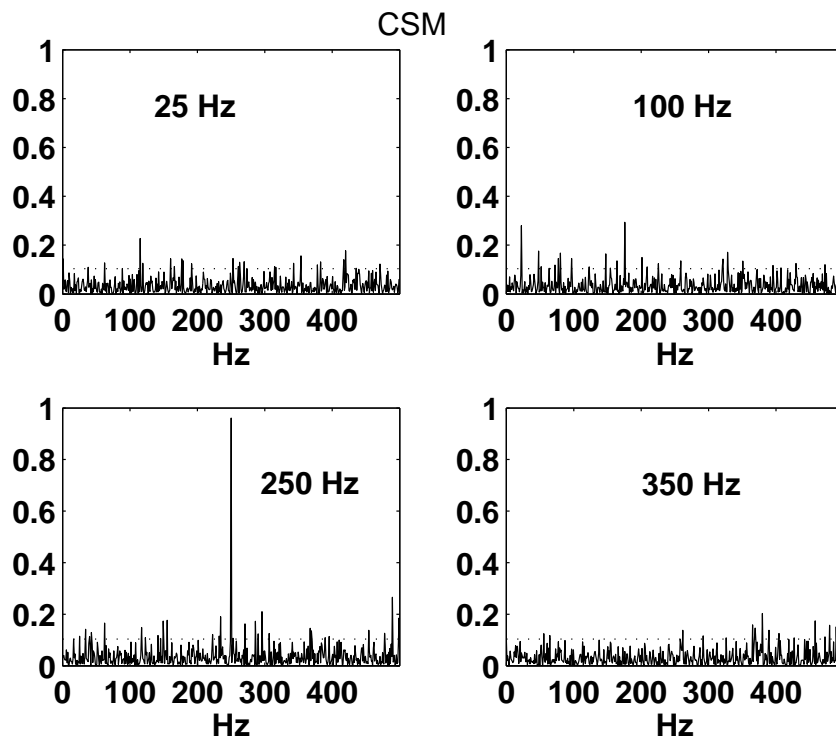


Figura 3.7: Aplicação de $\hat{\rho}_y^2(f)$ em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB). Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$).

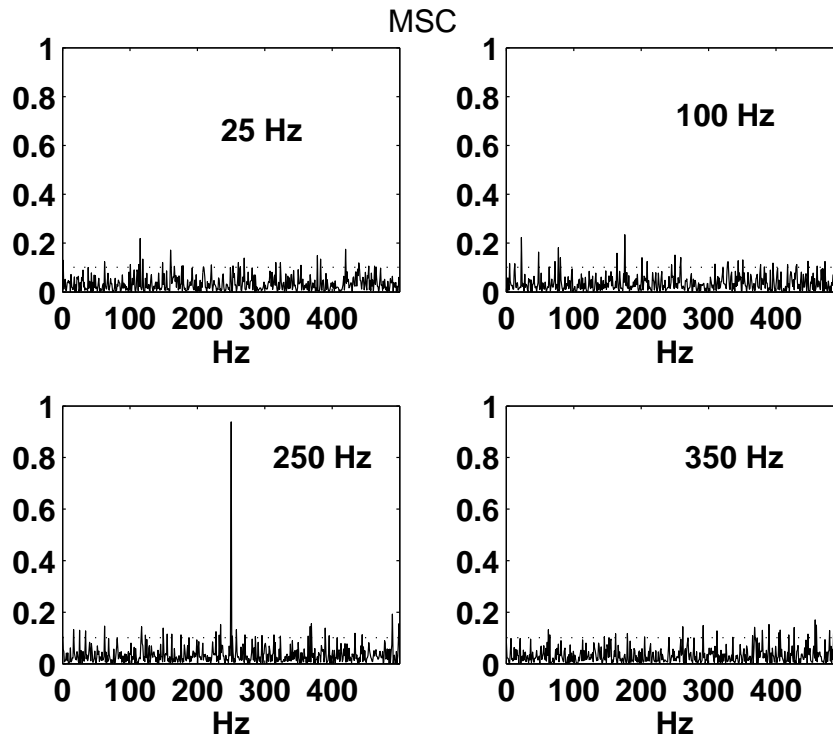


Figura 3.8: Aplicação de $\hat{\kappa}_y^2(f)$ em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB). Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$).

Tabela 3.4: Aplicação do teste F em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB). O '*' superposto indica significância estatística ($\alpha = 5\%$).

	25 Hz	100 Hz	250 Hz	350 Hz
F	3,1251	3,1628	4,4820*	3,4583*
Limiar	3,2317	3,2317	3,2317	3,2317

O efeito do espalhamento é claro nas figuras acima: as senóides não seriam detectadas no caso da MSC e CSM (exceto a frequência de 250 Hz) e os valores do teste F foram todos reduzidos, sendo mantidas as significâncias dos sinais de 250 e 350 Hz.

Nas Figs 3.9, 3.10 e tabela 3.5 são mostrados os resultados da detecção nos mesmos sinais sem CS, porém pré-processados pelo algoritmo de correção do espectro (ver seção 3.5.2).

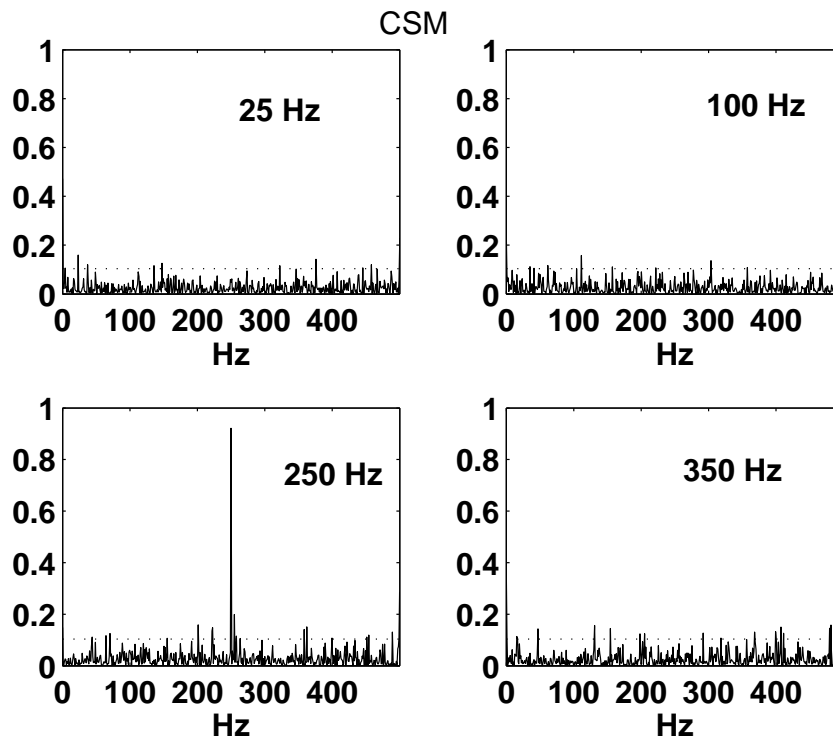


Figura 3.9: Aplicação de $\hat{\rho}_y^2(f)$ em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB) e pré-processados pelo algoritmo de Kang. Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$). Nota-se detecção significativa somente em 250 Hz.

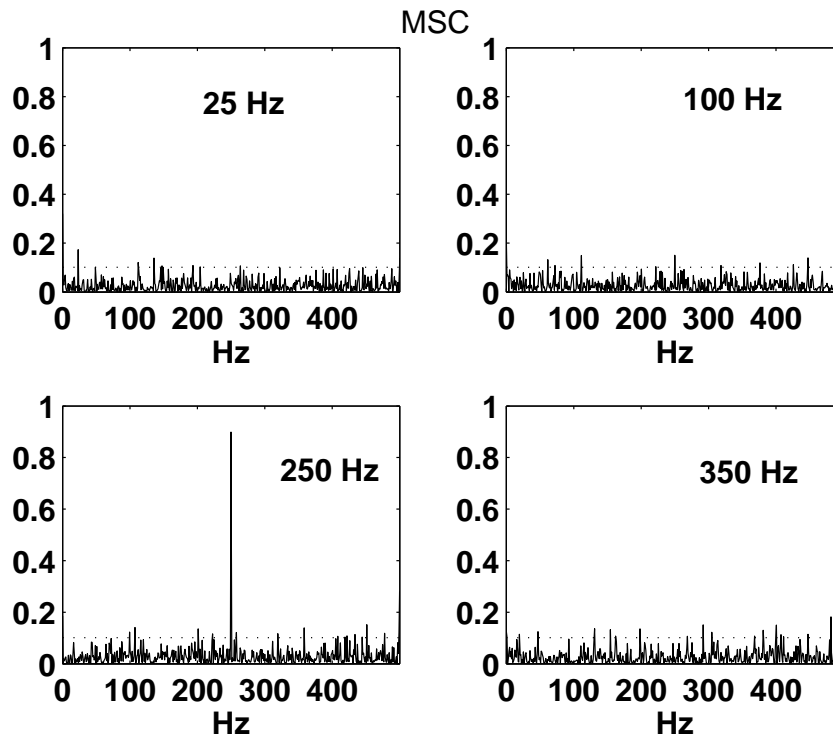


Figura 3.10: Aplicação de $\hat{\kappa}_y^2(f)$ em sinais gerados sem CS (SNR = -15 dB) e pré-processados pelo algoritmo de Kang. Valores críticos mostrados em linhas pontilhadas ($\alpha = 5\%$). Nota-se detecção significativa somente em 250 Hz.

Tabela 3.5: Aplicação do teste F em sinais gerados de acordo com CS (SNR = -15 dB) e pré-processados pelo algoritmo de Kang. O '*' superposto indica significância estatística ($\alpha = 5\%$).

	25 Hz	100 Hz	250 Hz	350 Hz
F	3,4774*	3,5771*	3,8566*	3,8228*
Limiar	3,2317	3,2317	3,2317	3,2317

3.5.5 Discussão

Os resultados dessa seção indicam que, para uma SNR de -15 dB, as técnicas ORD podem ser consideravelmente prejudicadas pelo espalhamento espectral causado por um janelamento desfavorável, i.e. que não segue a CS.

A comparação das Figs. 3.5-3.6 e tabela 3.3 com as Figs. 3.7-3.8 e tabela 3.4 mostram que o poder de detecção destas ferramentas é alterado de forma diferente dependendo do conteúdo espectral do sinal, ou seja, o efeito do espalhamento espectral sobre as técnicas ORD varia com a frequência (notar que, para os três testes, a detecção do sinal de 250 Hz não sofreu perda considerável em função do espalhamento; no caso do teste F, a hipótese H_0 (ausência de sinal) também foi rejeitada para 350 Hz).

Este fato indica que resultados de detecção espectral em sinais desconhecidos imersos em ruído devem ser considerados com cautela, pois, apesar de algumas frequências poderem ser detectadas corretamente, não existe generalização para todo o espectro possível, salvo situações em que o espalhamento conseqüente não for proibitivo. Todavia, para o caso de detecção de sinais desconhecidos, estas situações não são previsíveis.

Nas Figs. 3.9-3.10 e tabela 3.5, o resultado do pré-processamento fornecido pelo algoritmo descrito em Kang et al. (1999) aos sinais simulados sem CS são mostrados. Comparando-se estes resultados com os das Figs. 3.7-3.8 e tabela 3.4, nota-se que a performance do teste F espectral foi corrigida (todas as frequências foram detectadas significativamente), enquanto a CSM e a MSC não obtiveram melhoras em seus desempenhos. Isto indica que a fase do espectro não foi corrigida satisfatoriamente no pré-processamento, pois tanto a MSC quanto a CSM usam a fase nas suas estimativas, enquanto o teste F usa apenas o módulo. Ademais, percebe-se que os valores da razão F na Tabela 3 são sistematicamente menores dos que na Tabela 1; o que indica que o algoritmo diminuiu, mas não extinguiu o espalhamento causado pelo janelamento não-sincronizado.

O objetivo dos estudos desta seção foi estudar uma metodologia alternativa para recuperação de dados coletados de forma sub-ótima para que possam ser utilizados na detecção de respostas. Conseqüentemente, o método proposto na seção 3.5.2 foi utilizado como pré-processamento nos dados que geraram os resultados da Fig. 2.3, com vistas a reverter as oscilações causadas pelo espalhamento. O resultado é mostrado na Fig. 3.11. Nota-se que o algoritmo de Kang não foi eficiente na correção do espalhamento, pois as oscilações de $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ na Fig. 3.11B não foram minimizadas. Isto era esperado, posto que a etapa de pré-processamento da seção 3.5.2 não foi capaz de contornar os efeitos de espalhamento mostrados na Fig. 3.10. Este resultado será mais discutido no capítulo 6.

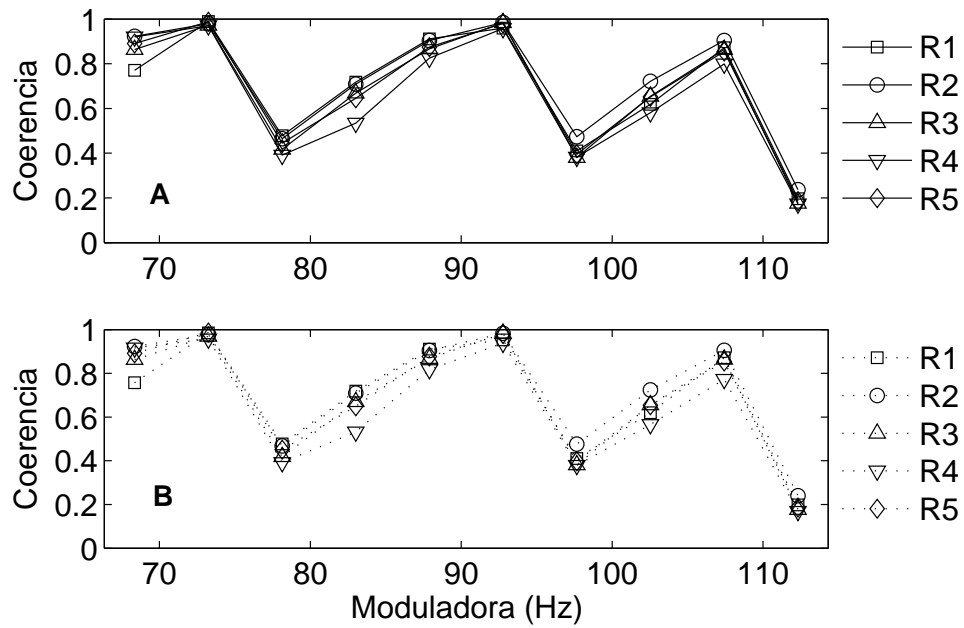


Figura 3.11: $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ em função da frequência moduladora (portadora fixa de 4 kHz e correção da moduladora para o número inteiro de ciclos mais próximo na janela). Este resultado é o mesmo mostrado na Fig. 2.3A. (B) $\hat{\kappa}_y^2(f_m)$ após pré-processamento para correção do espalhamento.

Capítulo 4

Avaliação da ASSRs através da varredura dos parâmetros do estímulo

4.1 Considerações iniciais

A frequência moduladora é uma "assinatura"espectral atribuída à banda de frequência portadora que se deseja testar, sendo utilizada para reconhecimento da resposta à referida banda em meio ao ruído de fundo. Além da portadora e da moduladora, a amplitude do estímulo e a profundidade de modulação são parâmetros necessários para compor um estímulo AM e necessariamente precisam ser estudados. Regan (1973) demonstrou que, em vez de realizar múltiplas medidas de resposta evocada cada qual com valor diferente de parâmetro (como realizado no capítulo 3), é preferível utilizar varreduras lineares dos diferentes valores dos parâmetros e verificar o efeito dinâmico nas respostas. A varredura de parâmetros é relativamente simples de ser avaliada através de análise espectral, mais especificamente distribuições tempo-frequência como o espectrograma. Técnicas de varredura foram usadas extensivamente para estimativa de limiares de discriminação visual (Norcia et al., 1989). É também importante saber se a ordem de apresentação dos estímulos pode influenciar na resposta. Portanto, as seguintes perguntas precisam ser respondidas:

- A ASSR para um portadora fixa é independente da modulação, amplitude e profundidade de modulação do estímulo?
- A ordem na qual os estímulos são apresentados pode influenciar a resposta?

Neste capítulo, as varreduras de parâmetros de um tom AM foram aplicadas como estímulos a ratos Wistar e as atividades biolétricas no CI destes animais serão registradas durante a estimulação. Estas varreduras foram feitas em duas etapas: na primeira, a varredura foi realizada do menor para o maior valor do parâmetro (varredura anterógrada) enquanto na segunda etapa, a variação do parâmetro foi realizada do maior para o menor valor (varredura retrógrada). A utilização de animais para estes experimentos é motivada pela alta SNR do LFP. Além disso, o CI é um núcleo da via auditiva primária diretamente envolvido com o processamento de ASSRs, tanto em animais (Joris et al., 2004) quanto em humanos (Picton et al., 2003). Adicionalmente, verifica-se que esta abordagem alia a característica contínua do estímulo em regime permanente (garantindo, assim, a ativação de possíveis circuitos reverberantes) com a vantagem da alta SNR das respostas registradas no CI, fato este que reduz a variabilidade devido ao ruído.

4.1.1 Procedimentos experimentais

Os dados foram registrados com frequência de amostragem 4000 Hz após filtragem passa-faixa (30-1000 Hz). Os cuidados com os animais e o procedimento cirúrgico foram os mesmos das seções 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente. Foram operados cinco animais, sendo que três foram usados nos resultados. Os outros dois apresentaram nível de ruído acima do aceitável. O tamanho da janela usado nos espectrogramas foi de 4096 pontos.

4.2 Varredura de profundidade

4.2.1 Estímulo

A varredura de profundidade de modulação foi obtida variando-se linearmente, durante a estimulação, o valor de λ na eq. (2.6) de 0 a 1, para a varredura anterógrada, e de 1 a 0, para a varredura retrógrada. A portadora foi de 4 kHz, a moduladora foi de 105 Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B) e a amplitude máxima foi 1.

4.2.2 Resultados

Um caso típico de ASSR evocada por varredura retrógrada de profundidade de modulação é mostrado na Fig. 4.1.

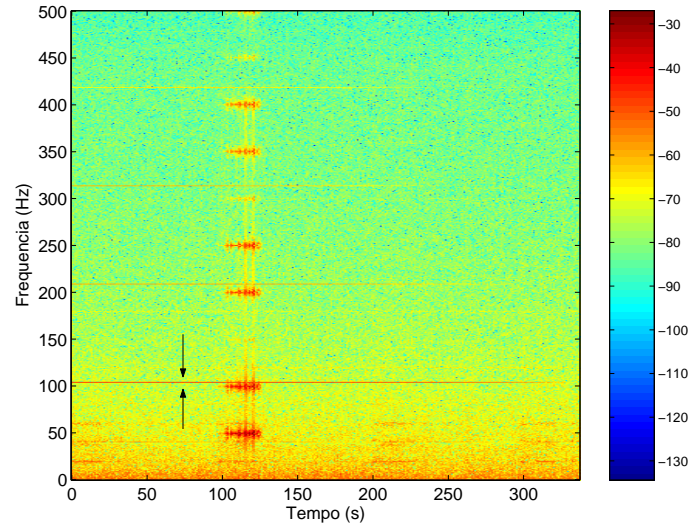


Figura 4.1: Espectrograma típico calculado a partir de LFP coletado no CI de rato Wistar durante estimulação por varredura retrógrada da profundidade de modulação (0 a 100 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1]. As setas indicam a banda da resposta evocada (fundamental). As amplitudes estão em dB.

O aumento de energia notado em torno de 110 s na Fig. 4.1 é um artefato de registro e consequência de o animal "ouvir" seu próprio ressonar.

As energias na frequência da moduladora para todos os sinais do protocolo de varredura anterógrada são mostradas, em função da profundidade de modulação, na Fig. 4.2. O valor médio destas ASSRs é mostrado na Fig. 4.3. Para a varredura retrógrada, as ASSRs na frequência da moduladora de todos os animais são mostradas na Fig. 4.4. A média destes valores é mostrada na Fig. 4.5. Ambos valores médios são mostrados superpostos na Fig. 4.6.

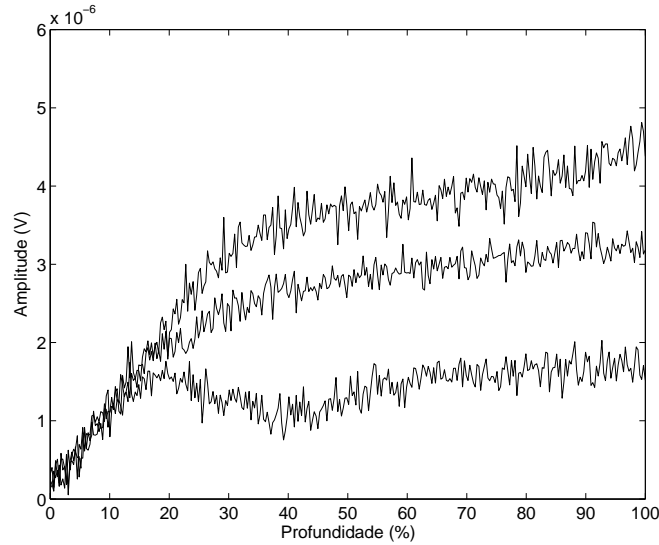


Figura 4.2: Respostas evocadas por varredura anterógrada da profundidade de modulação (0 a 100 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).

Apesar de a amplitude máxima das respostas variarem entre os animais, nota-se neste resultado que uma profundidade de modulação até aproximadamente 20% evoca ASSRs muito parecidas em todos os animais do estudo. Este mesmo comentário é aplicável à Fig. 4.4.

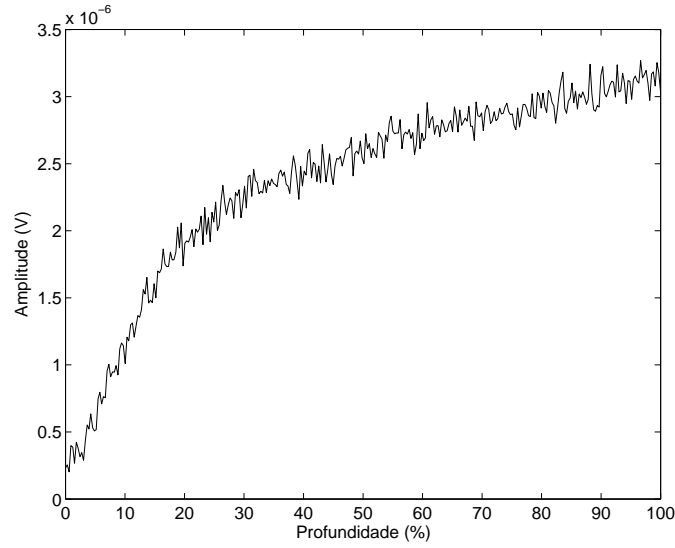


Figura 4.3: Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura anterógrada da profundidade de modulação (0 a 100 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1].

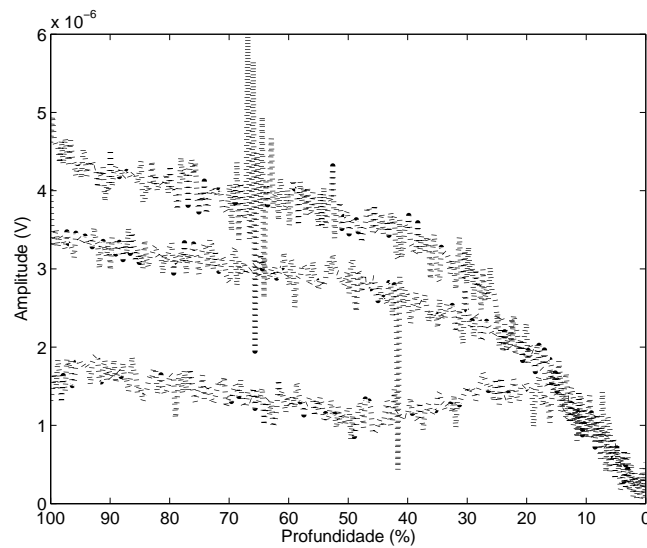


Figura 4.4: Respostas evocadas por varredura retrógrada da profundidade de modulação (100 a 0 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).

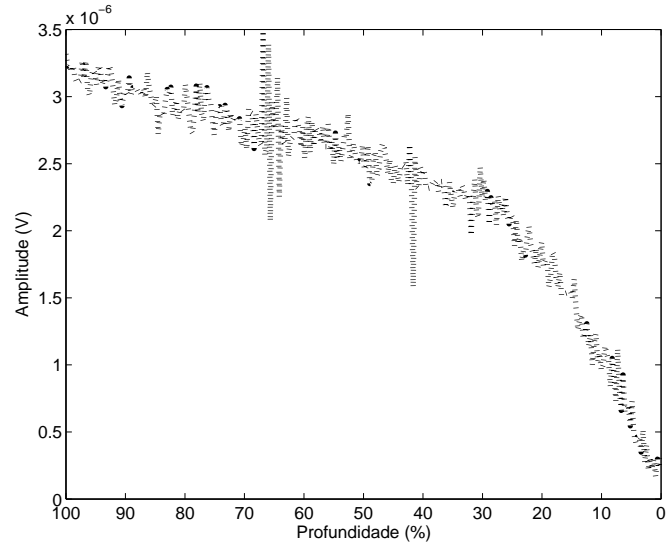


Figura 4.5: Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura retrógrada da profundidade de modulação (100 a 0 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1].

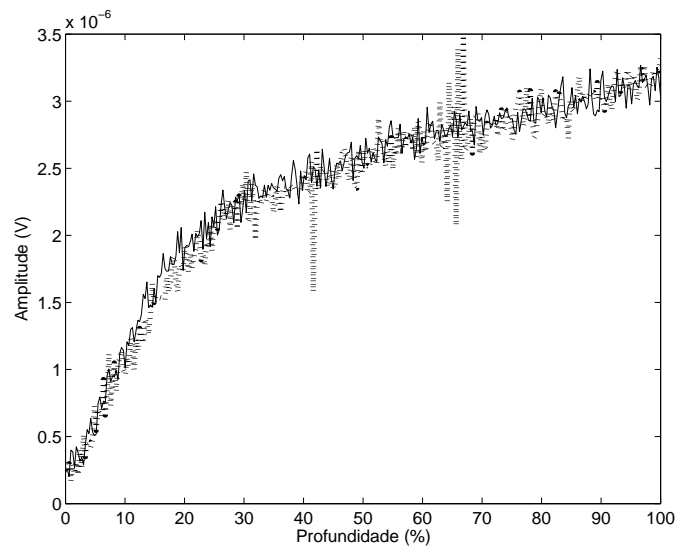


Figura 4.6: Respostas médias ($n = 3$) evocadas por varreduras anterógrada (linha contínua) e retrógrada (linha pontilhada) da profundidade de modulação (100 a 0 %) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1].

A Fig. 4.6 resume os resultados desta seção. Nota-se que a amplitude da ASSR em função da profundidade de modulação é uma curva assintoticamente crescente e que não existe diferença nas respostas evocadas com varredura anterógrada e retrógrada.

4.3 Varredura de amplitude

4.3.1 Estímulo

A varredura de amplitude foi obtida variando-se linearmente, durante a estimulação, o valor de A na eq. (2.6) de 0 a 1, para a varredura anterógrada, e de 1 a 0, para a varredura retrógrada. A portadora foi de 4 kHz, a moduladora foi de 105 Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B) e a profundidade de modulação foi 1.

4.3.2 Resultados

As energias na frequência da moduladora para todos os sinais do protocolo de varredura anterógrada de amplitude são mostradas, em função da amplitude do estímulo, na Fig. 4.7. O valor médio destas ASSRs é mostrado na Fig. 4.8. Para a varredura retrógrada, as ASSRs na frequência da moduladora de todos os animais são mostradas na Fig. 4.9. A média destes valores é mostrada na Fig. 4.10. Ambos valores médios são mostrados superpostos na Fig. 4.11.

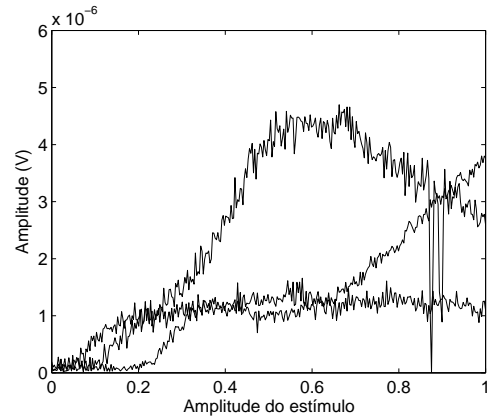


Figura 4.7: Respostas evocadas por varredura anterógrada da amplitude (± 0 a ± 1) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).

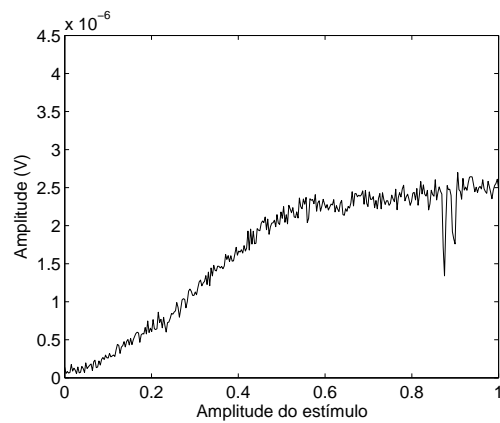


Figura 4.8: Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura anterógrada da amplitude ($pm0$ a $pm1$) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%].

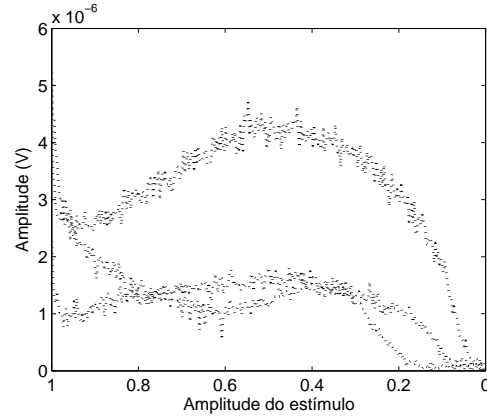


Figura 4.9: Respostas evocadas por varredura retrógrada da amplitude (± 0 a ± 1) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).

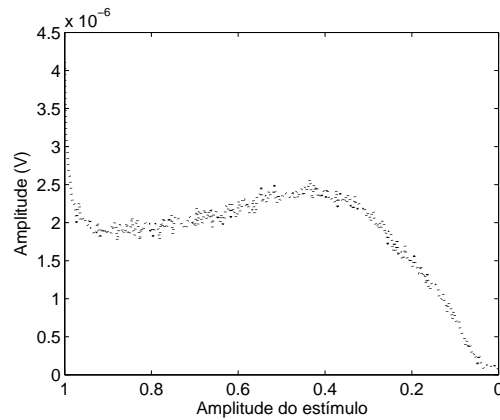


Figura 4.10: Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura retrógrada da amplitude (± 0 a ± 1) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%].

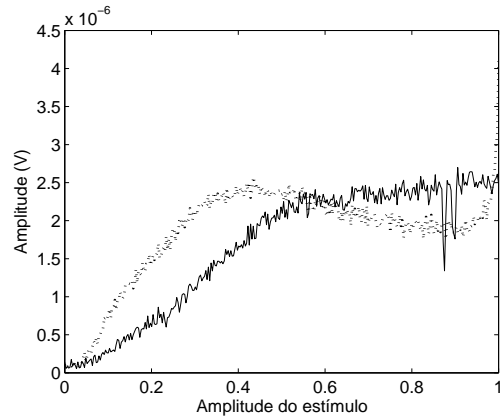


Figura 4.11: Respostas médias ($n = 3$) evocadas por varreduras anterógrada (linha contínua) e retrógrada (linha pontilhada) da amplitude (± 0 a ± 1) de tom AM [$f_c = 4$ kHz; $f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); profundidade de modulação 100%].

Nota-se que as ASSRs atingem um valor de saturação em μV após 50% da amplitude máxima do estímulo.

4.4 Varredura de portadora

4.4.1 Estímulo

Foram realizadas as varreduras de portadora variando-se linearmente, durante a estimulação, o valor de f_c na eq. (2.6) de 1 a 8 kHz, para a varredura anterógrada, e de 8 a 1 kHz, para a varredura retrógrada. A amplitude máxima foi 1, a moduladora foi de 105 Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B) e a profundidade de modulação foi 1.

4.4.2 Resultados

As energias na frequência da moduladora para todos os sinais do protocolo de varredura anterógrada de portadora são mostradas, em função da frequência portadora instântanea do estímulo, na Fig. 4.12. O valor médio destas ASSRs é mostrado na Fig. 4.13. Para a varredura retrógrada, as ASSRs na frequência da moduladora de todos os animais são mostradas na Fig. 4.14. A média destes valores é mostrada na Fig. 4.15. Ambos valores médios são mostrados superpostos na Fig. 4.16.

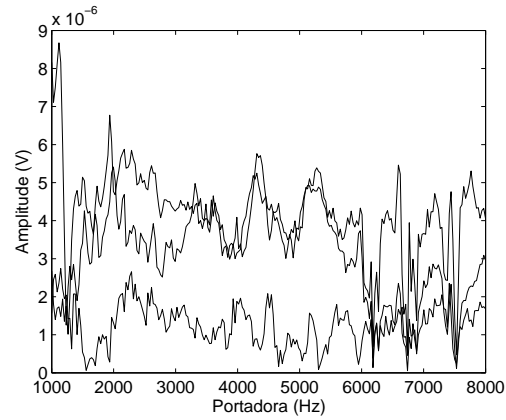


Figura 4.12: Respostas evocadas por varredura anterógrada da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%]. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).

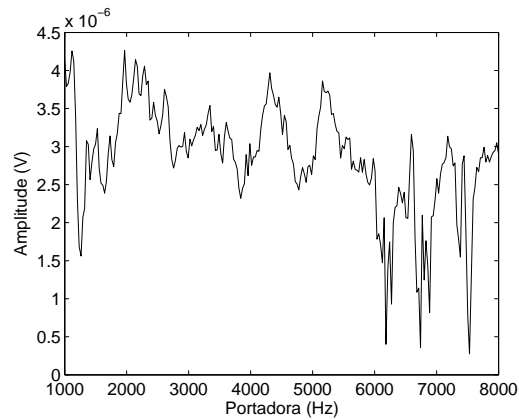


Figura 4.13: Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura anterógrada da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%]

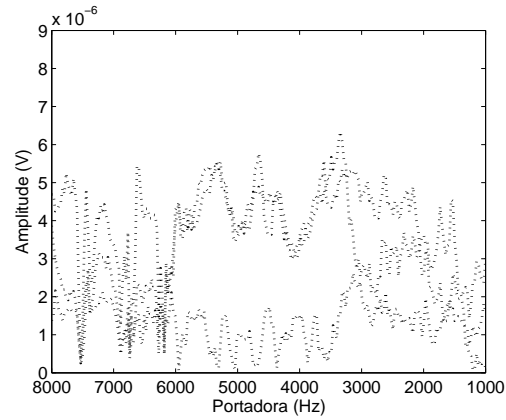


Figura 4.14: Respostas evocadas por varredura retrógrada da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [f_c] (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B)]; amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%. As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).

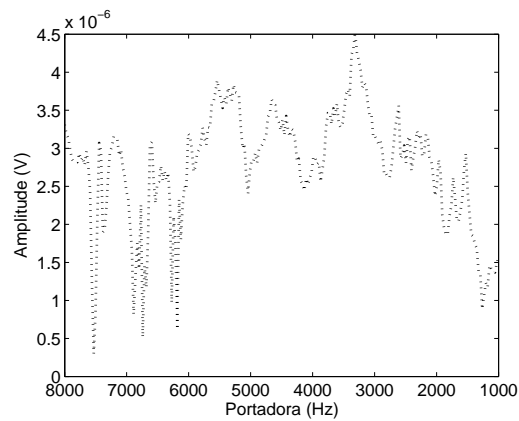


Figura 4.15: Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura retrógrada da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [f_c] (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B)]; amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%].

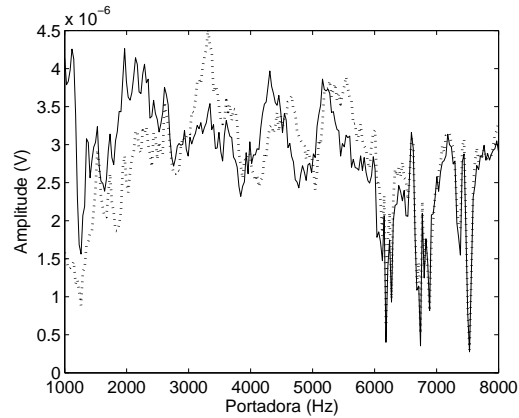


Figura 4.16: Respostas médias ($n = 3$) evocadas por varreduras anterógrada (linha contínua) e retrógrada (linha pontilhada) da portadora (f_c) (1 a 8 kHz) de tom AM [$f_m = 105$ Hz (corrigida segundo a tabela 3.1B); amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%].

A Fig. 4.16 mostra que as ASSRs evocadas mantêm uma amplitude aproximadamente constante durante a varredura. Além disso, não se nota um efeito de histerese neste gráfico.

4.5 Varredura de moduladora

4.5.1 Estímulo

Foram realizadas as varreduras de moduladora variando-se linearmente, durante a estimulação, o valor de f_m na eq. (2.6) de 30 a 1000 Hz, para a varredura anterógrada, e de 1000 a 30 kHz, para a varredura retrógrada. A amplitude máxima foi 1, a profundidade de modulação foi 1 e a portadora foi de 4 k Hz.

4.5.2 Resultados

Um caso típico de ASSR evocada por varredura retrógrada de moduladora é mostrado na Fig. 4.17.

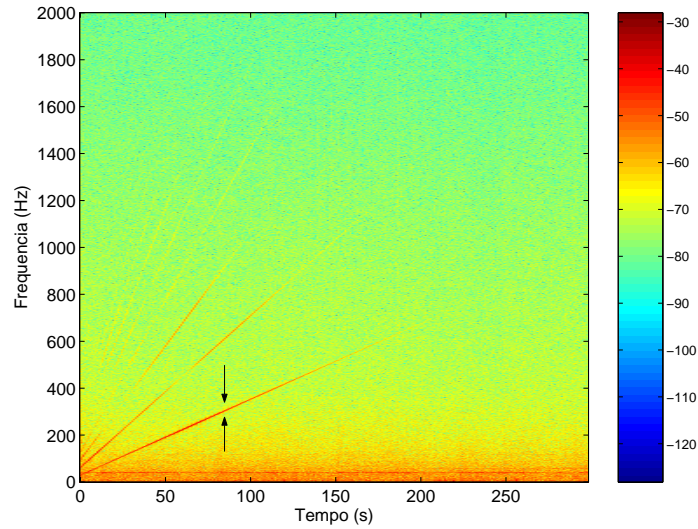


Figura 4.17: Espectrograma típico calculado a partir de LFP coletado no CI de rato Wistar durante estimulação por varredura anterógrada da moduladora (30 a 1000 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%). As setas indicam a banda da resposta evocada (fundamental). As amplitudes estão em dB.

Na Fig. 4.18 são mostrados os maiores valores de energias encontrados nas bandas de frequência adjacentes a frequência moduladora instântanea do estímulo para todos os sinais do protocolo de varredura anterógrada. O valor médio destas ASSRs é mostrado na Fig. 4.19. Para a varredura retrógrada, as ASSRs de todos os animais são mostradas na Fig. 4.20. A média destes valores é mostrada na Fig. 4.21. Ambos valores médios são mostrados superpostos na Fig. 4.22.

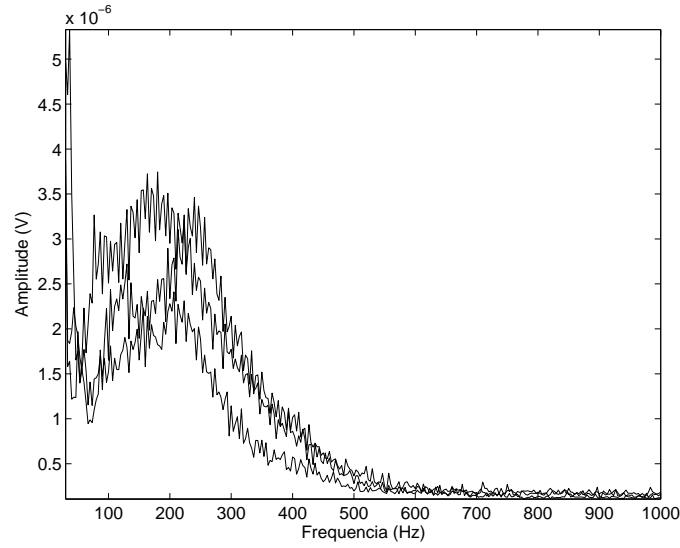


Figura 4.18: Respostas evocadas por varredura anterógrada da frequência moduladora (30 a 1000 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%). As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).

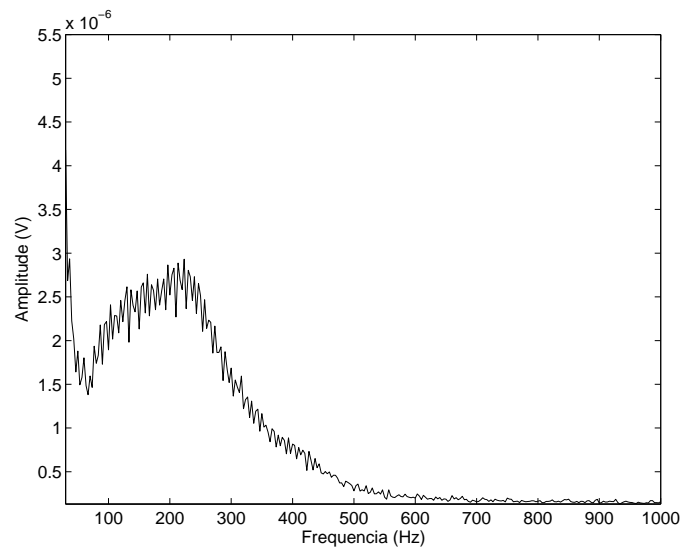


Figura 4.19: Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura anterógrada da frequência moduladora (30 a 1000 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%).

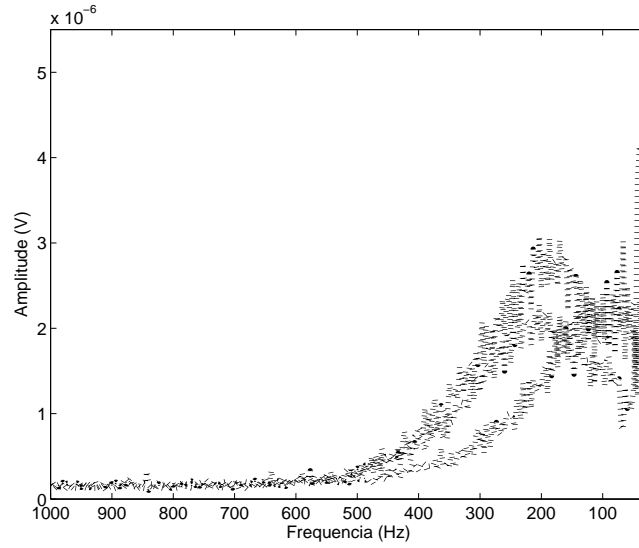


Figura 4.20: Respostas evocadas por varredura retrógrada da frequência moduladora (1000 a 30 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%). As curvas descrevem a amplitude (em Volts) da ASSR de cada animal ($n = 3$).

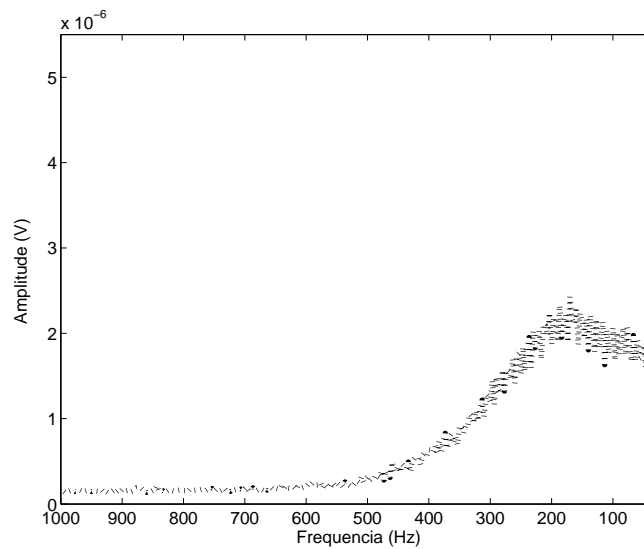


Figura 4.21: Resposta média ($n = 3$) evocada por varredura retrógrada da frequência moduladora (30 a 1000 Hz) de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%).

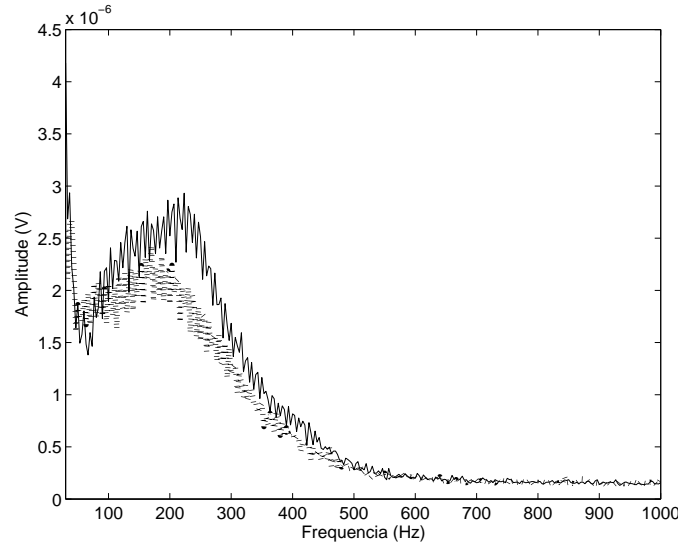


Figura 4.22: Respostas médias ($n = 3$) evocadas por varreduras anterógrada (linha contínua) e retrógrada (linha pontilhada) da frequência moduladora de tom AM ($f_c = 4$ kHz; Amplitude ± 1 ; profundidade de modulação 100%).

Pode-se observar na Fig. 4.22 que a amplitude média das ASSRs atinge um valor máximo (aprox. $3 \mu V$) para uma frequência moduladora de aproximadamente 200 Hz. Além disso, a resposta praticamente desaparece para moduladoras acima de 500 Hz. Nota-se também que a curva que descreve a ASSR média durante varredura retrógrada é sistematicamente menor que a curva obtida durante varredura anterógrada.

4.6 Discussão

Neste capítulo, os parâmetros que compõem o sinal de estimulação para o protocolo das ASSRs foram variados linearmente durante o tempo de estimulação, a saber: profundidade de estimulação, amplitude, portadora e moduladora. Dessa forma, pôde-se medir a contribuição de cada parâmetro na resposta auditiva evocada.

Os resultados da seção 4.2 sugerem que quanto maior a profundidade de modulação usada, maior a amplitude da ASSR, i.e. usar profundidade de modulação 100 % é a melhor escolha quando se deseja evocar respostas tão grandes quanto possíveis. Esta é a situação desejada num exame audiométrico. Portanto, pode-se afirmar que a profundidade de modulação é envolvida na sincronização dos neurônios responsíveis a um dado tom AM,

recrutando proporcionalmente a seu valor um número de neurônios que disparam em fase com a frequência da moduladora. Além disso, conforme visto na Fig. 4.6, nota-se que a ordem de apresentação deste parâmetro não influi na respectiva resposta evocada, i.e. não existe histerese para a profundidade de modulação.

Como visto nas Figs. 4.2 e 4.4, as ASSRs aumentam em amplitude mais rapidamente e de forma parecida dentre os animais até 20 % de profundidade de modulação. Após esse valor, as respostas atingem valores máximos em patamares diferentes para cada animal. Os valores finais diferentes podem ser explicados pelo fato de os eletrodos estarem em posições anatômicas ligeiramente diferentes umas das outras. As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram as do centro do CI. Todavia, pequenos desvios (da ordem de décimos de milímetros) podem acontecer, o que levaria o registro da mesma resposta a ocorrer em isocamadas tonotópicas ligeiramente diferentes. Assim, o eletrodo de registro pode se situar um pouco mais perto ou mais longe da faixa colicular mais responsiva e, devido ao fato de o CI ser um núcleo que possui conexões mais difusas, pequenas variações na posição do registro levam a relativamente grandes alterações em substrato neural em termos de tonotopia, explicando, assim, as diferenças nos valores finais. É interessante mencionar que a faixa de variação destas respostas está de acordo com a literatura (Joris et al., 2004). De qualquer forma, esperar-se-ia que as respostas evocadas por todos os valores de profundidade de modulação seguissem o mesmo padrão, fato este que não é observado para valores menores que 20%. Uma hipótese é que profundidades de modulação reduzidas são suficientes para sincronizar neurônios responsivos já em porções mais caudais da via auditiva, e.g. núcleos cocleares, oliva superior etc. Isso criaria um efeito de deslocamento do gerador neural mais provável das respostas para mais distante da posição do eletrodo. Devido ao fato que esse campo elétrico gerado decai com o quadrado da distância, pequenas diferenças na posição do eletrodo (que se encontra no CI) não influenciariam nas respostas que fossem geradas nestes núcleo mais caudais. Esta suposição parece sensata, pois, quanto mais caudal o núcleo, menos divergente são os circuitos neurais envolvidos no processamento de informação auditiva. Essa menor complexidade dos núcleo mais caudais seria a razão da facilidade em sincronizar suas populações neuronais à uma moduladora. Esta discussão será retomada no capítulo 6.

A amplitude do estímulo evoca respostas sistematicamente maiores com o aumento da amplitude. Porém, uma saturação da magnitude dessas respostas parece acontecer para amplitudes de estímulo maiores que 0,5. Ou seja, a partir desse valor referencial não existe recrutamento de mais potenciais de ação sincronizados com a modulação do estímulo, sugerindo que não adianta aumentar sistematicamente o volume do estímulo para se aumentar a ASSR.

As respostas médias mostradas na Fig. 4.11 indicam que existe histerese na variação de amplitude, e que as maiores respostas são obtidas para a variação retrógrada da amplitude. Adicionalmente, para aplicações audimétricas, essas amplitudes relativas devem ser calibradas em função do nível de pressão sonora que se deseja apresentar ao indivíduo. Todavia, as ASSRs medidas durante varredura de amplitude demonstraram variação considerável (de até 5 vezes) dentre os animais, o que inviabiliza uma conclusão mais forte sobre este parâmetro.

O procedimento de estimulação mostrado na seção 4.4 testa uma faixa contínua de frequências de forma linear durante um intervalo de tempo. Esta estratégia pode ser útil para realização de exames audiométricos, pois economizaria o tempo gasto entre a apresentação de um estímulo e outro. Como visto na Fig. 4.16, a amplitude média das ASSRs situam em torno de $3 \mu V$ para todas as frequências portadoras do teste e não se nota efeito preferencial de histerese em nenhuma seqüência de apresentação de estímulo. Isto indica que a seqüência de apresentação das frequências não influencia na amplitude da resposta medida.

Os resultados mostrados na seção 4.5.2 indicam que não existe sincronismo dos PAs para moduladoras acima de 500 Hz. De fato, a ausência de resposta para valores elevados de moduladoras é explicado pelo fato de, considerando o período refratário absoluto, não ser fisicamente possível um neurônio disparar numa frequência maior que 500 Hz. Portanto, além de definir a frequência moduladora que evoca a resposta de maior amplitude, o resultado mostrado na Fig. 4.22 permite concluir que a informação acústica de modulação AM é processada no mesencéfalo na forma de sincronismo dos PAs de seus neurônios. Ou seja, nestes animais, existe uma população maior de neurônios "sintonizados" em frequências em torno de 200 Hz. A varredura anterógrada evocou ASSRs de amplitude sistematicamente maiores que a varredura retrógrada, sugerindo que, para o caso de exames nos quais a moduladora seja a variável de interesse, a seqüência de apresentação deve ocorrer da menor moduladora para a maior.

Capítulo 5

Envolvimento das intra-ligações GABAérgicas coliculares nas ASSRs

5.1 GABA

GABA, é a abreviação para *Gamma-aminobutyric acid*, em português "Ácido Gama-aminobutírico". Age como neurotransmissor inibitório ligando-se a receptores específicos. Na atualidade são conhecidos 3 tipos de receptores do GABA, a saber: GABA_A, GABA_B e GABA_C. Os receptores produzem suas ações inibitórias aumentando a permeabilidade da membrana celular à íons cloreto. Os neurônios que secretam GABA são chamados de GABAérgicos (Kandell et al., 2000).

A bicuculina é um antagonista competitivo para receptores GABA. Pelo fato de bloquear a ação inibitória dos receptores GABA, que são inibitórios, a ação da bicuculina causa hiperexcitabilidade neuronal. A bicuculina age primariamente no receptor ionotrópico GABA_A, o qual é um canal iônico dependente de ligante.

5.2 Considerações iniciais

De acordo com Picton et al. (2003), o gerador neural mais provável para as ASSRs de frequências superiores a 70 Hz é o mesencéfalo, o qual tem no CI o núcleo que mais recebe e faz conexões, inclusive com núcleos não-auditivos (Casparly et al., 2002). Foi demonstrado que a inibição da liberação do neurotransmissor GABA no CI aumenta a susceptibilidade audiogênica em animais geneticamente epiléticos (Cairasco, 2002; Bagri et al., 1989).

Adicionalmente, Caspary et al. (2002) demonstraram, através de registros multi-unitários, que as conexões GABAérgicas intra-coliculares controlam a taxa de disparos de unidades responsivas quando estimulação por tom AM é presente, i.e. a taxa de disparo aumenta para um nível de pressão sonora fixo quando o GABA é inibido. Bagri et al. (1989) demonstraram também que o potencial evocado transitório é potencializado no CI contralateral ao estímulo após micro-injeção unilateral de bicuculina, um antagonista GABA.

Pretende-se, neste capítulo, estudar o efeito da inibição de neurônios GABAérgicos nas ASSRs. O intuito deste estudo é verificar como as ASSRs são alteradas quando uma deficiência deste neurotransmissor é presente. Assim, conhecendo a dinâmica das ASSRs em situação normal, é possível inferir sobre a presença ou ausência de deficiências de neurotransmissores específicos através de exames não-invasivos e objetivos, o qual constitui uma alternativa de exame de distúrbios do SNC.

5.3 Materiais e métodos

5.3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da raça Wistar (n=20) procedentes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CE-BIO). Todos os animais utilizados tinham idade variando entre 90 a 120 dias e peso variando entre 250 e 350g. Os animais foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 14 horas de luz por 10 horas de escuro, iniciando o período de luz às 6 horas da manhã, com livre acesso à água e ração.

5.3.2 Procedimento cirúrgico

O animal anestesiado com Uretana (140mg/100g, i.p.) foi submetido à tricotomia da cabeça e fixação através de barras auriculares a um aparelho estereotático modelo Stoelting[®]. Uma das barras usadas é perfurada de ponta a ponta para conduzir o estímulo sonoro. Após a assepsia com álcool iodado na área, foi aplicado Xylocaína 2% com vasoconstritor. Foi realizada uma incisão elíptica com centro ao nível da linha interauricular anterior e o tecido subcutâneo foi removido. O animal foi nivelado de acordo com o bregma e lâmbda. Um eletrodo bipolar conjuntamente com uma cânula guia foram introduzidos no núcleo central do CI do animal (coordenadas: AP = -1,9 ; LL = -1,4; DV = +4,6, com inclinação de 30° (Paxinos e Watson, 1998)). A temperatura do animal durante todo o procedimento cirúrgico e de registro foi mantida em $\pm 37^{\circ}C$ por meio de uma bolsa térmica. Ao final dos

registros, a posição do eletrodo foi marcada por uma lesão eletrolítica gerada pela passagem de uma corrente de 1 mA durante 5 s. Os animais foram perfundidos transcardiacamente com salina 0,9% e a seguir com formol a 10%. O cérebro foi extraído e mantido em formol a 10% até ser fatiado em vibrátomo e processado histologicamente para verificação do posicionamento do eletrodo.

5.3.3 Confeção dos eletrodos

Os eletrodos bipolares foram confeccionados com fio de aço revestidos com teflon (mod. 7914, A&M Systems), com diâmetro externo de aproximadamente 17,8 mm. A cânula-guia foi confeccionada utilizando-se tubos capilares de sílica para cromatografia cortados com aproximadamente 50 mm de comprimento e, posteriormente, fixada ao eletrodo bipolar por meio de esmalte do tipo base para unha (RISQUE[®], Natural, Incolor). A ponta da cânula guia foi posicionada a 2 mm da ponta mais extrema do eletrodo bipolar.

Para a microinjeção, foi utilizada uma base de micromanipulação adaptada a uma seringa do tipo Hamilton de 0,5 ml, através de um tubo de polietileno (PE20), preenchido com água destilada. A injetora foi confeccionada com tubos capilares de sílica para cromatografia com aproximadamente 60mm. Dessa forma, a microinjeção foi realizada com velocidade controlada (0,5ml/min).

5.3.4 Estímulo

O estímulo sonoro consistiu de tom de 4 KHz, modulado a 105 Hz (corrigido de acordo com a tabela 3.1), com profundidade de modulação de 100% e amplitude ± 1 . O nível de pressão sonora gerada pelo auto-falante na extremidade da barra auricular perfurada foi controlada por um decibelímetro (60 dB SPL).

Os animais fixados ao estereotáxico e implantados com eletrodo foram colocados em uma gaiola de Faraday isolada acusticamente. Os estímulos auditivos provenientes de um CD-player foram amplificados e produzidos por um tweeter (Selenium[®], modelo ST-304), montado em uma caixa externa à gaiola. As ondas sonoras foram conduzidas por um tudo de borracha ao interior da gaiola, ao qual se liga à extremidade da barra auricular fixada contralateralmente ao hemisfério registrado.

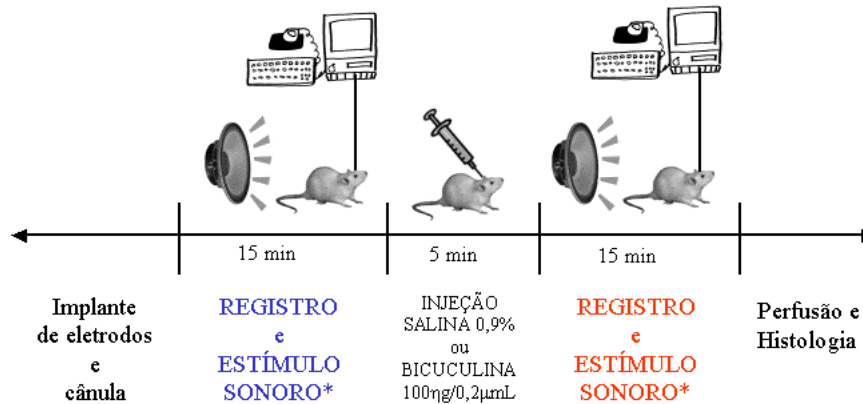


Figura 5.1: Protocolo experimental para avaliação do efeito da inibição GABAérgica no CI de ratos Wistar.

5.3.5 Aquisição de sinais

O sinal bioelétrico foi coletado por um pré-amplificador (x100) e amplificador (Axon Instruments) no interior de uma gaiola de Faraday. Este foi filtrado na banda de 30 – 1000 Hz e digitalizado a uma frequência de amostragem de 4KHz com resolução de 12 bits (NIDAQ 6023-E, National Instruments). A aquisição dos sinais foi realizada durante um minuto por um software desenvolvido no Núcleo de Neurociências, em linguagem C++. Os dados foram estocados em disco rígido para análises posteriores.

5.3.6 Protocolo experimental

Os animais anestesiados, fixados em estereotáxico e implantados com eletrodos e cânula receberam estimulação sonora por 15 minutos. Após o término do estímulo os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos, sendo que um dos grupos recebeu uma microinjeção de Bicuculina metiliodada (100 hg/0,2mL), enquanto que o outro grupo recebeu a microinjeção de solução salina (0,9%). Após 5 minutos de intervalo o estímulo sonoro foi repetido. Os sinais antes e depois da microinjeção foram arquivados e analisados posteriormente (ver Fig. 5.1).

5.3.7 Processamento dos sinais

Os dados registrados foram filtrados digitalmente com filtro Butterworth de sétima ordem com frequência de corte 500 Hz e, em seguida, decimados digitalmente para uma frequência de amostragem de 1000 Hz. Em seguida,

foi estimado espectrograma (janelas espectrais de 1024 pontos) de cada sinal e a ASSR foi extraída a partir amplitude na faixa de 105 Hz de cada espectrograma.

5.4 Resultados

5.4.1 Micro-injeção de salina

Este protocolo foi realizado como controle do protocolo de bicuculina, pelo fato da bicuculina ter sido diluída em salina. Na Fig. 5.2, são mostrados as ASSRs de todos os animais deste protocolo antes da micro-injeção. Na Fig. 5.3, as ASSRs medidas logo após injeção de salina são mostradas. Os valores médios destas duas figuras são mostrados na Fig. 5.4.

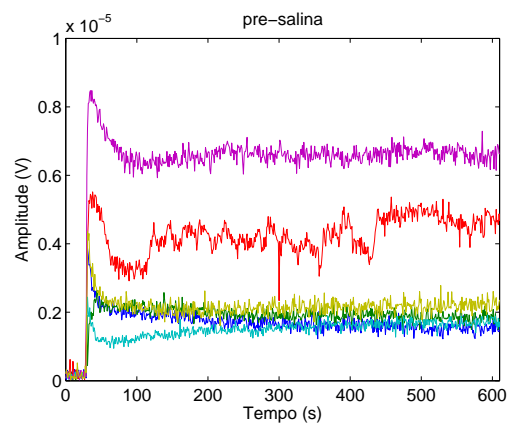


Figura 5.2: ASSRs de todos os animais medidas antes da micro-injeção de salina.

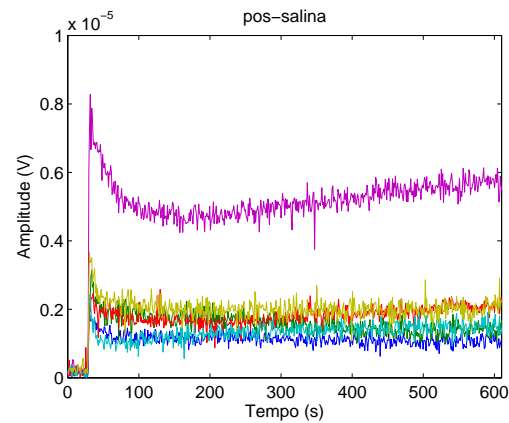


Figura 5.3: ASSRs de todos os animais medidas após a micro-injeção de salina.

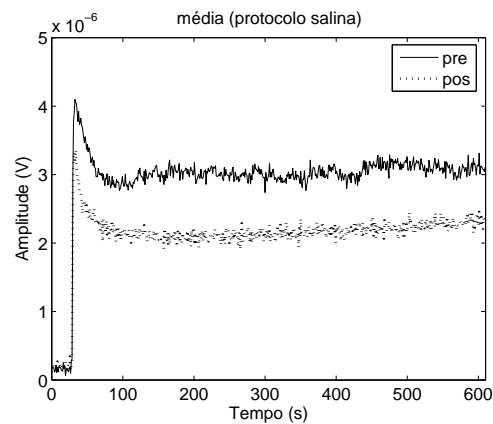


Figura 5.4: Médias das ASSRs pré-salina (linha contínua) e pós-salina (linha pontilhada).

Nota-se que as ASSRs apresentam valores reduzidos após da micro-injeção de salina.

5.4.2 Micro-injeção de bicuculina

O efeito da inibição das inter-conexões GABAérgicas nas ASSRs foi testado neste protocolo. Na Fig. 5.5, são mostrados as ASSRs de todos os animais deste protocolo antes da micro-injeção. Na Fig. 5.6, as ASSRs me-

didadas logo após injeção de salina são mostradas. Os valores médios destas duas figuras são mostrados na Fig. 5.7.

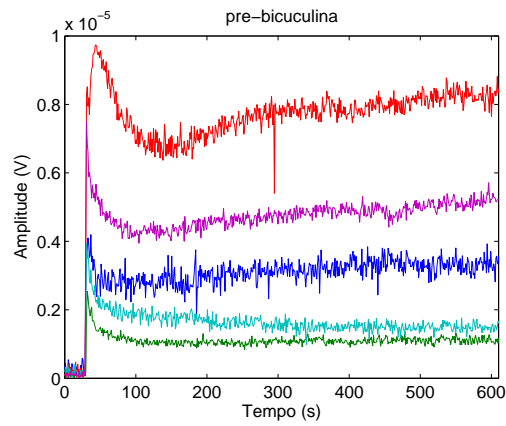


Figura 5.5: ASSRs de todos os animais medidas antes da micro-injeção de bicuculina.

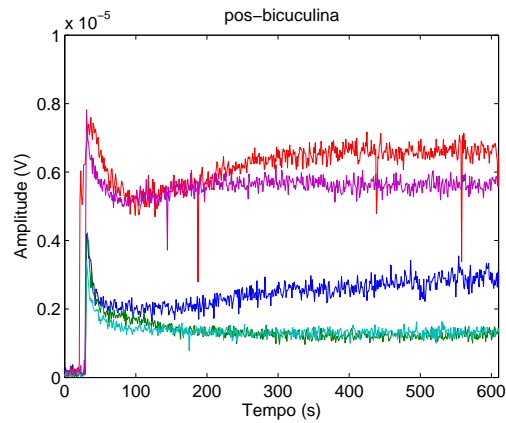


Figura 5.6: ASSRs de todos os animais medidas após da micro-injeção de bicuculina.

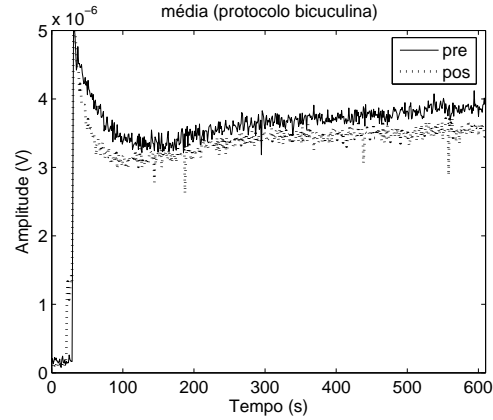


Figura 5.7: Médias das ASSRs pré-bicuculina (linha contínua) e pós-bicuculina (linha pontilhada).

Neste caso, observa-se que, após a micro-injeção de bicuculina, a diferença entre as respostas pré e pós micro-injeção diminuem. Adicionalmente, um estudo do nível de ruído antes e depois das micro-injeções foi realizado e mostrado nas Figs 5.8 e 5.9, respectivamente, para salina e bicuculina. O ruído foi estimado como a amplitude média de 20 valores adjacentes à frequência moduladora do estímulo.

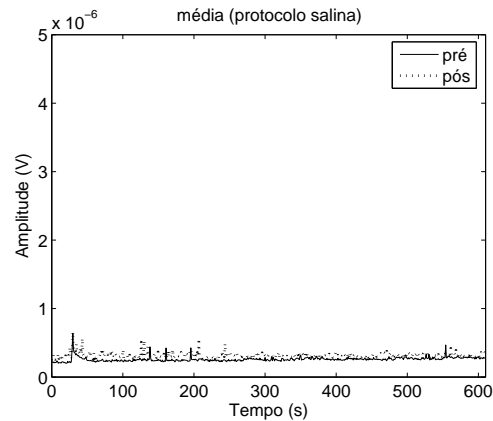


Figura 5.8: Ruído médio nas bandas adjacentes à frequência moduladora. Ruído anterior a micro-injeção de salina (linha contínua) e ruído posterior a micro-injeção de salina (linha pontilhada)

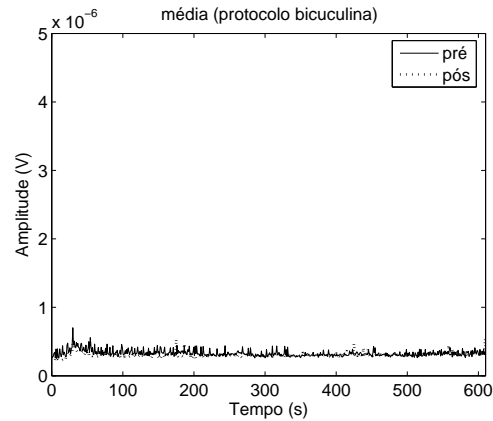


Figura 5.9: Ruído médio nas bandas adjacentes à frequência moduladora. Ruído anterior a micro-injeção de bicuculina (linha contínua) e ruído posterior a micro-injeção de bicuculina (linha pontilhada)

Estes resultados demonstram que o nível de ruído não foi aumentado substancialmente pelas micro-injeções. Na Fig. 5.10 é mostrada a média das diferenças das respostas pós e pré micro-injeção. O efeito de potenciação pode ser novamente observado, pois no protocolo bicuculina as respostas pós diminuíram menos.

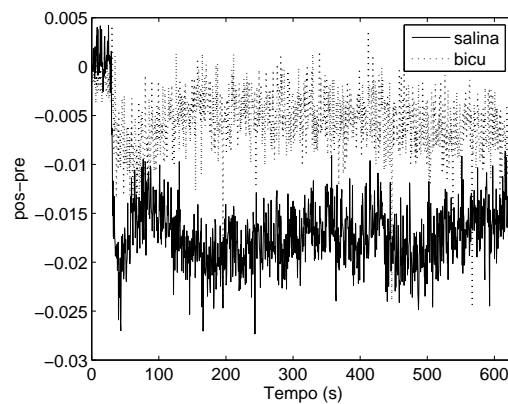


Figura 5.10: Deltas pós - pré microinjeção

5.5 Discussão

A micro-injeção de bicuculina causa uma inibição do efeito inibidor do neurotransmissor GABA na região da injeção. Em função desse efeito, nota-se, através da Fig. 5.7, que as ASSRS foram potenciadas em comparação com as ASSRs medidas após micro-injeção de salina.

A deficiência de GABA no IC possivelmente causa uma potenciação das ASSRs. Conforme visto na Fig. 5.4, existe uma considerável diminuição da ASSR após 10 min de estimulação, o que pode ser causado por mecanismos neurais de acomodação. Esta diminuição na resposta é revertida quando bicuculina é injetada, tornando as respostas pré e pós-bicuculina mais próximas em amplitude (ver Fig. 5.7). Todavia, não se esperava que a injeção de salina, considerada inerte para este estudo, causasse uma diminuição como a apresentada na Fig. 5.4. Isto sugere que talvez a injeção de salina esteja alterando o sistema, de tal forma que um grupo controle sem injeção de substâncias deva ser implementado. De qualquer forma, como a bicuculina foi diluída em salina, a alteração é a mesma para os dois protocolos, não excluindo, assim, as discussões sobre o efeito da bicuculina nas ASSRs observado na Fig. 5.7. Dessa forma, estes resultados sugerem que o efeito de uma deficiência GABAérgica no CI pode ser avaliado pela amplitude das ASSRs.

A região cerebral onde o registro foi efetuado contém vários tipos de neurônios, e não somente neurônios responsivos a um tom de 4 kHz modulado a 105 Hz. Como a injeção de bicuculina aumenta a excitabilidade de todos estes neurônios, seria possível que um aumento do nível de ruído fosse observado. Isto, inclusive, explicaria o aumento de energia na faixa da moduladora, pois este ruído adicionado aumentaria a energia de todas as bandas de frequência do espectro (caso o ruído fosse branco). Todavia, essa hipótese foi rejeitada através da análise dos ruídos mostrada nas Figs. 5.8 e 5.9. Estes resultados mostram que o nível de ruído não foi alterado significativamente pelas micro-injeções.

Dessa forma, uma possível explicação para o aumento da energia na moduladora após inibição dos neurônios GABAérgicos é que as sinapses GABAérgicas que promoviam uma inibição lateral de neurônios com BMFs diferentes foram removidas. Assim, uma faixa maior de neurônios puderam ser sincronizados com a moduladora do estímulo, ocasionando, portanto, o aumento de energia na moduladora observado.

Capítulo 6

Discussão e conclusão finais

Os resultados mostrados neste trabalho indicam que técnicas ORD podem ser usadas na detecção de ASSRs para exames audiológicos. Todavia, alguns cuidados devem ser tomados para que a detecção das respostas evocadas não incida em erros de procedimento.

Inicialmente, deve-se tomar cuidado com a frequência moduladora do tom que se deseja testar. Conforme visto na seção 3.4, a frequência de modulação deve ser escolhida *a priori* de tal modo que se garanta um número primo de ciclos dessa moduladora dentro da janela temporal usada na análise espectral. Se esse critério não for atendido, o espectro torna-se contaminado por espalhamento espectral, tornando a estimativa da amplitude da ASSRs susceptível a erros devido a artefato matemático. Este artifício de correção garante estimativas de espectro livre de artefatos.

O procedimento de correção *a priori* motivou os estudos mostrados na seção 3.5. Para o caso de detecção em sinais já digitalizados e nos quais as recomendações de amostragem sincronizada não tiverem sido atendidas, pode-se diminuir os efeitos do espalhamento usando técnicas *a posteriori*. Assim, em função das simulações mostradas na seção 3.5, conclui-se que, para a detecção objetiva de sinais desconhecidos em meios ruidosos, o teste F espectral precedido do algoritmo de correção do espectro de Kang (Kang et al., 1999) é a ferramenta indicada. É importante argumentar que a melhora alcançada pelo teste F parece estar associada ao melhor desempenho do algoritmo de Kang na resolução do módulo da FFT em detrimento da fase. Portanto, procedimentos de correção da fase mais eficientes poderiam melhorar também a performance dos detectores CSM e MSC.

Um estudo do comportamento dinâmico das ASSRs foi realizado no Cap. 4 em ratos Wistar. Como mencionado anteriormente, as conclusões geradas por estes resultados podem ser, na maioria das vezes, estendidas para a aplicação em humanos, devido à similaridade das estruturas envolvidas

no processamento da via auditiva primária (Picton et al., 2003; Joris et al., 2004). De acordo com a Fig. 4.6, um aumento na profundidade de modulação sempre causa um aumento na amplitude da ASSR. Portanto, o valor 100% deste parâmetro deve ser usado para evocar a ASSR de amplitude máxima possível. Além disso, sugere-se que a monitoração da ASSR durante a variação deste parâmetro possa ser usado como ferramenta de teste de deficiências no processamento central da audição, pois nossos resultados sugerem que a sincronização de substratos neurais diferentes estão associados à profundidades de modulação diferentes. Este procedimento uniria as características espectrais robustas das ASSRs com a capacidade de localização de geradores neurais, sendo então uma alternativa ao ABR. Todavia, estudos complementares são necessários, tanto para verificação da hipótese, quanto para quantificação dos padrões de normalidade para posterior comparação de resultados de pacientes.

A análise da Fig. 4.11 mostra que existe um nível de pressão sonora limiar para o qual a ASSR evocada não aumenta em amplitude. Neste caso, aumentar o nível de pressão sonora não causaria aumento da resposta mas, em vez disso, causaria apenas incômodo ao paciente. A correspondência entre o valor do parâmetro A na eq. (2.6) e o nível de pressão sonora dependerá do sistema gerador de estímulo utilizado.

Como visto na Fig. 4.16, o procedimento de varredura de portadora pode ser uma alternativa para realização de um audiômetro automático, pois é possível testar várias bandas de frequência num único exame, não importando necessariamente quais bandas sejam essas. Esta é uma vantagem em relação às ASSRs múltiplas, pois, de acordo com Picton et al. (2001), as ASSRs múltiplas só podem ser evocadas simultaneamente para valores de frequência portadoras distantes de pelo menos uma oitava uma da outra. Além disso, percebe-se que não existe histerese considerável na banda de frequências testada.

Os resultados mostrados na Fig. 4.22, mostram que as ASSRs apresentam amplitude máxima quando a frequência moduladora encontra-se na faixa de 150-250 Hz. Além disso, uma seqüência anterógrada de apresentação de moduladoras evoca respostas sistematicamente maiores que uma apresentação retrógrada. Picton et al. (2003) mencionam que, para humanos, a banda de frequência moduladora que evoca as respostas de maior amplitude estão na faixa de 80 a 100 Hz. Este resultado contradicente pode ser explicado pelo fato de os estudos em humanos serem conduzidos de forma não-invasiva, através do EEG, o que faz com que os sinais sejam registrados após a passagem pelas meninges e crânio, que são filtros passa-baixa por natureza (Pfurtscheller e Cooper, 1975). Portanto, a faixa de 150-250 Hz para moduladora não deve ser usada em exames clínicos, mas a apresentação dos estímulos com

moduladoras em seqüência crescente é recomendada.

Os resultados do capítulo 5 sugerem que as ASSRs podem ser úteis na detecção de deficiências do SNC. No nosso caso, um desequilíbrio do sistema inibitório GABAérgico foi causado através de uma substância antagonista e, em consequência, a amplitude das respostas evocadas se mostrou aumentada. Este resultado pode ser generalizado para diagnóstico de enfermidades que causem algum tipo de hiperexcitabilidade neural. Patologias neurais de cunho genético, e.g. epilepsias decorrentes de canalopatias, associadas a hiperexcitabilidade neural poderiam influenciar a via auditiva primária de forma semelhante a outras áreas cerebrais. Portanto, seriam esperadas alterações no ASSR semelhantes àquelas descritas no capítulo 5. Todavia, como mencionado no capítulo 1, a associação entre neurotransmissor e função deve ser feita com cuidado, pois existem vários tipos de neurônios num circuito neural associado a uma função. Para que este procedimento se torne viável, é necessário repetir o experimento do capítulo 5 para outros neurotransmissores e para drogas agonistas.

Finalmente, pode-se dizer que a aplicação de técnicas espectrais são úteis para a detecção de ASSRs, desde que tomadas as devidas precauções contra o espalhamento espectral. Além disso, técnicas de varredura mostraram-se alternativas viáveis para detecção e diagnóstico de deficiências na via auditiva primária. Os resultados mostrados neste trabalho foram realizados a partir do LFP de cobaias coletado durante estimulação, sinal este cuja SNR é alta. Todavia, o registro de EEG em humanos tem SNR reduzida e, portanto, sugere-se que as varreduras em humanos sejam realizadas seguidas vezes e promediadas para aumento da SNR. Os resultados da aplicação da bicuculina sugerem que a análise espectral pode revelar possíveis potenciações nas ASSRs, credenciando assim técnicas espectrais, como as funções ORD, a serem usadas como ferramentas de suporte ao médico para o diagnóstico.

6.1 Trabalhos futuros

- Desenvolvimento de método eficiente de correção *a posteriori* de espectros distorcidos por espalhamento. É necessário utilizar/desenvolver métodos hábeis de correção da fase do espectro.
- Propor metodologia para utilização de ASSRs para localização de lesões na via auditiva primária a partir do estudo da variação destas respostas com a profundidade de modulação dos estímulos
- Implementação de um audiômetro objetivo baseado em técnicas ORD e que contemple as informações quantificadas no capítulo 4.

- Verificação da aplicabilidade de ASSRs no diagnóstico de neuropatias.

Capítulo 7

Anexo

Bibliografia

- M. Aoyagi, T. Kiren, Y. Kim, Y. Suzuki, T. Fuse, e Y. Koike. Optimal modulation frequency for amplitude modulation following response in young children during sleep. *Hear. Res.*, 65(1-2):253–261, Feb 1993.
- A. J. Aude. A tutorial in coherent and windowed sampling with a/d converters. *Intersil Application Note*, AN9675:1–8, 1997.
- E. P. Azevedo. *Determinação da Banda de Máxima Resposta do Potencial Evocado Auditivo de Curta Latência por meio da Magnitude Quadrática da Coerência*. Dissertação de mestrado do Programa de Engenharia Biomédica, COPPE/UFRJ, 2003.
- A. Bagri, G. Sandner e G. Di Scala. Effects of unilateral microinjections of gabaergic drugs into the inferior colliculus on auditory evoked potentials and on audiogenic seizure susceptibility. *Experimental Neurology*, 104(2): 82–87, 1989.
- J. S. Bendat e A. G. Piersol. *Random Data Analysis and Measurement Procedures*. New York: Wiley-Interscience, 2nd edition, 1986.
- W. E. Brownell. Outer hair cell electromotility and otoacoustic emissions. *Ear Hear.*, 11(2):82–92, 1990.
- N. G. Cairasco. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear. Res.*, 168(1):208–222, 2002.
- D. M. Caspary, P. S. Palombi e L. F. Hughes. Gabaergic inputs shape responses to amplitude modulated stimuli in the inferior colliculus. *Hear. Res.*, 168(1):163–173, 2002.
- G. Celesia. Visual evoked potentials and electroencephalograms. *In: Niedermeyer, E., Lopes da Silva, F. H (eds), Electroencephalography - Basic principles, Clinical Applications and Related Fields*, 1998. cap. 10.

- K. H. Chiappa. *Evoked Potentials in Clinical Medicine*. New York: Raven Press, 2nd edition, 1997.
- L. T. Cohen, F. W. Rickards e G. M. Clark. A comparison of steady-state evoked potentials to modulated tones in awake and sleeping humans. *J. Acoust. Soc. Am.*, 90(5):2467–2479, 1991.
- P. Dallos. The active cochlea. *Journal of Neuroscience*, 12(12):4575–4585, 1992.
- A. Dimitrijevic, M. S. John, P. Van Roon, D. W. Purcell, J. Adamonis, J. Ostroff, J. M. Nedzelski e T. W. Picton. Estimating the audiogram using multiple auditory steady-state responses. *J. Am. Acad. Audiol.*, 13: 205–224, 2002.
- R. A. Dobie e M. J. Wilson. Analysis of auditory evoked responses by magnitude squared coherence. *Ear Hearing*, 10:2–13, 1989.
- R. A. Dobie e M. J. Wilson. Objective detection in the frequency domain. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 88:516–524, 1993.
- W. F. Dolphin e D. C. Mountain. The envelope following response - scalp potentials elicited in the mongolian gerbil using sinusoidally am acoustic signals. *Hear. Res.*, 58(1):70–78, 1992.
- H. Donald, R. J. Salvi, F. A. Boettcher e A. E. Clock. Correlatos neurofisiológicos da perda auditiva neurosensorial. In: *Katz, J. (editor), Tratado de Audiologia Clínica*, 1999. 4 ed., Manole Ltda.
- H. Fastl. Spectral characteristics of the responses of primary auditory-nerve fibers to amplitude-modulated signals. *Hear Res.*, 46(2):293–295, 1990.
- L. B. Felix, J. E. Moraes, A. M. F. L. Miranda de Sá, H. C. Yehia e M. F. D. Moraes. Avoiding spectral leakage in objective detection of auditory steady-state evoked responses in the inferior colliculus of rat using coherence. *J. Neurosci. Meth.*, 144(2):249–255, JUN 2005.
- L. B. Felix, A. M. F. L. Miranda de Sá, E. M. A. M. Mendes e M. F. D. Moraes. Statistical aspects concerning signal coherence applied to randomly modulated periodic signals. *IEEE Signal Proc. Let.*, 13(2):254–259, 2006.
- J. Fridman, R. Zappula, M. Bergelson, E. Greenblatt, L. Malis, F. Morrell e T. Hoeppepner. Application of phase spectral analysis for brain stem auditory evoked potential detection in normal subjects and patients with posterior fossa tumors. *Audiology*, 23(1):99–113, 1984.

- R. Galambos, S. Makeig e P. J. Talmachoff. A 40 hz auditory potential recorded from the human scalp. *P. Natl. Acad. Sci-Biol.*, 78(4):2643–2647, 1981.
- C. D. Geisler. Coding of acoustic signals on the auditory nerve. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 6(2):22–28, 1987.
- I. A. Ginsberg e T. P. White. Considerações otológicas em audiologia. In: *Katz, J. (editor), Tratado de Audiologia Clínica*, 1999. 4 ed., Manole Ltda.
- M. J. Hinich. A statistical theory of signal coherence. *IEEE J. Ocean. Eng.*, 25(2):254–259, 2000.
- A. J. Hudspeth. Hearing. In: *Kandell, E.R., Schwartz, J.H. e Jessel, T.M., Principles of Neural Science*, 2000. Chapter 30, 4 ed., McGraw-Hill.
- M. S. John, O. G. Lins, B. L. Boucher e T. W. Picton. Multiple auditory steady-state responses (master): Stimulus and recording parameters. *Audiology*, 37(1):59–82, 1998.
- P. X. Joris, C. E. Schreiner e A. Rees. Neural processing of amplitude-modulated sounds. *Physiol. Rev.*, 84(1):541–577, 2004.
- E. R. Kandell, J. H. Schwartz e T. M. Jessel. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, 2000.
- D. Kang, X. Ming e Z. Xiaofei. Phase difference correction method for phase and frequency in spectral analysis. *Mech. Syst. Signal Pr*, 14(5):835–843, 1999.
- S. M. Kay. *Fundamentals of Statistical Signal Processing: Detection Theory*. Prentice Hall, 1998.
- S. M. Khanna e M. C. Teich. Spectral characteristics of the responses of primary auditory-nerve fibers to amplitude-modulated signals. *Hear. Res.*, 39(1):143–157, 1989.
- B. S. Krishna e M. N. Semple. Spectral characteristics of the responses of primary auditory-nerve fibers to amplitude-modulated signals. *J. Neurophysiol.*, 84(3):255–273, 2000.
- S. Kuwada, R. Batra e V. I. Maher. Scalp potentials of normal and hearing-impaired subjects in response to sinusoidally amplitude modulated tones. *Hear. Res.*, 21(2):179–192, 1986.

- E. C. Levi, R. C. Folsom e R. A. Dobie. Amplitude modulation following response (amfr) - effects of modulation rate, carrier frequency, age and state. *Hear. Res.*, 68(1):42–52, 1993.
- R. D. Linden, K. B. Campbell, G. Hamel e T. W. Picton. Human auditory steady-state potentials during sleep. *Ear Hearing*, 6(1):167–174, 1985.
- O. G. Lins e T. W. Picton. Auditory steady-state responses to multiple simultaneous stimuli. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 96:420–432, 1995.
- K. V. Mardia. *Statistics of Directional Data*. London, Academic Press, 1972.
- A. M. F. L. Miranda de Sá. *Técnicas para a Análise do EEG durante Fotoestimulação Intermitente*. Tese de doutorado do Programa de Engenharia Biomédica, COPPE/UFRJ, 2000.
- A. M. F. L. Miranda de Sá e L. B. Felix. Improving the detection of evoked responses to periodic stimulation by using multiple coherence - application to eeg during photic stimulation. *Med Eng Phys*, 24(4):245–252, 2002.
- A. M. F. L. Miranda de Sá e L. B. Felix. Multi-channel evoked response detection using only phase information. *J. Neurosci. Meth.*, 129:1–10, 2003.
- A. M. F. L. Miranda de Sá e A. F. C. Infantosi. A coherence-based technique for evaluating the degree of synchronism in the eeg during sensory stimulation. *Rev. Bras. Eng. Bioméd.*, 18(1):39–49, 2002.
- A. M. F. L. Miranda de Sá, A. F. C. I. Infantosi e D. M. Simpson. Coherence between one random and one periodic signal for measuring the strength of responses in the electroencephalogram during sensory stimulation. *Med. Bio. Eng. Comput.*, 40(1):99–104, 2002.
- A. M. F. L. Miranda de Sá, L. B. Felix e A. F. C. Infantosi. A matrix-based algorithm for estimating multiple coherence of a periodic signal and its application to the multi-channel eeg during sensory stimulation. *IEEE T. Bio-Med. Eng.*, 51(7):1140–1146, 2004.
- M. F. D. Moraes e N. Garcia-Cairasco. Real time mapping of rat midbrain neural circuitry using auditory evoked potentials. *Hear. Res.*, 161:35–44, 2001.
- M. F. D. Moraes, F. Del Vecchio, V. C. Terra e N. Garcia-Cairasco. Time evolution of acoustic "information" processing in the mesencephalon of wistar rats. *Neurosci. Lett.*, 284:13–16, 2000.

- A. M. Norcia, C. W. Tyler, R. D. Hamer e Wesemamm W. Measurement of spatial contrast sensitivity with the sweptcontrast vep. *Vision Res.*, 29(1): 627–637, 1989.
- E. Nunzi, P. Carbone e D. Petri. A procedure for highly reproducible measurements of adc spectral parameters. *IEEE Trans. Instr. Meas.*, 52(4): 1279–1283, 2003.
- C. W. Parkins. Cochlear implant: a sensory prosthesis frontier. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 2(2):18–26, 1983.
- G. Paxinos e C. Watson. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 4th edition edition, 1998.
- G. Pfurtscheller e R. Cooper. Frequency dependence of the transmission of the eeg from cortex to scalp. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 71(1): 289–295, jan. 1975.
- T. W. Picton, A. Dimitrijevic, M. S. John e P. Van Roon. The use of phase in the detection of auditory steady-state responses. *Clin. Neurophysiol.*, 112(9):1698–1711, 2001.
- T. W. Picton, M. S. John, Dimitrijevic and A. D. Purcell. Human auditory steady-state responses. *Int. J. Audiol.*, 42(4):177–219, 2003.
- G. Plourde e T. W. Picton. Human auditory steady-state response during general anesthesia. *Anesth. Analg.*, 71(5):460–468, Nov. 1990.
- G. D. Pollak, R. M. Burger e A. Klug. Dissecting the circuitry of the auditory system. *Trends in Neuroscience*, 26(1):33–39, 2003.
- D. Regan. Rapid objective refraction using evoked brain potentials. *Invest. Ophthalmol.*, 12(9):669–679, 1973.
- F. W. Rickards, L. E. Tan, L. T. Cohen, O. J. Wilson, J. H. Drew e G. M. Clark. Auditory steady-state evoked potential in newborns. *Brit. J. Audiol.*, 28(6):327–337, Dec. 1994.
- D. J. Simpson, C. J. Tierra-Criollo, E. J. B. Zayen, R. T. Leite e A. F. C. Infantosi. Objective response detection in an electroencephalogram during somatosensorial stimulation. *Ann. Biomed. Eng.*, 28(6):691–698, 2000.
- D. R. Stapells, S. Makeig e R. Galambos. Auditory steady-state responses: Threshold prediction using phase coherence. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 67:260–270, 1987.

- D. R. Stapells, R. Galambos, J. A. Costello e S. Makeig. Inconsistency of auditory middle latency and steady-state responses in infants. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 71(4):289–295, JUL-AUG 1988.
- I. Steibler e G. Ehret. Inferior colliculus of the house mouse. i. a quantitative study of tonotopic organization, frequency representation and tone-threshold distribution. *J. Comp. Neurol.*, 238(1):65–76, 1985.
- W. R. Webster, J. Serviere, R. Martin e M. Brown. Uncrossed and crossed inhibition in the inferior colliculus of the cat: a combined 2-deoxyglucose and electrophysiological study. *The Journal of Neuroscience*, 5(7):1820–1832, 1985.
- J. Xi e L. F. Chicaro. A new algorithm for improving the accuracy of periodic signal analysis. *IEEE Trans. Instr. Meas.*, 45(4):827–830, 1996.