

Laboratório de Modelagem, Análise e Controle de Sistemas Não-Lineares

Departamento de Engenharia Eletrônica

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG Brasil

Fone: +55 3499-4866 - Fax: +55 3499-4850



---

# Detecção e Caracterização de Crises Epilépticas Através de Estimulação Elétrica

---

**Luciano Borges Oliveira**

Dissertação submetida 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 Mestre em Engenharia Elétrica.

**Orientador:** Prof. Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes, PhD  
**Co-orientador:** Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes, PhD

Belo Horizonte, março de 2013



---

---

# Agradecimentos

---

A Deus, por prover todo o caminho que me fez chegar até aqui.

À minha esposa, Rachel, pela atenta companhia, que alegra o meu viver.

Ao meu orientador, Eduardo, pela paciência e perseverança.

Ao meu co-orientador, Márcio, pelas lições de vida.

Ao Daniel e Fábio por me ensinarem como é trabalhar em conjunto com profissionais de outras áreas e pelas conversas na hora do café.

À minha família, sempre torcendo de longe pelo sucesso.

A todos os meus colegas que me tornaram o que são, e pelas opiniões sempre bem-vindas...

Aos ratinhos que se submeteram ao experimento sem saber o que estava acontecendo, suas mortes não serão em vão...





---

---

# Sumário

---

<b>Resumo</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Siglas</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Predição de Crises Epilépticas . . . . .	4
1.2 Objetivos do Trabalho . . . . .	6
1.3 Organização do Texto . . . . .	6
<b>2 Revisão das Análises e Modelos para Previsão de Crises Epilépticas Existentes e Caracterização do Experimento Realizado</b>	<b>9</b>
2.1 A Previsão de Crises . . . . .	9
2.1.1 O Estudo do EEG . . . . .	9
2.1.2 Análise dos Potenciais de Ação . . . . .	11
2.1.3 Estado Atual: Limitações e Tendências . . . . .	13
2.2 Modelos Experimentais para Epilepsia . . . . .	13
2.3 Experimento Realizado . . . . .	14
2.4 Conclusão do Capítulo . . . . .	16
<b>3 Análise no Domínio do Tempo dos Sinais de EEG</b>	<b>17</b>
3.1 Pré-processamento . . . . .	17
3.1.1 Validação dos Grupos de Controle . . . . .	19
3.2 Caracterização da Evolução Temporal do Sinal . . . . .	20
3.2.1 Análises Preliminares . . . . .	20
3.2.2 Organização do Sinal . . . . .	21
3.2.3 Máximo Expoente de Lyapunov . . . . .	22
3.2.4 Dimensão Fractal . . . . .	23
3.2.5 Validação Estatística . . . . .	24
3.3 Resultados e Discussão . . . . .	25
3.3.1 Validação dos Dados . . . . .	25
3.3.2 Comparação das Análises Temporais . . . . .	26

3.4	Conclusão do Capítulo . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Caracterização da Evolução Neural no Período Pré-Crise Epiléptica</b>	<b>31</b>
4.1	Detecção Automática . . . . .	31
4.1.1	Classificação . . . . .	33
4.2	Detecção Forçada . . . . .	35
4.3	Resultados e Discussão . . . . .	39
4.4	Conclusão do Capítulo . . . . .	41
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	<b>43</b>
5.1	Atendimento aos Objetivos Iniciais . . . . .	43
5.2	Publicações Feitas . . . . .	44
5.3	Trabalhos Futuros . . . . .	45
5.4	Considerações Finais . . . . .	45
	<b>Bibliografia</b>	<b>47</b>
<b>A</b>	<b>Rotinas em Matlab</b>	<b>55</b>
A.1	Pré-processamento . . . . .	55
A.2	Análises Temporais . . . . .	56
A.3	Detecção Automática . . . . .	59
A.4	Detecção Forçada . . . . .	62
<b>B</b>	<b>Resultados Completos por Animal</b>	<b>65</b>
<b>C</b>	<b>Certificado do Experimento</b>	<b>91</b>

---

# Resumo

---

A epilepsia é uma doença altamente debilitante, marcada pela imprevisibilidade de seus surtos, as crises epiléticas. A predição destas crises é uma tarefa indispensável para um controle mais eficiente da doença, que necessita, no momento, de tratamento contínuo e carece de um método que execute esta previsão de modo confiável. Ultimamente tem sido proposta a utilização de estimulação elétrica como forma de sondagem da rede cerebral, auxiliando a previsão. O presente trabalho apresenta estudos iniciais sobre o processamento do EEG proveniente de ratos submetidos a um protocolo de crise epilética induzida (através de PTZ) juntamente a estimulação elétrica. Após validados os grupos de controle, resultados mostram a ocorrência de forte sincronização dos disparos interictais com a estimulação elétrica momentos antes da crise, servindo como um indicador inequívoco de iminência de crise. A caracterização da evolução dos vários circuitos neurais ao longo do registro mostra ainda a organização gradativa da rede cerebral até o momento da crise, mostrando-se um método (de eficiência ainda não comprovada pelas limitações do estudo) potencial para integração de um sistema em malha fechada para previsão e supressão de crises epiléticas.



---

# Abstract

---

Epilepsy is a highly debilitating disease, marked by the imprevisibility of its seizures. Seizure prediction is an essential tool for a more efficient control over the disease, which is, currently, treated in a continuous fashion, lacking a method to reliably foresee the moment of the seizure and treat the disease only when needed. Recently, a new approach for seizure prediction has been suggested, based on electrical stimulation as means of probing the neural network to assess the status of the brain. The present work shows preliminary studies in signal processing of EEG data, collected in an experiment where rats are submitted to pro-epileptic drug infusion (PTZ) together with electrical stimulation in the brain. Validating the control groups, it has been found that the interictal discharges slowly synchronize with the stimulus, settling in different moments, but altogether with great temporal coupling, which raises the possibility of developing a closed-loop device for prediction and suppression of epileptic seizures.



---

# Lista de Figuras

---

1.1	Potencial de ação e fluxos de íons geradores . . . . .	2
1.2	Modelos de evolução de uma crise epiléptica . . . . .	5
2.1	Histórico de diferentes métodos de previsão . . . . .	10
2.2	Alinhamento temporal de ondas extraídas . . . . .	12
2.3	Diagrama do experimento . . . . .	15
3.1	Pré-processamento dos dados . . . . .	18
3.2	Detecção da crise epiléptica . . . . .	19
3.3	Cálculo de sincronia de potencial de ação com o estímulo . . . . .	21
3.4	Expoentes de Lyapunov . . . . .	22
3.5	Parâmetros para cálculo do expoente de Lyapunov . . . . .	23
3.6	Validação do grupo PTZ . . . . .	25
3.7	Análise histológica do posicionamento dos eletrodos por animal . . . . .	27
3.8	Análises temporais por animal . . . . .	28
3.9	Análises temporais médias por grupo . . . . .	29
3.10	Unicidade do grupo de teste para todas as análises ao longo do tempo . . . . .	29
4.1	Determinação da duração da janela de corte . . . . .	32
4.2	Algoritmo de detecção automática . . . . .	33
4.3	Métodos de decomposição testados . . . . .	34
4.4	Algoritmo de detecção automática . . . . .	36
4.5	Comparação de análises temporais para detecção . . . . .	37
4.6	Algoritmo de detecção forçada . . . . .	38
4.7	Comparação entre detecções automática e forçada . . . . .	40
4.8	Estimação de recorrência temporal para um animal do grupo <i>PTZ</i> . . . . .	41
B.1	Estrutura de apresentação dos resultados completos . . . . .	65
B.2	Animal 01 (+) . . . . .	66
B.3	Animal 03 (+) . . . . .	67
B.4	Animal 07 (-) . . . . .	68
B.5	Animal 08 (-) . . . . .	69
B.6	Animal 09 (-) . . . . .	70
B.7	Animal 10 (-) . . . . .	71
B.8	Animal 11 (-) . . . . .	72
B.9	Animal 12 (+) . . . . .	73
B.10	Animal 13 (-) . . . . .	74
B.11	Animal 14 (-) . . . . .	75

B.12 Animal 15 (-)	76
B.13 Animal 16 (-)	77
B.14 Animal 17 (+)	78
B.15 Animal 18 (+)	79
B.16 Animal 19 (+)	80
B.17 Animal 20 (PTZ)	81
B.18 Animal 21 (PTZ)	82
B.19 Animal 22 (PTZ)	83
B.20 Animal 23 (PTZ)	84
B.21 Animal 24 (PTZ)	85
B.22 Animal 25 (PTZ)	86
B.23 Animal 26 (EE)	87
B.24 Animal 27 (EE)	87
B.25 Animal 28 (EE)	88
B.26 Animal 29 (EE)	88
B.27 Animal 30 (EE)	89
B.28 Animal 31 (EE)	89



---

# Lista de Siglas

---

AR	Autorregressiva (modelagem)
EE	Estimulação Elétrica (grupo de controle 2)
EEG	Eletroencefalograma
ELT	Epilepsia de Lobo Temporal
GEPR	<i>Genetically Epilepsy Prone Rat</i> Rato Geneticamente Propenso à Epilepsia
IBE	<i>International Bureau for Epilepsy</i> Escritório Central para Epilepsia
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i> Liga Internacional contra a Epilepsia
MACSIN	Modelagem, Análise e Controle de Sistemas Não Lineares
NNC	Núcleo de Neurociências
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> Análise por Componentes Principais
PTZ	Pentilenotetrazol (droga / grupo de controle 1 do experimento)
PTZ+EE	Injeção de pentilenotetrazol acrescida de estimulação elétrica (grupo de teste)
PTZ+EE(+)	Subgrupo PTZ+EE com resposta positiva de potencial evocado
PTZ+EE(-)	Subgrupo PTZ+EE sem potencial evocado
SOM	<i>Self-Organizing Maps</i> – Mapas Auto-Organizáveis
SVM	<i>Support Vector Machines</i> – Máquinas de Vetor de Suporte
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial de Saúde



# Introdução

---

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a epilepsia é um mal que aflige cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo uma das desordens neurológicas de maior ocorrência (World Health Organization, 2012). É caracterizada como uma disfunção no funcionamento de um grupo de neurônios no cérebro, que entrando em atividade excessiva, simultânea e síncrona, cessam seu funcionamento normal, o que é transmitido às regiões por eles controladas. Sendo assim, há uma variedade de efeitos, como perda momentânea de consciência, controle muscular e comportamental em um indivíduo, dependendo da área do cérebro atingida (Guerreiro et al., 2000).

Tendo efeitos tão variados, a epilepsia é considerada uma doença altamente debilitante, adicionando-se o fato de que até o presente momento, o instante em que estas disfunções (denominadas "crises epilépticas") ocorrem não pode ser previsto com boa precisão, impedindo uma pessoa portadora deste mal de executar muitas atividades rotineiras em que tal perda de controle acarretaria sérios problemas de segurança (Schulze-Bonhage and Kühn, 2008).

Como grande parte das disfunções do sistema nervoso central (SNC), as causas da epilepsia não são bem conhecidas, e as maneiras desenvolvidas para abordá-la são puramente descritivas, ou seja, também sem conhecimento preciso do mecanismo de ação (Nicoll, 2004). Apesar disto, um entendimento genérico da doença e seu tratamento pode ser obtido analisando o funcionamento das células que compõem o SNC: os neurônios.

## Aspectos Fisiológicos da Epilepsia

Os neurônios são células responsáveis pela comunicação no organismo, excitando e inibindo outras células, como fibras musculares ou outros neurônios. Estes se comunicam através de sinais elétricos, gerados a partir da troca de íons entre o interior e o exterior das células, feitos por meio de canais na membrana celular. A regulação (abertura e fechamento) destes canais é controlada por um de dois fatores: recepção de uma substância específica (neurotransmissor) – constituindo um canal regulado por ligante – ou através do campo elétrico causado pela diferença na concentração de íons na parte externa e interna da célula – os canais regulados por tensão (Nicoll, 2004). No caso destes, a ativação de um canal pode ativar outro canal semelhante e próximo, através do fluxo de íons resultante e nova tensão elétrica gerada, efeito que ao ocorrer em cascata resulta na transmissão de um sinal elétrico ao longo do neurônio. A Figura 1.1 exhibe um exemplo do denominado “potencial de ação”, uma assinatura de tensão elétrica observada entre meios extra e intracelular, além do fluxo de íons gerador de

cada mudança no potencial.

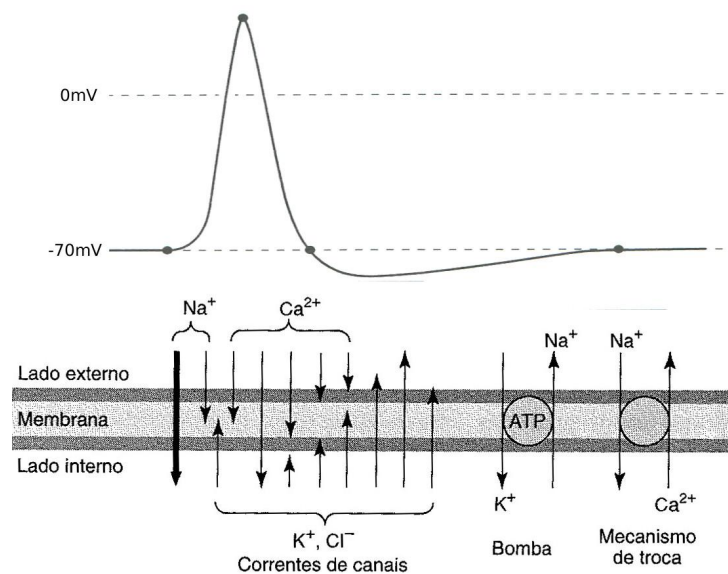


Figura 1.1: Potencial de ação e fluxos de íons geradores. Adaptado de Hume and Grant (2004)

Todo potencial de ação surge quando um neurônio recebe estimulação suficiente para atingir um limiar de tensão, e é acompanhado por um período de baixa tensão que evita disparos contínuos – o período refratário (Nicoll, 2004). O controle da frequência de disparo de um neurônio é tanto limitado por este período refratário quanto controlado pelas estimulações excitatórias e inibitórias que recebe de outros neurônios, que se concentram em regiões denominadas sinapses. Em cada sinapse, neurotransmissores são transmitidos entre as células – por exemplo, glutamato para excitação e ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) para inibição – aumentando e diminuindo a tensão interna até atingir o limiar para desencadeamento do potencial de ação, que é então retransmitido a outros neurônios, excitando-os ou inibindo-os (Hume and Grant, 2004).

A epilepsia é caracterizada por uma maior excitabilidade neural, que pode ser entendida como uma maior facilidade na ativação dos canais de membrana dos neurônios, especialmente os regulados por tensão, que não dependem de uma substância específica para ativação (Guerreiro et al., 2000). Isto faz com que haja maior transmissão de pulsos elétricos, além de facilitar a geração de pulsos em cascata, resultando em uma descarga síncrona de vários neurônios que cessam seu funcionamento normal e passam a enviar pulsos elétricos desenfreadamente.

## Tipos de Epilepsia

O efeito da epilepsia a nível celular é um só – a interrupção do funcionamento normal de um grupo de neurônios para geração descontrolada de potenciais de ação –, mas seu efeito macroscópico é bem variado, observando a diversidade de funções que diferentes grupos de neurônios desempenham no cérebro, controlando características distintas do funcionamento do corpo (Guerreiro et al., 2000). Por exemplo, em uma

pessoa, o disparo descontrolado em uma região do cérebro responsável pela audição pode causar respostas auditivas como escutar algum ruído ou ser acometido de surdez temporária. Em uma crise atingindo uma região de controle motor, há perda de comando sobre os músculos, podendo ocorrer movimentação involuntária, espasmos, etc. Se a crise acomete uma área cognitiva, há perda de consciência. Baseando-se nesta variedade de efeitos, foram propostas várias classificações para as epilepsias, de onde foi convencionado, pela Organização Mundial de Saúde e as principais organizações para estudo da epilepsia (World Health Organization et al., 2005), a classificação levando-se em conta:

- A região atingida: crise focal, generalizada ou parcialmente generalizada. Na crise focal, há a denominação de um “foco epiléptico”, uma região bem definida onde se originam os disparos síncronos. Quando a crise acomete todo o cérebro, é denominada generalizada, e quando há um foco epiléptico com posterior espalhamento ao resto do cérebro denomina-se crise parcialmente generalizada.
- O comportamento do indivíduo: simples (sem perda de consciência) ou complexa (com perda de consciência). Esta classificação é determinada pela região do cérebro acometida, e é exclusiva das crises locais, uma vez que toda crise generalizada é, necessariamente, complexa, pois envolve a região cognitiva do cérebro.

Apesar de as crises generalizadas envolverem todo o encéfalo, o modo em que isso ocorre pode ser diferente, o que resulta em uma grande variedade destas crises, entre as quais podemos citar, conforme revisão de Gram (1990), as crises mioclônicas (curtos abalos nos membros, durando de 1 a 5s, atingindo majoritariamente crianças e adolescentes), tônico-clônicas (“grande mal”, atinge todas as faixas etárias, caracterizada por convulsões, paradas respiratórias, espasmos musculares), de ausência (“pequeno mal”, comum em crianças: súbita perda de consciência por pouco menos de 30s) e a epilepsia de lobo temporal (ELT – uma crise parcial complexa com generalização secundária, normalmente em adultos, que sofrem alucinações e automatismos).

## Tratamento da Epilepsia

As causas da epilepsia não são bem compreendidas, logo não há uma maneira conhecida de se desfazer tal processo. A epilepsia, desta forma, não tem cura: é apenas controlada (Porter and Meldrum, 2004). Sob tratamento, no entanto, as crises são reduzidas e até mesmo extintas em alguns casos, com eventual redução na extensão do tratamento. Este é feito principalmente por três vias:

1. *Medicamentos*: Há uma série de fármacos com efeitos comprovados sobre as crises epiléticas, ainda que seus mecanismos de ação não sejam profundamente elucidados. Para cada tipo de crise, envolvendo regiões distintas do encéfalo, há diferentes medicamentos de ação mais expressiva. Podemos citar, por exemplo, fenitoína e carbamazepina para uso em crises parciais e tônico-clônicas generalizadas, e etosuximida e valproato para crises de ausência (Porter and Meldrum, 2004). Estima-se que cerca de 70% dos pacientes responda bem ao tratamento farmacológico.

2. *Cirurgia*: No caso da existência de um foco epiléptico bem determinado, é possível executar uma cirurgia de ablação (remoção da área), que evita o surgimento de crises posteriores ao custo da perda de uma área do cérebro e as funções a ela relacionadas. Esta prática é comum no caso de ELT, sendo neste caso mais eficiente que o tratamento medicamentoso (Harroud et al., 2012). Neste mesmo artigo de revisão cita-se o risco da continuação ou surgimento de outro tipo de crise, já que a região identificada pode não ser a verdadeira fonte do recrutamento neural (e sim uma região secundária, mas de maior expressão), ou a rede neuronal em si pode estar propensa ao desenvolvimento de outro foco epiléptico.
3. *Estimulação elétrica*: Em último caso, temos a possibilidade de simular um potencial de ação através da estimulação elétrica em algum nervo ou região do cérebro. Este tipo de tratamento é indicado para pacientes resistentes ao uso de medicamentos e onde não é possível ou segura a remoção do foco epiléptico. Estima-se que a estimulação força os neurônios a disparar e entrar em período refratário, cessando os disparos contínuos característicos da crise. A estimulação, na verdade, serve tanto para excitar como para inibir os disparos, dependendo da forma e frequência da excitação (Cota et al., 2009). A excitação do nervo vago (ENV) é um exemplo de tratamento por estimulação regulamentado e de aplicação difundida para uso humano (Elliot et al., 2011).

A grande incapacitação decorrente da epilepsia provém da baixa eficiência de seu tratamento – a ação direta sobre o sistema nervoso causa efeitos colaterais como sonolência e baixa capacidade de concentração (Porter and Meldrum, 2004), um preço alto a se pagar por uma doença que se manifesta durante alguns segundos em um período de dias, ou seja, em uma frequência extremamente baixa (Schulze-Bonhage and Kühn, 2008). Desta maneira, ao se desenvolverem novos tratamentos para a epilepsia, grande parte do esforço se destina à obtenção de formas de prever momentos de predisposição à sua manifestação ou mesmo a previsão da crise epiléptica em si, visando minimizar a carga de tratamento e torná-lo mais eficiente.

Uma das maneiras tradicionais de monitorar o cérebro à procura de possíveis focos epilépticos surgindo é através do eletroencefalograma (EEG), que registra os potenciais de ação combinados de toda a massa neural próxima aos eletrodos. Como a epilepsia se manifesta pelo comportamento anormal dos disparos entre neurônios, o estudo da dinâmica temporal do EEG pode quantificar esta mudança e dar indícios de uma futura crise, e é baseado nessa abordagem que o presente trabalho prossegue.

## 1.1 Predição de Crises Epilépticas

A epilepsia é marcada por variedade de efeitos. Apesar de a maioria das crises ocorrer abruptamente, uma pequena parte – cerca de 6% (Jachan et al., 2008) – é precedida de sinais característicos (mais uma vez exclusivos de cada paciente), sem contar as crises secundariamente generalizadas, em que a crise focal em ação evoca uma resposta sensorial ou psíquica denominada “aura” (Guerreiro et al., 2000).

Assumindo-se uma base comum na geração das crises, é intuitivo afirmar que existe algum mecanismo gradual para transformação desde um estado de atividade basal para um estado epiléptico, passando pelo denominado período pré-ictal, que se manifesta explicitamente em casos isolados (como os citados acima), e portanto existe de alguma forma em um caso geral. A assunção de que é possível a previsão da epilepsia baseia-se na existência deste período pré-ictal (Mormann et al., 2005), e os métodos preditivos focam na caracterização deste, buscando alguma informação que indique correlação com a ocorrência das crises (Winterhalder et al., 2003; Litt and Echauz, 2002).

Um tipo de modelagem matemática do fenômeno que consegue explicar essa ocorrência tanto abrupta quanto gradual é através de modelos dinâmicos não-lineares (Lopes da Silva et al., 2003a,b). Como pode ser observado na Figura 1.2, extraída de um artigo que adota esta visão (Kalitzin et al., 2010), tal modelo justifica a ocorrência abrupta de transições entre os estados basal e ictal (crise), assumindo que, em um espaço de estados genérico, um atrator caótico se faz presente (o atrator da dinâmica epiléptica). Conforme este atrator evolui, diferentes regiões do espaço de estados são encobertas, e ao englobar a vizinhança do estado atual da rede neuronal, esta é capturada e passa a agir segundo a dinâmica epiléptica. Caso essa atração ocorra no começo do desenvolvimento do atrator, temos uma evolução gradativa da rede neuronal, caso contrário, temos uma transição gradativa de um estado normal para um comportamento epiléptico.

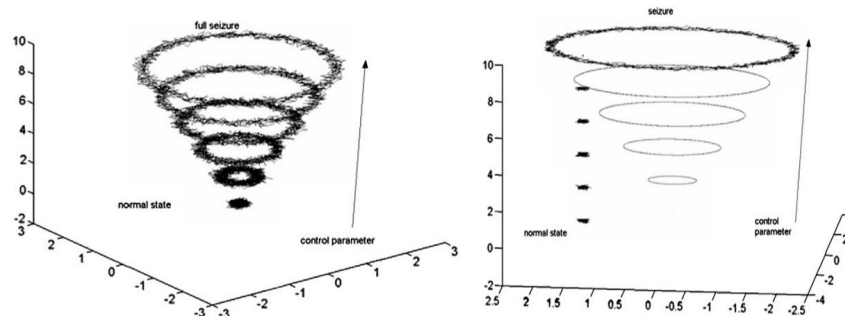


Figura 1.2: Modelos de evolução suave e abrupta de uma crise epiléptica. Os grupos de pontos indicam a representação do sistema neural em um espaço de estados; os anéis indicam um atrator que evolui segundo um parâmetro de controle (vertical). No primeiro caso, o estado inicial do sistema pertence à proximidade do atrator e portanto evolui junto deste até a crise. No gráfico da direita, o estado inicial só é capturado pelo atrator quando este chega em sua proximidade, causando uma mudança abrupta e expressiva na dinâmica. Fonte: Kalitzin et al. (2010)

Dada a complexidade do sinal de EEG e a relativa dificuldade de obtenção de séries em humanos – o registro prolongado só é normalmente feito em pacientes sob estudo de intervenção cirúrgica, registrando algumas crises sob efeito de medicamentos (Freestone et al., 2011) – é comum a obtenção de séries temporais e aplicação de técnicas de detecção sobre modelos aproximados, como os modelos animais (Velisek et al., 1992; Moraes et al., 2005a,b) ou matemáticos (Herbst et al., 2008; Hsu et al., 2008; Kumar et al., 2010), detalhados na seção 2.2.

## 1.2 Objetivos do Trabalho

O presente trabalho é parte integrante de um projeto multidisciplinar envolvendo o Núcleo de Neurociências (NNC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e o laboratório de Modelagem, Análise e Controle de Sistemas Não-lineares (MACSIN), pertencente à Escola de Engenharia. O projeto se baseia na implementação de um sistema em malha fechada para supressão de crises epiléticas, e utiliza estimulação elétrica intracraniana em ratos como forma de facilitar a obtenção de dados sobre o estado dinâmico do cérebro. O objetivo do projeto como um todo é a criação de um método eficaz para previsão e supressão de crises epiléticas, dado que trabalhos anteriores (Cota, 2007; Medeiros, 2009) provaram ser possível a supressão da crise através da estimulação elétrica. Utilizando o mesmo procedimento tanto para sondagem quanto para atuação, é possível implementar um sistema em malha fechada que estimula o cérebro com um sinal para monitorá-lo e age sobre ele com outro padrão de estimulação, retardando ou impedindo uma provável crise.

As crises epiléticas deste experimento são induzidas através de uma droga (pentilenotetrazol), e portanto este estudo não visa um método de predição de crises em si – 100% dos animais desenvolverão crise epilética, então a quantificação da eficiência quanto à correta predição é desprovida de sentido –, mas sim *quantificar a evolução da crise*, isto é, se valer da estimulação elétrica na identificação de parâmetros que caracterizem claramente um momento de iminência de crise, possibilitando uma aplicação futura de uso de estimulação supressora. Para esta quantificação, alguns passos são necessários, o que caracteriza os objetivos específicos deste trabalho:

- validar o experimento;
- quantificar as alterações na dinâmica do sinal de EEG durante o desenvolvimento de uma crise epilética (comparação com os métodos clássicos de predição);
- atestar a validade de uma mudança dinâmica provocada pela estimulação elétrica que caracterize o período pré-ictal;
  - quantificar os padrões de resposta relacionados à estimulação, caso existam;
- analisar a eficiência da predição baseada nesta abordagem e as limitações do experimento e dos métodos utilizados.

Para uma futura aplicação embarcada, deseja-se ainda uma redução no custo computacional do algoritmo de predição, assim como determinação da limitação quanto à duração da janela de análise, de modo a permitir uma boa análise sem comprometer a resolução temporal.

## 1.3 Organização do Texto

Esta dissertação consta de cinco capítulos, dois apêndices e um anexo. O capítulo 1 trata da apresentação do objeto de estudo: as séries temporais de epilepsia, justificando



a necessidade de um método semelhante ao desenvolvido para sua previsão e controle, assim como especificando os objetivos deste trabalho. No capítulo 2 é feita uma revisão bibliográfica sobre o tema de predição e caracterização de crises epiléticas, assim como o detalhamento do experimento de onde provêm os dados analisados nas seções subsequentes. O capítulo 3 trata das análises temporais, caracterizando a evolução da epilepsia, enquanto o capítulo 4 foca as características peculiares dos disparos gerados pelas redes neuronais no cérebro ao longo do experimento. Por fim, o capítulo 5 encerra com as conclusões e indicações de trabalhos futuros. Como apêndices, temos a exemplificação de algumas rotinas em ambiente Matlab® e os resultados completos para cada animal do experimento. Em anexo encontra-se o parecer do comitê de ética para realização do projeto.



# Revisão das Análises e Modelos para Previsão de Crises Epilépticas Existentes e Caracterização do Experimento Realizado

---

Neste capítulo consta a revisão bibliográfica de métodos de predição de crises epilépticas, suas limitações e novos métodos sugeridos, assim como a motivação e o detalhamento do experimento biológico realizado.

## 2.1 A Previsão de Crises

A predição de crises epilépticas, dada sua importância e necessidade para controle eficiente da doença, tem um longo histórico de aplicações, que utiliza informação de novos métodos de análise conforme estes são desenvolvidos (Jachan et al., 2008). Vários sinais biológicos têm sido observados como possíveis preditores de crise, como fluxo sanguíneo para o cérebro (Baumgartner et al., 1998) e frequência cardíaca (Novak et al., 1999; Delamont et al., 1999). Estes dados permitiram, em alguns casos, a detecção de mudanças prévias à crise, caracterizando sua predição, mas têm uma especificidade relativamente alta, tendo sucesso em um reduzido número de pacientes, semelhante ao caso das auras citadas na seção 1.1. Seu uso, portanto, carece de generalização, e tais sinais são limitados quanto à informação que conseguem extrair do estado epiléptico que se manifesta no cérebro.

### 2.1.1 O Estudo do EEG

A maior parte das análises sobre predição de crises se concentra no eletroencefalograma (EEG), um sinal formado pelo campo elétrico local de milhares de neurônios, consequentemente formando um sinal rico de informações e de complexidade elevada. A gama de técnicas desenvolvida até o presente momento, para aplicação em um sinal desta forma, é bem ampla (Naït-Ali, 2009), o que resulta naturalmente em uma série de trabalhos focando-se no uso de diferentes técnicas para sua análise. Estas técnicas podem ser classificadas de acordo com alguma característica funcional, com por exem-

plo a divisão exibida na Figura 2.1, retirada de uma revisão de Van Quyen et al. sobre o tema da previsão, que separa as técnicas em grupos clínicos (frequência cardíaca e pressão sanguínea, dependentes de cada paciente) e grupos de análise de EEG, este sendo subdividido em análises lineares, não lineares e de sincronia.

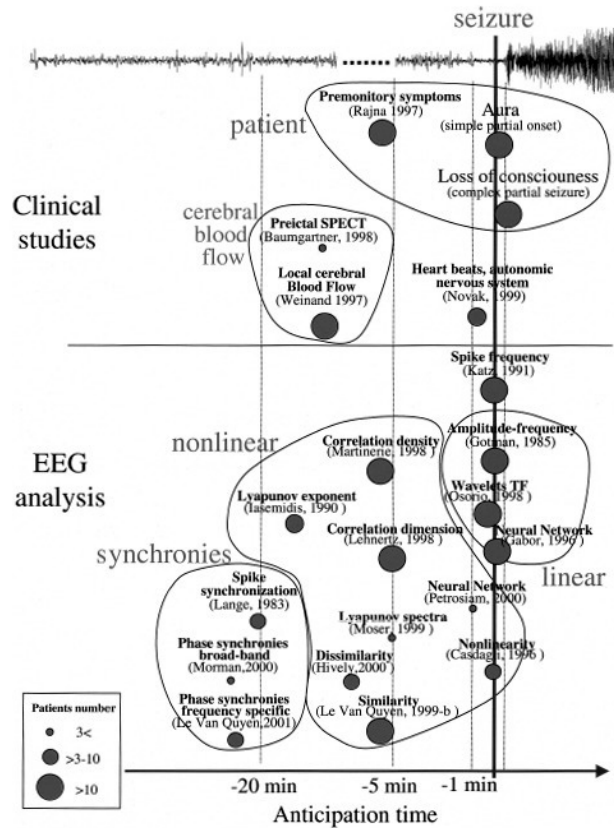


Figura 2.1: Histórico de diferentes métodos de previsão de crise. Fonte: Van Quyen et al. (2001)

Vale ressaltar que a terminologia utilizada na Figura 2.1 não reflete necessariamente a natureza das análises. Aquelas denominadas *lineares* são, na verdade, análises gerais no domínio do tempo e da frequência, não limitadas a operações lineares de transformação (a exemplo das funções wavelets englobadas na figura). Estas análises têm a característica de operarem diretamente sobre os dados, sendo portanto os mecanismos mais diretos de quantificação das séries temporais (Litt and Echauz, 2002). As técnicas não lineares têm, em geral, uma característica de modelagem, extraindo informação sobre *comportamento dinâmico* do sinal. Por fim, as denominadas técnicas de sincronismo são casos especiais para o uso em estudo de sinais de epilepsia, uma vez que sua maior manifestação se dá na forma de disparos síncronos entre diferentes grupos neurais, logo quantificar esta propriedade garante resultados eficientes para detectar sua evolução.

Quanto à capacidade de previsão de crise, até o momento, as técnicas "lineares" se mostram, em geral, mais úteis na caracterização da crise em si do que na do período que a precede, tendo sido por isso utilizadas essencialmente como detectoras de crise (Jachan et al., 2008), mas algumas análises utilizando estatísticas de mais alta ordem

(especialmente curtose e interpretações dela derivadas) obtiveram sucesso na determinação de características pré- crise – Chua et al. (2010) utilizando frequências calculadas a partir do chamado *espectro de alta ordem*, e Stratton and Wiles (2008) pela quantificação da organização neural através do chamado *kurtosis score*. Chisci et al. (2010) obtiveram uma boa janela de predição – ainda que de maneira otimizada para cada paciente – considerável (dezenas de minutos) utilizando modelagem autorregressiva (AR) junto a máquinas de vetor de suporte (SVM). As técnicas não-lineares, por sua vez, têm resultados mais consistentes quanto à predição, uma vez que operam através da quantificação das sutis alterações na dinâmica, onde podemos citar os exemplos de aplicação de expoentes de Lyapunov (Moser et al., 1999; Nair et al., 2009), análise fractal (Lopes and Betroumi, 2009) e dimensão de imersão (Yuan et al., 2008).

### 2.1.2 Análise dos Potenciais de Ação

Uma das maneiras de se extrair informações mais específicas no EEG é se concentrar nos momentos de disparo dos neurônios, através da identificação e caracterização dos potenciais de ação. Este processo consiste na extração, quantificação e classificação dos potenciais, onde cada etapa pode ser implementada de várias formas, e em geral não há um método indubitavelmente superior, mas sua escolha varia de acordo com a adequação ao experimento (Lewicki, 1998).

A extração dos potenciais de ação envolve a discriminação destes do EEG de fundo, o que normalmente é feito através da detecção de extrapolação de um limiar, dada a forma de onda característica do potencial de ação. Otimizações para esta detecção incluem, além da filtragem de ruídos estimados do sinal, a adoção de limiares adaptativos, como de acordo com a energia ou valor eficaz (RMS) sobre uma janela de tempo (Chan et al., 2010) assim como aplicação do limiar na derivada do sinal, que amplifica as espículas dos potenciais de ação e melhora a detecção, na ausência de ruído (Aksenova et al., 2003). Além da detecção por limiar, é vantajosa a comparação a uma ondas de referência, que podem ser utilizadas na construção de uma base de dados de grupos (Chan et al., 2010) ou simplesmente utilizadas para detecção. Estes padrões de onda podem ser tanto extraídos diretamente do sinal (Kim, 2006) quanto obtidos ou estimados a partir de um modelo, como funções wavelet (Letelier and Weber, 2000; Yuan et al., 2009; Yang et al., 2010) ou modelos de Markov (Herbst et al., 2008).

A extração depende, ainda, da definição de uma janela em torno da detecção, que inclui sua largura – que depende do tipo de experimento, sendo da ordem de alguns milissegundos para potenciais de ação de neurônios isolados e podendo chegar a centenas de *ms* para sinais compostos – e o correto alinhamento temporal, que pode ser melhor entendido observado-se a Figura 2.2, extraída de um artigo de Chan et al. (2010). Devido ao tipo de detecção (por extremos do sinal ou por derivada), ruído de discretização ou qualquer outra fonte de erro, o parâmetro utilizado para detecção pode não resultar em ondas diferentes sendo extraídas com o mesmo alinhamento temporal, podendo ser necessário algum processamento adicional.

Após a extração das formas de onda do sinal, passa-se pela etapa de quantificação, que envolve uma transformação do potencial de ação de modo a concentrar a

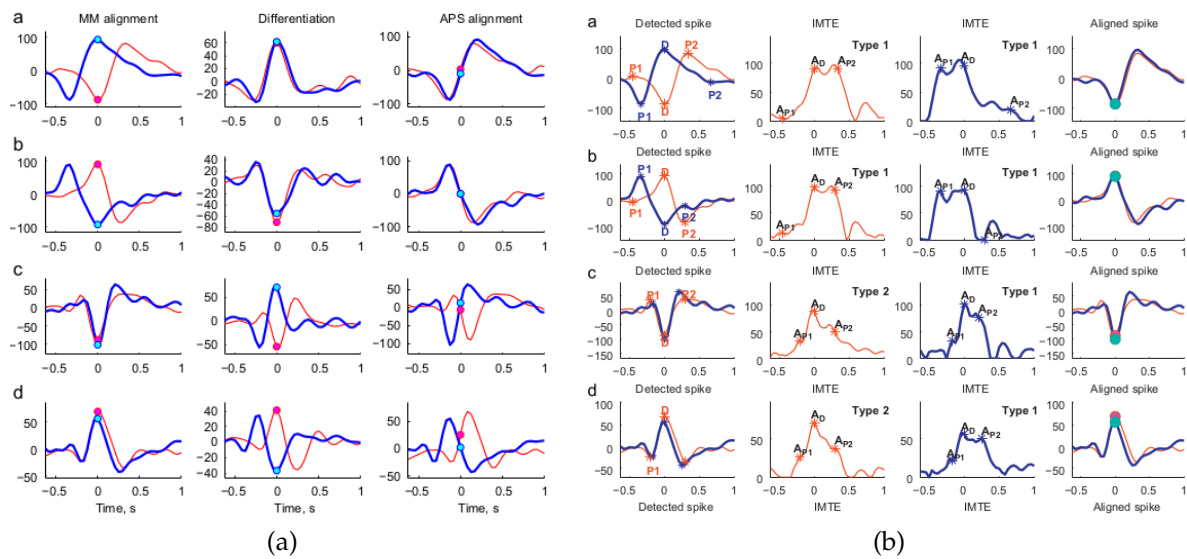


Figura 2.2: Métodos de alinhamento temporal de formas de onda extraídas. Fonte: Chan et al. (2010). Cada linha representa um par de ondas identificadas e cada coluna, um método de alinhamento. (a): métodos padrão por extremos locais do sinal e sua derivada. (b): método proposto no artigo, baseado no pico principal e em picos secundários em sua vizinhança.

informação em um menor número de coeficientes e/ou facilitar a etapa de classificação subsequente. Transformações comuns incluem a análise de componentes principais – PCA (Lewicki, 1998) –, diagramas de fase (Aksenova et al., 2003; Chan et al., 2008) e decomposição por wavelets – neste caso escolhendo-se os coeficientes para classificação de acordo com um teste de não normalidade na distribuição, buscando coeficientes com distribuição multimodal e, portanto, eficientes para discriminação de classes (Letelier and Weber, 2000; Quiroga et al., 2004; Chan et al., 2010).

A classificação, por fim, consiste em uma série de algoritmos de agrupamento, definindo classes e pertinência de cada potencial de ação a uma destas. Os grupos são construídos segundo critérios de união e proximidade, sendo a implementação mais simples o algoritmo de k-médias (Lewicki, 1998), que trata os grupos de acordo com a proximidade aos  $k$  pontos de referência (centros), atribuindo classes de acordo com o centro mais próximo. Generalizações do k-médias implementam variações no cálculo das distâncias entre pontos e grupos, através de funções de pertinência gaussianas, permitindo grupos mais alongados espacialmente (Kim, 2006), ou outras distribuições estatísticas a exemplo da distribuição  $t$  sugerida por Shoham et al. (2003). Outros critérios de união também são adotados, como o agrupamento superparamagnético (Blatt et al., 1996) ou por mapas auto-organizáveis – SOM (Yang et al., 2010) –, e abordagens alternativas de classificação incluem máquinas de vetor de suporte (SVM) (Chisci et al., 2010), filtragem de Kalman (Calabrese and Paninski, 2011) e casamento de ondas modelo – *template matching* (Chan et al., 2010).

### 2.1.3 Estado Atual: Limitações e Tendências

Apesar da grande variedade de técnicas de análise e diversos resultados satisfatórios em certos estudos de caso de predição de crises, foi a partir de meados de 2000, com a construção conjunta dos bancos de dados de EEG de pacientes portadores de epilepsia, que os métodos de sucesso utilizados historicamente provaram ser limitados a suas próprias aplicações. Artigos de revisão (De Clercq et al., 2003; Mormann et al., 2005) atestaram que tais métodos obtêm desempenho insuficiente quando aplicados aos bancos de dados de EEG compilados, ou seja, são soluções para casos específicos. Mesmo com o surgimento constante de novas abordagens, objetivando maior robustez e regularidade nas respostas, uma solução geral para o problema de predição permanece até o momento um tópico a ser resolvido (Jachan et al., 2008; Andrzejak et al., 2009).

A especificidade dos métodos até então utilizados pode ser considerada como resultante da limitação quanto à quantidade de informação possível de se extrair do sinal de EEG, pois sua complexidade é muito alta para a determinação precisa e eficiente de nuances dinâmicas que caracterizam a epileptogênese. Suffczynski et al. (2008) atentaram para uma possível solução deste problema com o uso de estimulação elétrica como *sonda* da rede neural: é mais simples (e confiável) retirar informação da dinâmica neural a partir da interação com um sinal conhecido do que tentar inferi-la a partir da atividade autônoma de dezenas de redes neurais envolvendo milhões de neurônios. Esta visão já vem há alguns anos sendo reforçada por estudos como os de Valentín et al. (2002, 2005), Kalitzin et al. (2005, 2010) e Freestone et al. (2011).

A estimulação elétrica como auxiliar da tarefa de predição é vantajosa, também, por possibilitar a ação conjunta de outro tipo de estimulação elétrica, como supressora da crise epiléptica a partir do correto estímulo temporal (Gluckman et al., 1996; Tass, 2003; Medeiros, 2009). Com esta aplicação conjunta, é possível a construção de um sistema de previsão e supressão de crises, utilizando o mesmo meio (estimulação), constituindo portanto uma implementação de controle em malha fechada, como sugerido por Rosenblum and Pikovsky (2004) e Kalitzin et al. (2010).

## 2.2 Modelos Experimentais para Epilepsia

Dada a limitação na obtenção de séries eletroencefalográficas de epilepsia, dados adicionais precisam ser obtidos através de sistemas que imitam o funcionamento do cérebro epiléptico, os chamados modelos de epilepsia. Há duas principais formas de se construir um modelo para estudo de epilepsia: *simulação matemática*, pela criação de um modelo matemático a partir de dados reais, ou *experimentação biológica*, tratando uma versão simplificada do sistema neural, o que pode começar desde o estudo da fisiologia dos neurônios e redes neuronais mais básicas até a utilização de um modelo animal completo.

Modelagens matemáticas permitem simulação livre das condições do sistema, e eventual extrapolação dos limites sob os quais os dados foram capturados, possibilitando levantar hipóteses sobre o comportamento do sistema original. Kumar et al. (2010) utilizaram uma rede neural artificial para recriar o sistema de propagação e

sincronia de vários neurônios, de modo que seja possível a construção e o teste de um método para frear este processo. Kalitzin et al. (2010) utilizam um modelo não linear caótico para quantificar as transições abruptas e suave para a crise, baseando-se no comportamento do modelo para previsão de possíveis focos de ação no sistema biológico, foco também utilizado por Hsu et al. (2008), pela utilização de um comportamento experimental para determinar possíveis características do sistema biológico (neste caso, o "aprendizado" da epilepsia).

Os modelos biológicos, por sua vez, visam dar informação direta da resposta do sistema físico em que se baseiam os modelos matemáticos, podendo ser utilizados junto a estes como sistemas de validação. Quanto à análise dos sistemas biológicos, estas visam quantificar as conexões neurais e sua fisiologia. Sistemas mais complexos podem ser criados pelo uso de animais (normalmente ratos) como modelos de epilepsia, podendo esta ser tanto induzida como espontânea, ponto em que podemos citar os trabalhos de Moraes et al. (2005a,b), que utilizam ratos geneticamente propensos à epilepsia por estimulação auditiva (GEPR-9) para o estudo da evolução da atividade cerebral.

Tratando-se da indução de crises sobre um animal saudável e não-epiléptico, a droga pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista GABA-érgico central, é um dos modelos mais comuns de crise utilizada para o teste de drogas convulsivantes em ratos (Velisek et al., 1992). A administração intra-peritoneal, em doses que variam de 40 a 120mg/kg, produz dois tipos de crise, dependendo da aplicação: mínima e máxima. As crises mínimas são induzidas por doses de até 40mg/kg, e têm manifestações sutis, como espasmos, automatismos faciais, mastigação e clonias (movimentos pulsados) de cabeça e membros anteriores. Na expressão motora das crises mínimas estão envolvidas estruturas prosencefálicas, como o sistema límbico e, por isso, o PTZ em baixas doses é tido como modelo de epilepsia de lobo temporal (Eells et al., 2004). As crises máximas, induzidas por doses maiores que 60mg/kg, têm manifestação motora completa na forma de convulsões tônico-clônicas generalizadas (Velisek et al., 1992), sendo precedidas por crises mínimas e envolvendo estruturas do prosencéfalo e do tronco encefálico simultaneamente (Eells et al., 2004). O modelo de crise é, portanto, generalizada, caracterizando o PTZ como um modelo geral indutor de crises.

## 2.3 Experimento Realizado

O experimento realizado tem como objetivo estudar como a estimulação elétrica auxilia a caracterização da evolução temporal do EEG para a crise epiléptica. A descrição do modelo biológico de geração dos dados é baseada nos trabalhos anteriores do NNC que desenvolveram tal metodologia (Medeiros, 2009; Cota, 2007).

São utilizados ratos Wistar machos submetidos inicialmente a uma cirurgia para implante de eletrodos – pares trançados para detecção de potencial diferencial. Um eletrodo profundo tem a função de estimular eletricamente uma região do cérebro – a amígdala – de modo a servir como circuito de referência para a evolução da crise epiléptica, e outros dois eletrodos superficiais – na região do córtex parietal – servem



para captação dos dados de EEG (Figura 2.3).

A amígdala foi escolhida como local de estimulação por ser uma região envolvida no recrutamento límbico, onde há grande atividade neural em um caso de ELT (Guerreiro et al., 2000) e, de modo semelhante, no modelo induzido por PTZ. A captação no córtex, por sua vez, foi escolhida pela facilidade de medição e pela distância ao eletrodo de estimulação, evitando que o campo elétrico gerado por este seja captado diretamente, permitindo medição somente da atividade neural local.

Os animais são anestesiados com uretana, de modo a suprimir a atividade neural que porventura ocultaria a atividade do recrutamento neural da rede epiléptica. Tratando-se do primeiro experimento sobre o projeto de predição, este método foi escolhido por apresentar a melhor relação sinal/ruído possível.

A crise epiléptica é provocada pela infusão de PTZ a uma taxa de  $4\text{mg/ml/min}$ , configurando um modelo de crise generalizada. A estimulação elétrica consiste em pulsos quadrados de  $300\mu\text{A}$  de amplitude e  $100\mu\text{s}$  de duração, aplicados a cada  $2\text{s}$  – este tipo de padrão temporal não tem qualquer efeito sobre o desenvolvimento da epilepsia, conforme atestado por Medeiros (2009) e comprovado na seção 3.1.1.

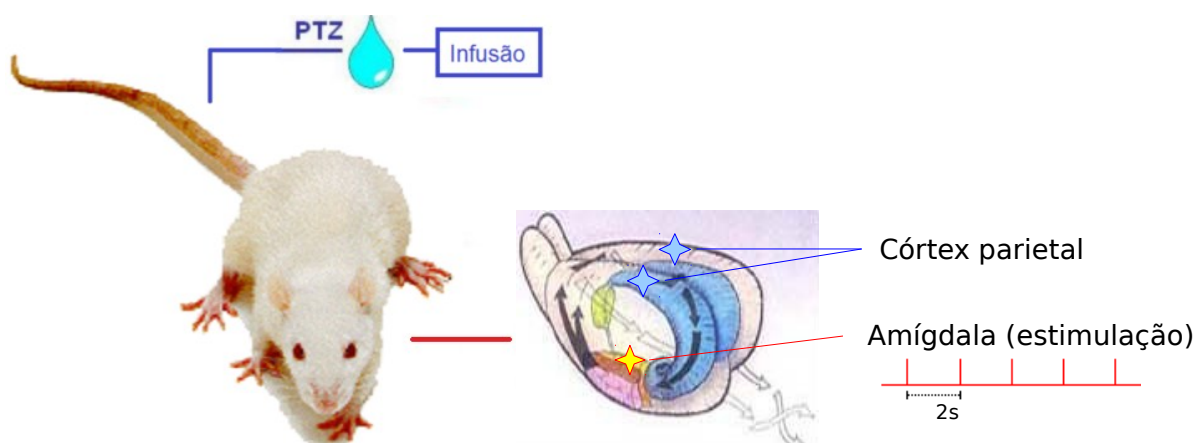


Figura 2.3: Diagrama do experimento e localização dos eletrodos na estrutura cerebral

O experimento foi realizado em 31 animais, com três protocolos diferentes, formando três grupos distintos:

- grupo de teste (*PTZ+EE*): recebe a injeção de PTZ (provocando a crise) junto à estimulação elétrica – 19 animais (1 a 19)
- grupo de controle 1 (*PTZ*): recebe somente PTZ, possibilitando a verificação de uma possível mudança de comportamento da crise devido à estimulação (ao comparar com o grupo de teste) – 6 animais (20 a 25)
- grupo de controle 2 (*EE*): recebe somente estimulação elétrica, demonstrando a ausência de crise e portanto o comportamento neutro da estimulação em relação à progressão do grupo de teste – 6 animais (26 a 31).

Não houve controle negativo (sem PTZ e sem EE) pelo fato de o experimento começar desta maneira para todos os animais e o grupo EE ter um comportamento

consistente entre os períodos anterior e posterior ao início do experimento, podendo ser considerado o grupo de controle negativo para referência dos demais.

Nos grupos que recebem injeção de PTZ e, portanto, desenvolvem crise epiléptica, o experimento é encerrado cerca de um minuto após sua ocorrência, sendo a crise observada pelo comportamento do animal e de seu EEG. No grupo EE, o experimento é mantido por cerca de 30 minutos, tempo três vezes maior que o necessário para desenvolvimento da crise nos outros grupos, para se certificar de que a estimulação não provoca qualquer reação no animal.

O término do experimento é marcado pela aplicação de uma dose letal do anestésico, seguida de marcação da região de estimulação no cérebro pela execução de um pulso de corrente de maior intensidade e cauterização da região. Os animais têm seu cérebro removido e submetido a um processo de resfriamento e divisão em fatias para determinação do ponto exato de estimulação – apesar de a inserção ser feita objetivando a amígdala, a pequena espessura do eletrodo pode resultar em uma curvatura e consequente estimulação na região errada do cérebro.

Os sinais de tensão provenientes dos eletrodos (três canais de medição – um de estimulação e dois de registro) são processados em placa desenvolvida no próprio NNC, de alimentação isolada por um transformador 1:1 de modo a diminuir o acoplamento eletromagnético, dada a baixa amplitude do sinal de EEG. O circuito executa uma pré-amplificação de  $1000\times$ , seguida por filtragens passa-altas ( $0,15\text{Hz}$ ) e passa-baixas ( $500\text{Hz}$ ). O sinal resultante é submetido a conversão A/D com resolução de 12 bits – resultando em um erro de quantização máximo de cerca de  $1,1\mu\text{V}$  – a uma taxa de amostragem de  $1\text{kHz}$ . Os dados de cada animal são armazenados em arquivo individual, possibilitando o processamento offline do experimento, que é realizado em ambiente Matlab®.

## 2.4 Conclusão do Capítulo

Neste capítulo foram descritas as análises e os modelos de previsão de Epilepsia existentes bem como a caracterização dos experimentos realizados para a obtenção dos dados utilizados neste trabalho.

# Análise no Domínio do Tempo dos Sinais de EEG

---

Neste capítulo constam as especificações dos métodos utilizados para análise no domínio do tempo do registro encefalográfico dos animais do experimento descritos na seção 2.3 do capítulo anterior. O código Matlab correspondente aos métodos aqui discutidos é encontrado no Apêndice A.

## 3.1 Pré-processamento

Como primeira etapa para o processamentos dos dados, temos o condicionamento do sinal captado, constituindo uma etapa de pré-processamento. Esta consiste no recorte de uma janela temporal de análise e a recuperação da assinatura temporal dos pulsos de estimulação elétrica.

A janela temporal extraída para análise dos dados se inicia após a estabilização da medição (interrupção dos grandes ruídos de captação iniciais) e é limitada por um de dois fatores: a interrupção da estimulação elétrica – que ocorre após a crise epiléptica no grupo de teste e após um tempo limite no grupo EE – ou a ocorrência da crise epiléptica – a captação é interrompida cerca de um minuto após o início da crise no grupo PTZ. Nenhuma filtragem adicional foi executada nos dados, desconsiderando ruídos de medição dadas a medição intraencefálica, suficientemente livre de artefatos biológicos, e a amplificação por um circuito de alimentação independente, que minimiza o acoplamento eletromagnético.

A segunda parte de pré-processamento é a divisão da série temporal em janelas de tempo sincronizadas à estimulação, uma vez que o objetivo do experimento é estudar como esta sincronia se apresenta e evolui. Para esta divisão, é necessária a recuperação das assinaturas temporais de cada estímulo, que foram obscurecidas pela filtragem executada na captação dos dados (passa-baixas de 500Hz) e a curta duração dos pulsos (0,1ms). A solução encontrada foi a aplicação de um filtro de primeira diferença (amplificando os pulsos, que duram somente uma amostra) seguida de detecção por limiar, calculado como três desvios padrão do sinal, de modo a oferecer um compromisso entre detecção dos pulsos e de ruído. As assinaturas temporais detectadas foram processadas para eliminação de detecções muito próximas ( $\Delta t < 1000ms$ ) e atribuição de pulsos espaçados em 2000ms para o caso de  $\Delta t > 3000ms$ ,

possibilitando a divisão.

As localização das janelas temporais foi ainda ajustada para que o pulso fosse posicionado no interior da janela, permitindo a análise dos instantes anterior e posterior a cada estimulação. A localização do pulso foi determinada em  $500ms$ , valor escolhido

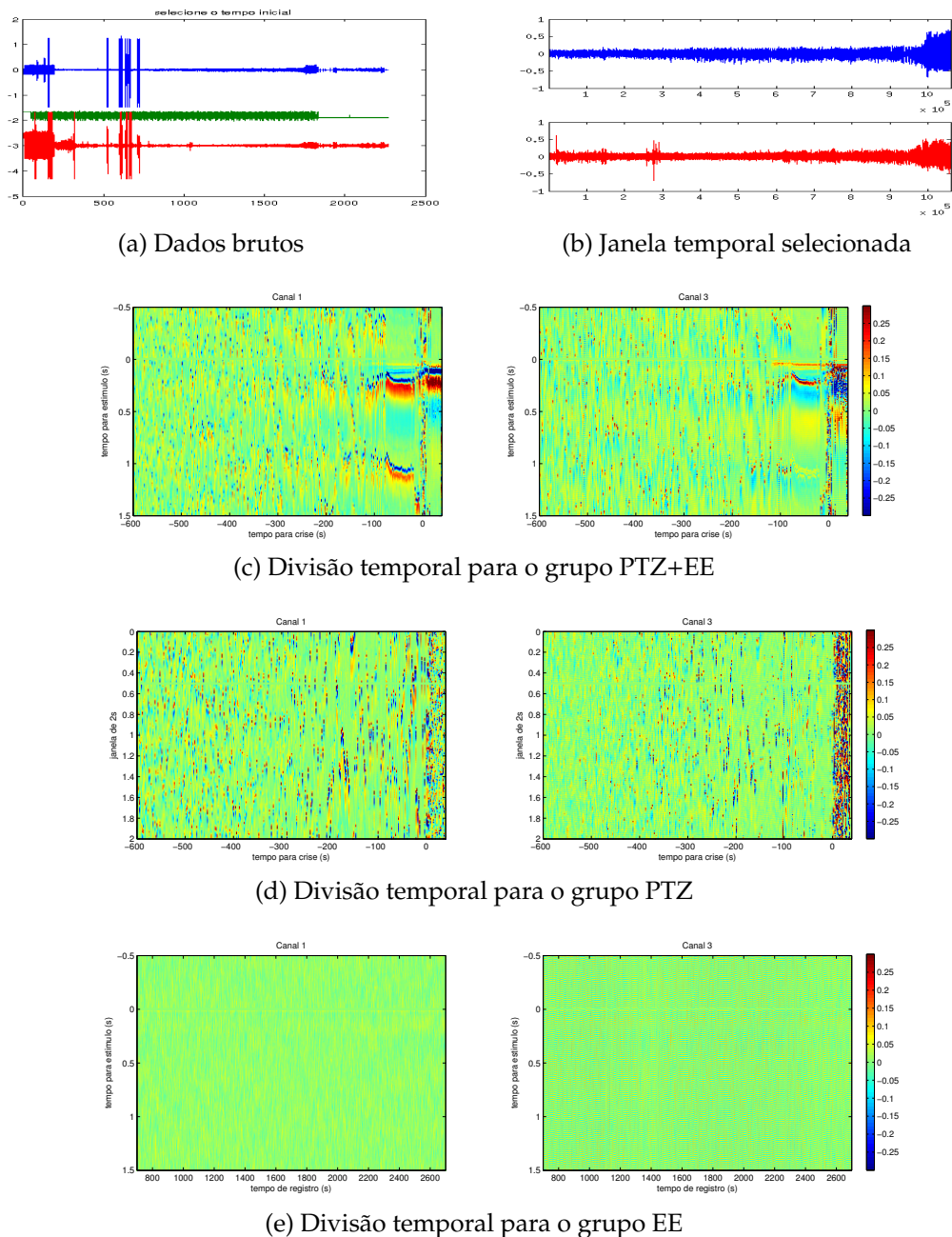


Figura 3.1: Pré-processamento dos dados (preparação das matrizes utilizadas nas análises temporais). Os sinais exibidos em (b) são reorganizados das matrizes (c-e). O EEG fica quantificado pela cor, o eixo vertical representa cada janela de 2s (sincronizada à estimulação, nos grupos a ela submetidos), em que  $t = 0$  representa o momento de estimulação (c)(e), e o eixo horizontal representa o tempo de experimento, com  $t = 0$  representando o momento da crise (c-d)

de forma a facilitar a visualização dos dados. Na Figura 3.1 temos a comparação entre o sinal bruto e pré-processado assim como a aparência final das matrizes divididas conforme a estimulação, para cada grupo. Como esta divisão foi utilizada no cálculo das análises temporais, o sinal do grupo PTZ também foi dividido em janelas de 2s, através do corte a cada 2000 amostras, já que neste grupo não há estimulação.

Ao final do pré-processamento, temos as três séries temporais dos eletrodos transformadas em duas matrizes, uma para cada eletrodo de captação, enquanto a informação do eletrodo de estimulação fica codificada na divisão temporal destas matrizes em janelas temporais.

### 3.1.1 Validação dos Grupos de Controle

Antes de realizar as análises, é preciso primeiro validar o experimento através da verificação dos dois grupos de controle, PTZ e EE. O princípio destes é confirmar que a estimulação elétrica não altera a evolução e o tipo de crise epiléptica apresentada (grupo PTZ), tampouco provoca uma crise por si só (grupo EE). A caracterização das crises epilépticas foi dada qualitativamente baseada em no tempo necessário até seu início (latência) e em sua duração. A detecção das crises, necessária a essa averiguação, foi feita de modo visual, observando tanto o comportamento temporal do sinal quanto sua distribuição de frequências, calculada através de um espectrograma em janelas *Hamming* de 2s com sobreposição de 50%.

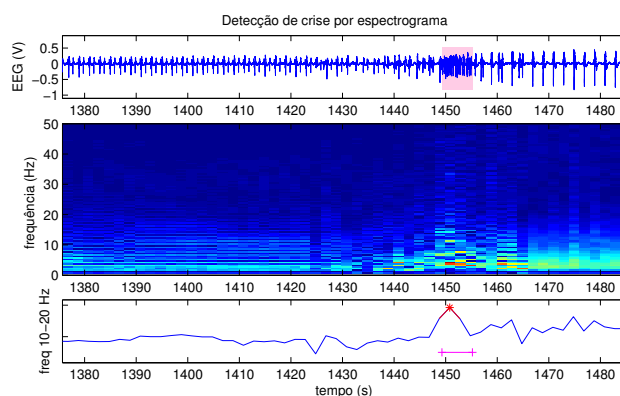


Figura 3.2: Determinação do momento da crise epiléptica em um animal modelo. São exibidos o sinal no tempo, o espectrograma correspondente e o acúmulo de energia na faixa de frequências de 10-20Hz (intervalo obtido empiricamente), assim como a faixa temporal identificada como crise epiléptica.

No espectrograma, identificou-se uma faixa de frequências onde a potência fosse determinante para a identificação da crise (Figura 3.2). O mesmo padrão de identificação foi aplicado ao grupo de controle 2 (EE) para comprovar a ausência de crise. Os dados de início e término da crise de todos os animais foram gravados em arquivo para uso futuro.

## 3.2 Caracterização da Evolução Temporal do Sinal

A primeira parte do trabalho de análise consiste em encontrar algum parâmetro que separe claramente os registros temporais de cada grupo. As ferramentas escolhidas para análise abordam três frentes: caracterização geral do sinal (promediação temporal, momentos estatísticos e distribuição de frequências), quantificação de dinâmica não-linear (expoentes de Lyapunov e dimensão fractal) e quantificação da organização do padrão temporal de resposta (detecção de alinhamento temporal e correlação). As análises são efetuadas sobre janelas temporais de 2s, para permitir a comparação cruzada (a limitação é o alinhamento temporal com a estimulação, que precisa ser feito no mesmo período do estímulo, que é de 2s).

### 3.2.1 Análises Preliminares

Uma representação mais suave das formas de onda exibidas na Figura 3.1 foi obtida através da promediação temporal das janelas, visando inclusive obter melhor representação para os animais em que tal figura se apresentou muito ruidosa. Esta promediação foi executada através de um filtro de média móvel com atraso de fase nulo, de ordem  $n = 7$ , caracterizando promediação em uma vizinhança de 14s.

A estrutura geral do sinal (distribuição das tensões nos picos) foi quantificada pelo cálculo de sua energia (variância), e a distribuição estatística de seus valores foi estimada pelo terceiro e quarto momentos estatísticos. A variância ( $\sigma^2$ ), calculada para um vetor  $x$  de média  $\mu$  como

$$\sigma^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2$$

é um indicador de energia (variação) do sinal, e serve como base para cálculo dos demais momentos – assimetria e curtose –, definidos como

$$M(k) = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^k}{\sigma^k}, \quad k = [3,4],$$

em que  $\sigma$  é o *desvio padrão*, a raiz quadrada da variância. A assimetria ( $y = M(3)$ ) indica predisposição a valores positivos ou negativos, enquanto a curtose ( $k = M(4)$ ) quantifica a concentração ou dispersão de valores de alta amplitude (distantes da média). É conveniente a definição da curtose subtraída de um valor de referência 3, definindo-a portanto como

$$k = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^4}{\sigma^4} - 3,$$

de modo a esta medida retornar valor nulo para a distribuição normal (Weisstein, 2004). Esta operação permite que, junto à assimetria (que tem valor zero para tal distribuição), estes momentos estatísticos possam ser utilizados como indicadores de (não-)normalidade na distribuição dos dados.

De modo a obter informações ocultas na representação temporal do sinal, foi feito

também o cálculo de sua distribuição de frequências através de um espectrograma, que calcula a representação do sinal do domínio da frequência em janelas de tempo, permitindo a análise de como esta distribuição se altera ao longo deste. Foram utilizadas janelas de 2s (2000 amostras), permitindo uma resolução de  $0,5\text{Hz}$  na frequência. Objetivando maior suavização na representação, o cálculo foi feito em janelas do tipo *Hamming* sobrepostas (50%) e submetido a promediação temporal (filtragem média móvel de atraso de fase nulo,  $n = 4$ ).

### 3.2.2 Organização do Sinal

De modo a quantificar a organização do sinal observada na Figura 3.1c, foi utilizada a correlação temporal (consistência do sinal) e desenvolvido um algoritmo para detecção de potencial sincronizado ao estímulo (alinhamento temporal).

A correlação entre janelas adjacentes é calculada pelo coeficiente linear de Pearson, que para dados de mesmo tamanho, representados pelos vetores coluna  $x$  e  $y$ , é dado por

$$C_P = \frac{\bar{x}^T \bar{y}}{\sqrt{\bar{x}^T \bar{x} \cdot \bar{y}^T \bar{y}}},$$

em que  $\bar{x}$  e  $\bar{y}$  indicam os vetores subtraídos de suas respectivas médias. O cálculo de correlação retorna um valor na faixa de -1 a 1, quantificando pelo módulo a dependência linear dos vetores e pelo sinal a relação (de)crescente. Tal análise aplicada em janelas vizinhas serve como uma medida de estabilidade do sinal ao longo do registro, ao identificar padrões de resposta que permanecem consistentes ao longo do tempo, com alta correlação entre diferentes ocorrências (como o potencial final sincronizado à estimulação elétrica).

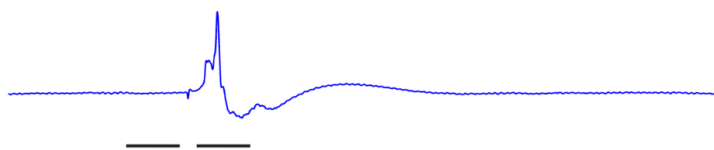


Figura 3.3: Cálculo de sincronia de potencial de ação com o estímulo.  $Ganho = \log_2(\sigma_{depois}^2 / \sigma_{antes}^2)$

O algoritmo de detecção de sincronismo, por sua vez, foi definido a partir da seleção de intervalos, em cada janela, igualmente espaçados do instante de estimulação. Por observação visual dos dados, foram escolhidos blocos de  $200\text{ms}$  de duração a uma distância de  $50\text{ms}$  da estimulação, conforme exibido na Figura 3.3. Para cada bloco, calcula-se a variância, e a métrica gerada é o logaritmo da razão entre as variâncias (energias) depois e antes do estímulo, quantificando igualmente concentrações de disparos atrasadas (valor positivo) ou adiantadas (valor negativo) deste.

### 3.2.3 Máximo Expoente de Lyapunov

Como forma de quantificar a dinâmica do sinal, foi feito o cálculo dos expoentes de Lyapunov (Parlitz, 1998), que são utilizados para detectar e quantificar caos em sistemas dinâmicos. Esse expoente (ou melhor, o espectro de expoentes) é normalmente calculado a partir das equações de estado de um sistema dinâmico, modelando a deformação de uma série de pontos iniciais próximos (uma esfera na dimensão apropriada) ao longo do tempo, formando uma elipse (Figura 3.4). Esta divergência obedece uma forma exponencial, e os expoentes de Lyapunov são a quantificação desta expansão/contracção em todas as direções do espaço formado pelo sistema. A existência de um expoente positivo resulta em afastamento de pontos iniciais próximos, definindo comportamento caótico, por isso a importância desta análise para quantificar o caos em um sistema dinâmico.

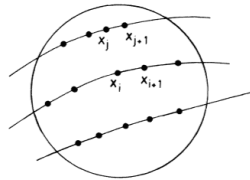


Figura 3.4: Expoentes de Lyapunov

O cálculo dos expoentes de Lyapunov em séries temporais, como é o caso do sinal em análise, requer a transformação do sinal unidimensional para um sinal em múltiplas dimensões, o que normalmente é feito através de uma imersão no espaço, transformando a série original  $x$  em uma sequência

$$s_n = \{x(t_n), x(t_n + \tau), x(t_n + 2\tau), \dots, x(t_n + (m - 1)\tau)\},$$

que contém  $m$  valores (dimensões) extraídos de  $x$  a partir de diferentes pontos iniciais  $t_n$  separados de um atraso  $\tau$ . Os parâmetros  $m$  e  $\tau$  são estimados a partir da série temporal, e podem eles próprios ser utilizados como parâmetros quantificando o sinal (Yuan et al., 2008), mas neste caso, objetivando a comparação entre expoentes de Lyapunov calculados, foram estabelecidos valores padrão para  $m$  e  $\tau$ .

O atraso  $\tau$  foi calculado para todos os sinais (todas as janelas de todos os animais) a partir da informação mútua (Pereda et al., 2005), que é uma medida similar à correlação. Valores pequenos de informação mútua indicam independência entre os sinais estudados, identificando portanto possíveis candidatos a formar variáveis independentes para a imersão. O valor de atraso que resulta no primeiro mínimo da função de informação mútua é estabelecido como o valor de atraso para aquele sinal estudado. É montado, ao final dos cálculos, um histograma contendo todos os valores de  $\tau$ , e o valor de maior frequência é escolhido para ser aplicado em todas as análises.

O cálculo de  $m$  segue um princípio semelhante, a partir do valor de maior frequência, e é calculado a partir do método de Cao (1997). Neste, são construídos vetores de várias dimensões diferentes a partir da série temporal (e um atraso  $\tau$  já estabelecido), comparando a mudança na distância entre estes conforme a dimensão aumenta.



Quando se atinge uma dimensão que representa significativamente os dados, a adição de mais dimensões deixa de adicionar mais informação ao sistema (a distância entre vizinhos próximos, ou pontos de menor distância entre si, se estabiliza) e obtém-se a dimensão ótima para imersão. A Figura 3.5 apresenta os dados resultantes da estimação de  $\tau$  e  $m$  para todas as janelas temporais, de onde se escolheu  $\tau = 8$  e  $m = 7$  para implementação do cálculo.

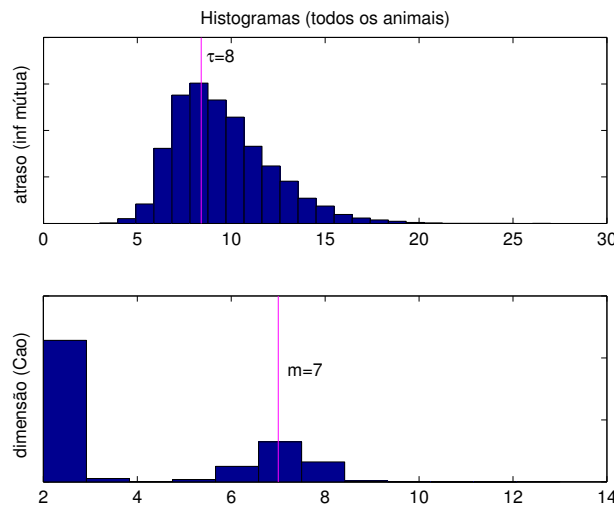


Figura 3.5: Parâmetros para cálculo do expoente de Lyapunov

O cálculo dos expoentes de Lyapunov é, finalmente, realizado. O método aplicado para tal (Sato et al., 1987) apresenta a vantagem de baixo custo computacional ao estimar somente o maior expoente de Lyapunov, e não todos eles – o que basta para o caso da quantificação do nível de caos em uma série de dados. O máximo expoente é obtido pela inclinação do gráfico do erro de predição

$$p(k) = \frac{1}{Nt} \sum_{n=1}^N \log_2 \left( \frac{\|s^{n+k} - s^{vn+k}\|}{\|s^n - s^{vn}\|} \right),$$

que quantifica de certa forma como diferentes pontos próximos ( $s^{vn}$  é vizinho, ou o ponto mais próximo de  $s^n$ , conforme Figura 3.4) se espalham no espaço de estados.

Os métodos de cálculo aplicados nesta seção (informação mútua, método de Cao e cálculo do expoente máximo) foram executados através da suíte TSTOOL (Merkwith et al., 2009), implementada em Matlab® e disponível gratuitamente.

### 3.2.4 Dimensão Fractal

A última análise, também visando quantificar a dinâmica do sinal, é a dimensão fractal, ou dimensão *boxcount*, que busca quantificar a complexidade do sinal através da quantidade sequências distintas de valores assumidas por um sinal binário (Small, 2005). Um sinal que possui muitas sequências diferentes de "0"s e "1"s (sem um padrão claro) é dito de alta complexidade, e possui uma dimensão fractal próxima à sua

dimensão real ( $d = 1$  para uma série temporal). Deste modo, é possível quantificar a complexidade do sinal pelo cálculo desta dimensão.

A representação binária da série original foi feita através do cálculo de primeira diferença sobre o sinal suavizado (filtragem média móvel de atraso de fase nulo,  $n = 3$ ), em que cada elemento passa a valer "1" caso seja maior que o último valor e "0" caso contrário. Com esta representação, temos o sinal codificado quanto ao comportamento médio ascendente/descendente, e um sinal consistente, de padrão fixo (como o potencial sincronizado à estimulação), exibirá baixa dimensão fractal. O cálculo desta análise foi feito, assim como para o expoente de Lyapunov, através de um programa pronto e disponível na rede (Moisy, 2008).

### 3.2.5 Validação Estatística

O método escolhido para se verificar disparidade entre grupos foi o método não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Noether, 1983). Este método foi escolhido pela análise ser feita, em cada caso, baseada em uma única variável (a quantificação da análise em questão – os cálculos são feitos entre todos os animais para uma única variável em uma mesma janela temporal, de cada vez), e pelo fato de os dados não atenderem, em geral, ao critério de normalidade, o que pode ser confirmado pelas métricas de assimetria e curtose calculada. A estatística do método de Kruskal-Wallis é dada por

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^{ng} \frac{(\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij})^2}{n_i} - 3(N+1),$$

baseando-se em  $ng$  grupos com  $n_i$  elementos cada, e  $r_{ij}$  é a *ordenação* (rank) de cada elemento entre todos os elementos de todos os grupos.  $N$  é o número total de elementos.

A métrica  $H$  é comparada a uma distribuição  $\chi^2$  com  $ng - 1$  graus de liberdade (Noether, 1983) e indica a pertinência ou não de todos os grupos a uma distribuição genérica de mesma mediana. A comparação múltipla (grupos dois a dois), entretanto, precisa ser calculada de outra maneira, através de uma matriz  $ng \times ng$ , de elementos

$$C_{ij} = (\bar{r}_i - \bar{r}_j) \cdot \sqrt{\frac{12}{N(N+1)} \left( \frac{n_i n_j}{n_i + n_j} \right)},$$

definindo  $\bar{r}_k$  como o rank médio do grupo  $k$ , ou seja,  $\bar{r}_k = (\sum_{j=1}^{n_k} r_{kj})/n_k$ , conforme definições acima. Cada métrica é referenciada a uma distribuição normal, indicando pelo peso da cauda externa (integral da curva normal sobre os valores  $x > |C_{ij}|$ ) a significância  $\alpha$  de as médias dos grupos  $i$  e  $j$  serem semelhantes (Noether, 1983). De forma análoga, a integral sobre os valores  $-C_{ij} < x < C_{ij}$  retorna o nível de significância  $\alpha$  de os grupos apresentarem médias *diferentes*, sendo esta a métrica escolhida.

O objetivo da comparação estatística é validar a *unicidade* do grupo de teste PTZ+EE(+), ou seja, o fato de este grupo apresentar análises significativamente diferentes de todos os demais grupos. Para isto foi extraído, em cada caso de comparação (cada análise em cada janela de tempo), o menor valor  $\alpha$  indicando a diferença entre os grupos. Este

valor foi denominado unicidade do grupo de teste, e é exibido nos resultados da Figura 3.10.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Validação dos Dados

Analisando-se as séries temporais durante a etapa de pré-processamento, observou-se uma consistente ocorrência de flutuações de sinal (aparentemente ruído) no registro ipsilateral – canal 3, do mesmo lado que a estimulação. Esta ocorrência é consistente em todo o grupo EE, e atinge parte significativa dos outros grupos (vide Apêndice B), apresentando em geral maior ruído neste canal de registro do que no representado pelo canal 1. De modo a evitar introdução de erros decorrentes desta distribuição irregular dos ruídos, nenhuma análise multivariável que se valesse da informação dos dois canais foi executada, e as análises temporais foram aplicadas exclusivamente sobre o canal 1.

A tabela 3.1 contém os dados sobre a evolução do experimento e da epilepsia para cada animal. As crises foram identificadas de forma visual, conforme explicado na seção 3.1.1. A sincronia de potencial exibida foi, também, observada visualmente, a partir das séries temporais promediadas (Apêndice B), e serve apenas como base para comparação dos métodos de análise.

Quanto à validação dos grupos de controle, a caracterização da crise validou o grupo de controle EE como referência de atividade basal (não desenvolve crise tampouco altera o padrão de EEG ao longo do experimento), e o grupo de controle PTZ através da comparação estatística de latência (intervalo de tempo necessário ao desenvolvimento da crise) e duração das crises epilépticas apresentadas, exibida na Figura 3.6. A semelhança dos dados foi validada por testes de Mann-Whitney (Noether, 1983), retornando  $p = 0,91$  para latência e  $p = 0,97$  para duração.

Apesar de o potencial evocado ser uma característica intrínseca do grupo de teste,

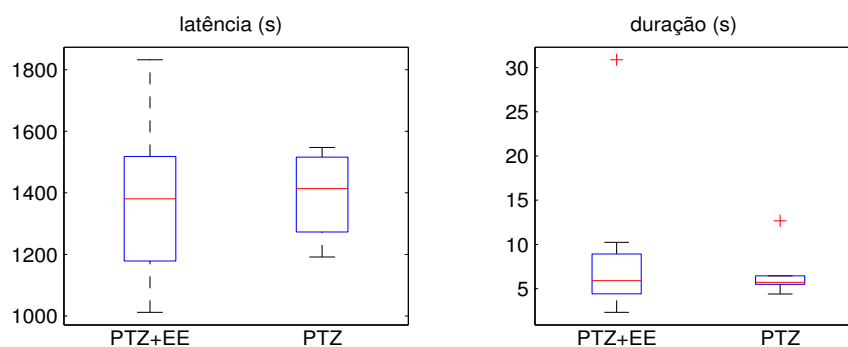


Figura 3.6: Comparação de latência e duração das crises entre os grupos de teste e controle PTZ. Distribuições estatisticamente semelhantes ( $p_l = 0,91$ ,  $p_d = 0,97$ , teste de Mann-Whitney)

Tabela 3.1: Momentos de início de crise e observação de potencial evocado

Animal	Tempo de registro (s)	Sincronia de potencial(s)	Início da crise (s)	Duração da crise (s)
1	1831	1514	1744	2,3
3	1564	1254	1376	6,6
7	1546	-	1380	10,2
8	1402	-	1219	30,9
9	1876	-	1738	4,0
10	1650	-	1517	5,2
11	1284	-	1165	10,0
12	1507	1363	1377	5,9
13	1723	-	1491	9,7
14	1232	-	1116	5,9
15	1228	-	1097	6,0
16	1129	-	1012	4,3
17	1576	1378	1449	5,9
18	1641	1442	1518	4,8
19	1937	1820	1832	4,2
20	1456	-	1399	5,8
21	1331	-	1273	5,6
22	1239	-	1191	5,5
23	1589	-	1547	12,7
24	1444	-	1428	6,5
25	1604	-	1515	4,4
26	3624	-	-	-
27	2689	-	-	-
28	2550	-	-	-
29	3672	-	-	-
30	2364	-	-	-
31	2104	-	-	-

*Grupos*      1–19: PTZ+EE      20–25: PTZ      26–31: EE

e portanto esperado em todos os seus animais, sua presença não foi confirmada em cerca de metade dos experimentos. Levando-se em conta, no entanto, a fragilidade do eletrodo de estimulação e a possibilidade de entortamento – e consequente estimulação de outra região cerebral que não a amígdala –, considerou-se a subdivisão do grupo de teste em dois, o que foi apoiado pelo resultado das análises histológicas dos cérebros, exibido na Figura 3.7, e reforçado conforme as análises temporais indicaram disparidade internamente no grupo.

### 3.3.2 Comparação das Análises Temporais

A promediação dos dados adicionou pouca informação quanto ao comportamento observável dos dados brutos, e portanto foi omitida desta seção. Por representar um

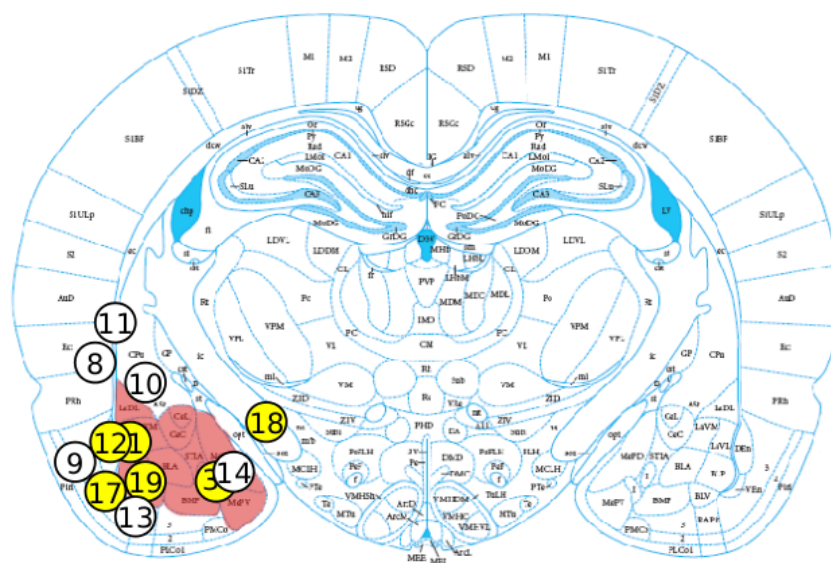


Figura 3.7: Análise histológica do posicionamento dos eletrodos por animal. Entre todos os dados histológicos obtidos com sucesso (a extração e corte do cérebro dos ratos 7, 15 e 16 não teve êxito), observa-se que, à exceção de dois casos (um falso positivo – 14 – e um falso negativo – 18), a ocorrência de potencial evocado esteve ligada à correta localização do eletrodo de estimulação, o que gera forte indício de sua importância para este experimento.

sinal menos ruidoso, foi utilizada no lugar das séries brutas na apresentação completa dos dados, que consta no Apêndice B. A análise dos espectrogramas, igualmente, não resultou em nenhum padrão reconhecido entre os grupos, tanto pelo cálculo bruto como pela compensação da energia em cada janela (que cresce com o tempo), resultando na distribuição de frequências. A apresentação dos dados segue com as análises temporais aplicadas às janelas de 2s.

Os resultados brutos das demais análises temporais são exibidos na Figura 3.8, que mostra as quantificações de cada método por animal durante o tempo. A distinção interna do grupo de teste foi feita sobre animais que apresentaram (+) ou não (-) algum grau de potencial evocado, relacionado ao correto posicionamento do eletrodo (Figura 3.7). A partir desta divisão, obtiveram-se grupos de comportamento condizente entre as análises, de onde se observa o efeito de cada uma em caracterizar o registro dos animais.

As análises estatísticas não apresentaram, em geral, boa caracterização dos grupos. A variância, representando a energia, apresentou grande diversidade de evolução entre os animais, e como quantifica todos os 2s de cada janela, independente da distribuição temporal interna dos potenciais, possui comportamento semelhante para todos os grupos desenvolvedores de crise. Apesar de seu valor continuamente crescente, e portanto de potencial para quantificar a proximidade da crise, não há nenhuma mudança na *forma* com que este valor evolui, e a adoção de um limiar é inviável pois a métrica varia bastante de animal para animal. Sua utilização como preditora de crise é, portanto, sem sentido. A assimetria demonstrou, igualmente, um comportamento

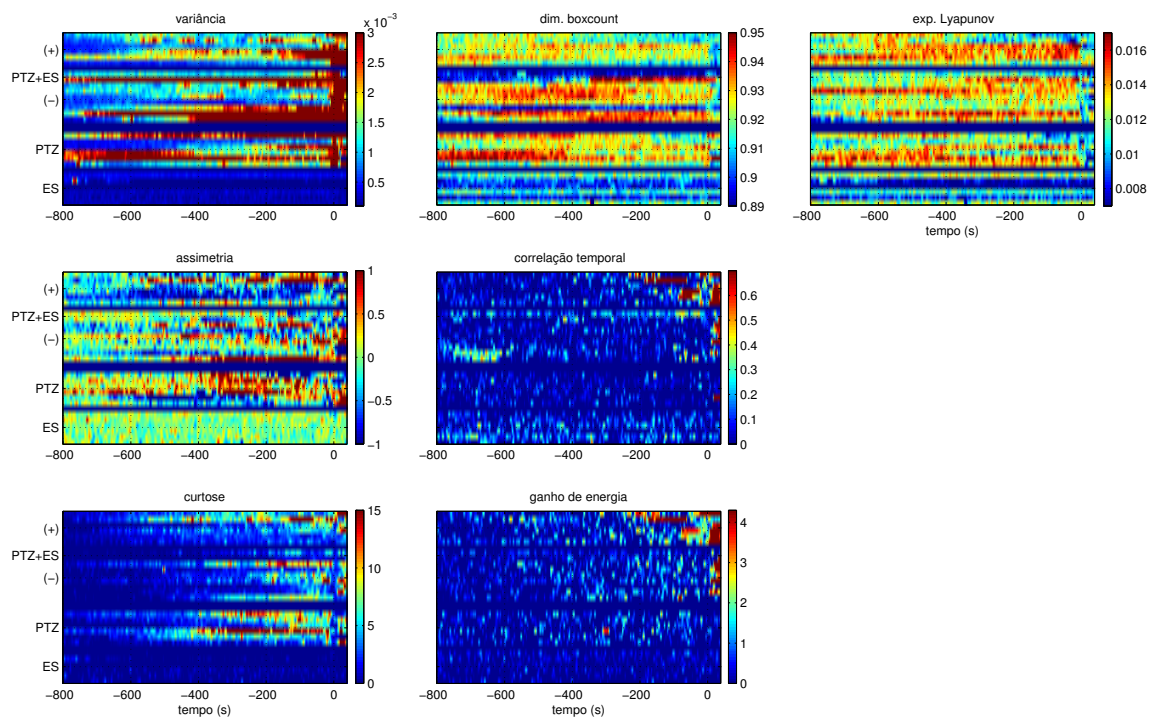


Figura 3.8: Análises temporais por animal. As análises estão quantificadas pela cor, os animais estão agrupados e separados verticalmente, e o tempo é representado pelo eixo horizontal

inconsistente, apresentando tendências positivas para alguns animais e negativas para outros. A curtose, por fim, obteve valores diferentes isolados, não servindo portanto para caracterização de grupos ou mesmo da evolução temporal. Todas as análises apresentaram valores baixos para o grupo *EE*, o que era de se esperar devido à baixa amplitude e complexidade do sinal.

As análises não-lineares, assim como as estatísticas, discriminaram claramente o grupo *EE*, devido a sua baixa complexidade, mas sua alta variação intragrupos para os demais impossibilitou seu uso classificatório, apesar de quantificarem bem a simplificação do sinal a partir do momento da crise ( $t=0$ ).

As análises de correlação temporal e ganho de energia, no entanto, se mostraram ótimos discriminantes do grupo *PTZ+EE(+)* dos demais, por terem foco na característica especial deste: os potenciais de ação sincronizados ao estímulo. A ocorrência simultânea de alta correlação entre janelas e alto ganho de energia após a estimulação indica não só a presença de um potencial alinhado temporalmente com este como sua estabilidade ao longo do tempo, configurando uma resposta cíclica com período de 2s.

A diferença estatística entre grupos é exibida na Figura 3.10 caracterizando o nível de significância  $\alpha$  da unicidade do grupo de teste *PTZ+EE(+)* (definido como o menor  $\alpha$  na comparação entre todos os outros grupos), calculada para todas as análises ao longo do tempo.

A partir destes dados, fica clara a aplicação dos métodos de correlação e detecção

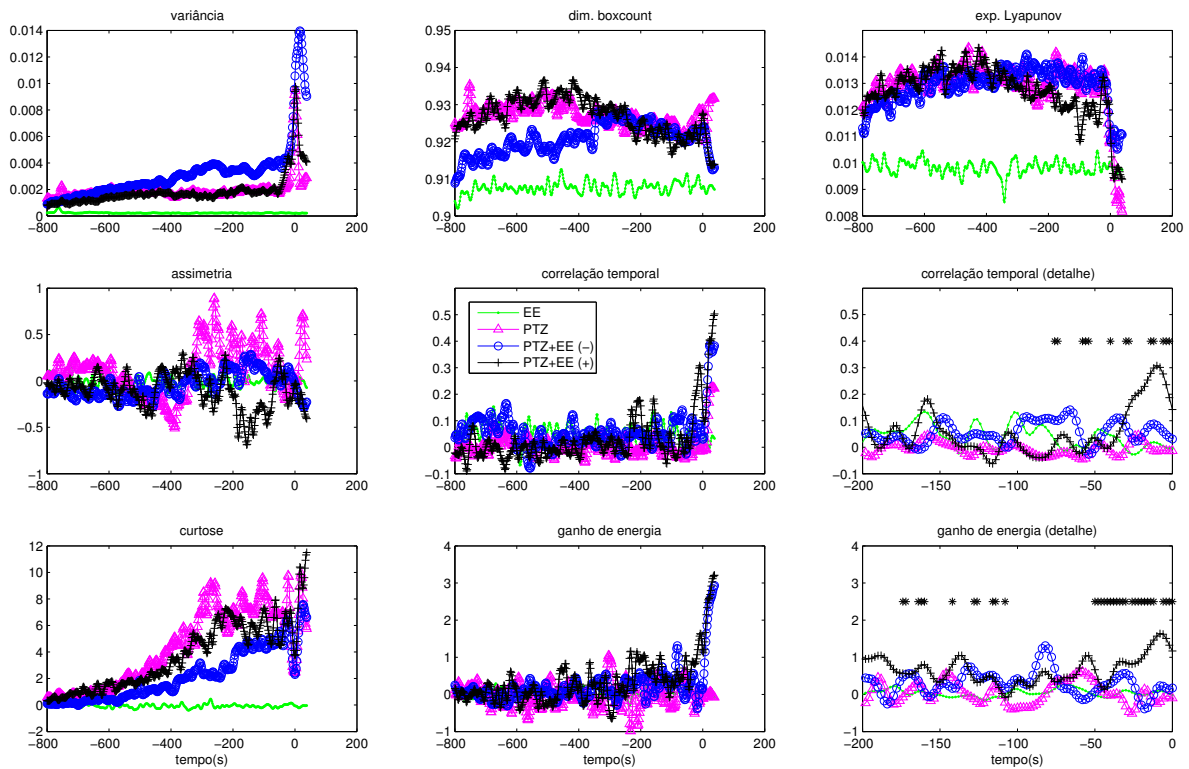


Figura 3.9: Análises temporais médias por grupo. Os asteriscos nos dois gráficos inferiores à direita – que são um detalhe das análises respectivamente à sua esquerda nos 200s que precedem a crise – indicam momentos de disparidade estatística entre o grupo de teste  $PTZ+EE(+)$  e os demais ( $\alpha = 0,95$ )

de potencial como indicadores da sincronia dos potenciais que, utilizados em outro registro baseado no mesmo experimento, podem servir para identificar a pertinência a este grupo e, portanto, implicar a ocorrência de uma crise convulsiva iminente.

A Figura 3.9 exibe, para fins de comparação com a Figura 3.8, as análises temporais médias por grupo, atentando para o detalhe temporal da correlação e ganho de energia nas proximidades da crise, demonstrando os momentos de disparidade estatística em relação aos demais grupos ( $\alpha > 0,95$ , conforme Figura 3.10). Os sinais, além de constituírem valores médios, estão suavizados no tempo para facilidade de visualização, o

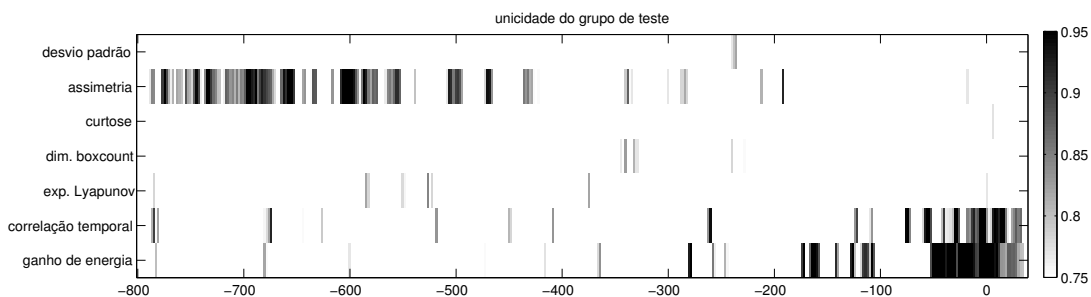


Figura 3.10: Unicidade do grupo de teste para todas as análises ao longo do tempo

que pode comprometer a o alinhamento das médias com a detecção de suas diferenças.

### **3.4 Conclusão do Capítulo**

Neste capítulo foram apresentados os métodos de análise temporal utilizados junto à sua justificativa perante os dados, levando-se em conta o histórico de análises utilizadas na literatura bem como características inerentes aos dados do experimento em questão, levantando o uso de ferramentas específicas para melhor caracterização destes dados.

No próximo capítulo será feita a caracterização da evolução da dinâmica neural com informação obtida na análise do domínio do tempo realizada neste capítulo.



# Caracterização da Evolução Neural no Período Pré-Crise Epiléptica

---

Além de se caracterizar o sinal ao longo do tempo, é feita também a localização, caracterização e análise da distribuição de formas de onda específicas ao longo do registro – os potenciais de ação. Pressupõe-se que cada circuito neural local, formado pelo disparo de um grupo de neurônios, gera uma forma de onda específica no registro, dependente da natureza das interações entre as células, que é diferente para cada circuito neural (Reichinnek et al., 2010). A partir disto, foram feitas tentativas de identificar diferentes potenciais de ação ao longo do tempo e quantificar como estes se alteram (ou se agrupam) até a composição do potencial de ação final, que eventualmente se sincroniza à estimulação elétrica no grupo de teste. O objetivo destas análises é reforçar a ideia de uma evolução gradual da dinâmica neural, conforme quantificado pelas análises temporais.

Para localização e caracterização destes potenciais foram feitas duas abordagens distintas: a abordagem padrão de detecção automática – localizando todos os formatos de onda que atendem um certo requisito, como amplitude, e os classificando –, e uma abordagem específica de detecção forçada, na qual uma forma de onda, semelhante a alguma parte do potencial de ação final, é escolhida, em um instante temporal distante da crise. Esta forma de onda é então mapeada forçosamente (através da localização das formas de onda mais próximas) em janelas temporais curtas até o instante da crise, processo no qual a forma de onda média se adapta gradualmente, quantificando visualmente a evolução na dinâmica da rede neuronal.

Se tratando de eventos discretos, a assinatura temporal de cada onda foi verificada pela construção de mapas de primeiro retorno (Small, 2005) e defasagem em relação ao estímulo (quando presente) – seu uso será detalhado ao final da seção 4.1.

## 4.1 Detecção Automática

A primeira abordagem feita é a localização automática de potenciais de ação, que permite estudar a distribuição do disparo de diferentes grupos neurais ao longo do registro. A localização e agrupamento dos sinais consiste em duas etapas: detecção e classificação. A detecção se trata da extração de trechos da série temporal de informação significativa – os potenciais de ação. Tal extração depende de um algoritmo para

detecção dos potenciais do sinal de fundo e a definição de seus limites temporais, normalmente um ponto de referência e uma janela de extração em torno deste.

A largura da janela de corte para as ondas detectadas foi calculada a partir da distribuição de largura de flutuações mais gerais do sinal. Primeiramente, define-se um possível potencial de ação como qualquer flutuação de sinal acima de 3 desvios padrão do registro de fundo (calculado a partir dos primeiros 200s do experimento, onde são raras as ocorrências de picos) e com duração mínima de 20ms, definida como o intervalo de tempo incluindo o pulso e delimitado pelos momentos em que a tensão do EEG tende a zero. Os formatos de onda apresentando tais requisitos são extraídos do registro e, através da montagem de um diagrama duração  $\times$  amplitude, determina-se a melhor largura para a janela de captura dos potenciais. Segundo os resultados exibidos na Figura 4.1, a duração desta janela foi determinada em 250ms.

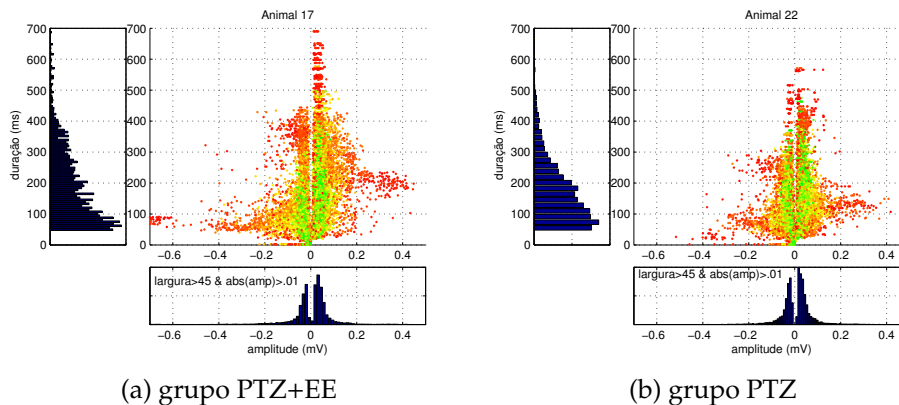


Figura 4.1: Determinação da duração da janela de corte dos potenciais de ação. Animais exemplo de cada grupo com atividade neural. A duração escolhida foi de 250ms.

O algoritmo de detecção (Figura 4.2) parte de um limiar na variação do sinal, buscando captar uma maior diversidade de ondas (Aksenova et al., 2003). Para minimizar ruídos foi realizado o mesmo procedimento que para o cálculo da dimensão boxcount – filtragem média móvel, atraso de fase nulo,  $n = 3$ . Buscando ainda melhor discriminação entre ruído e sinal, a detecção (Fig. 4.2b) passou adicionalmente por uma estimação de densidades de violação do limiar (4.2c), assumindo que um pulso neural apresenta violações de limiar consecutivas (ou bem próximas) e um pulso ocasionado por ruído não. Esta densidade foi calculada somando-se uma janela *Hamming* de largura  $l = 250ms$  em torno de cada ponto, e ao final do procedimento os máximos locais de densidade  $d > 22$  – o que corresponde aproximadamente a 30 violações em uma vizinhança de 80ms, dado o formato da janela (valor empírico) – são identificados como pertencentes aos pulsos identificados. Finalmente, foi estabelecido um ponto de referência para o corte – as janelas foram extraídas centradas no mínimo local da série temporal na vizinhança da detecção (4.2d). As ondas detectadas foram, finalmente, organizadas em uma matriz, de onde seguiu a etapa de classificação das mesmas.

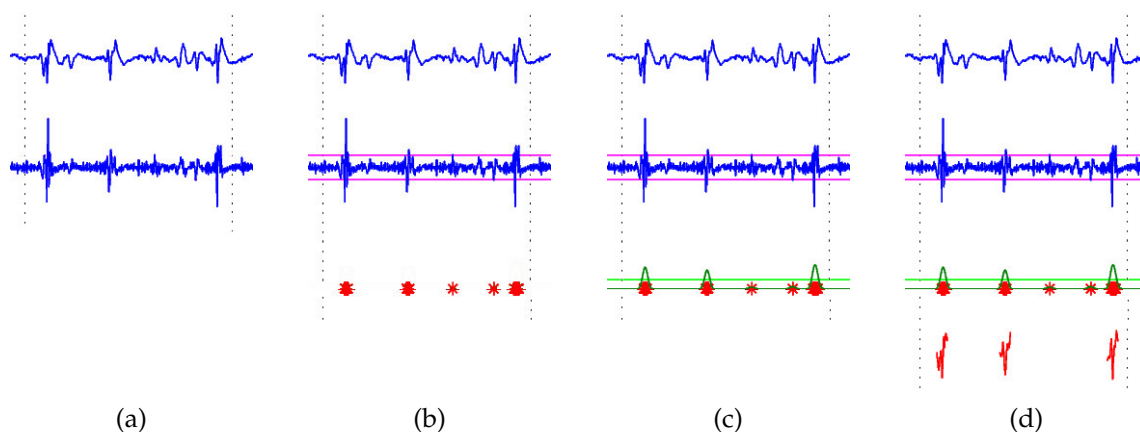


Figura 4.2: Algoritmo de detecção automática. (a): sinal+derivada, (b): limiar de detecção, (c): densidade de detecções, (d): potenciais extraídos do sinal.

### 4.1.1 Classificação

A classificação dos pulsos consiste em agrupá-los conforme sua proximidade, utilizando alguma medida de distância (Lewicki, 1998). Optou-se, para facilidade de visualização e validação dos agrupamentos, em reduzir a dimensão dos dados, fazendo-se a classificação através de parâmetros calculados a partir dos dados temporais, o que efetivamente reduz as ondas de centenas de pontos a menos de uma dezena. Essa transformação permite também a utilização dos três dados mais representativos na construção de um diagrama em três dimensões, onde se observa claramente a distribuição dos grupos. Para redução dos dados, foram aplicadas três técnicas (Nait-Ali, 2009):

- *Componentes principais*: a análise por componentes principais (PCA) combina linearmente diferentes pontos nas formas de onda, retornando um sinal de mesmo tamanho, mas com a informação (energia) concentrada nos primeiros componentes. Assim, poucos dados são necessários para grande parte da energia do sinal. Foram escolhidos os três primeiros componentes para construção do diagrama tridimensional (Figura 4.3c) e, para representação dos dados, foram escolhidos 10 componentes, valor selecionado por permitir reconstrução de 95% em praticamente todos os sinais estudados.
- *Wavelets*: a decomposição por wavelets é similar a um espectrograma, com a adição de diferentes resoluções tempo/frequência, o que permite, em geral, uma representação mais eficiente (em menos componentes) de um sinal. Seu uso foi motivado pelos trabalhos de Quiroga et al., ao resultar em melhor separação do que a decomposição PCA. Os coeficientes para comparação foram escolhidos, baseado em um de seus trabalhos (2004), através de um teste de não-normalidade em sua distribuição (Jarque and Bera, 1987), visando a escolha de possíveis distribuições multimodais, que englobem diferentes concentrações de valores e, assim, permitam a distinção de grupos. O número de componentes escolhidos foi também 10, permitindo uma comparação da eficiência com o método PCA, e os

três coeficientes de maior não-normalidade (segundo a estatística do teste) foram utilizados para representação (Figura 4.3b).

- *Modelagem AR*: para cada onda foi, ainda, ajustado um modelo autorregressivo (AR) de ordem  $n = 10$ , com coeficientes calculados através do método de mínimos quadrados, utilizando a informação temporal de cada onda. A quantidade de coeficientes foi escolhida baseada na janela de predição necessária para estimação da dinâmica de um pico de onda, de duração na ordem de dezenas de amostras, e permitindo também comparação direta com os outros dois métodos de decomposição. Os coeficientes utilizados para representação foram, como para o caso das wavelets, escolhidos baseados em sua não-normalidade.

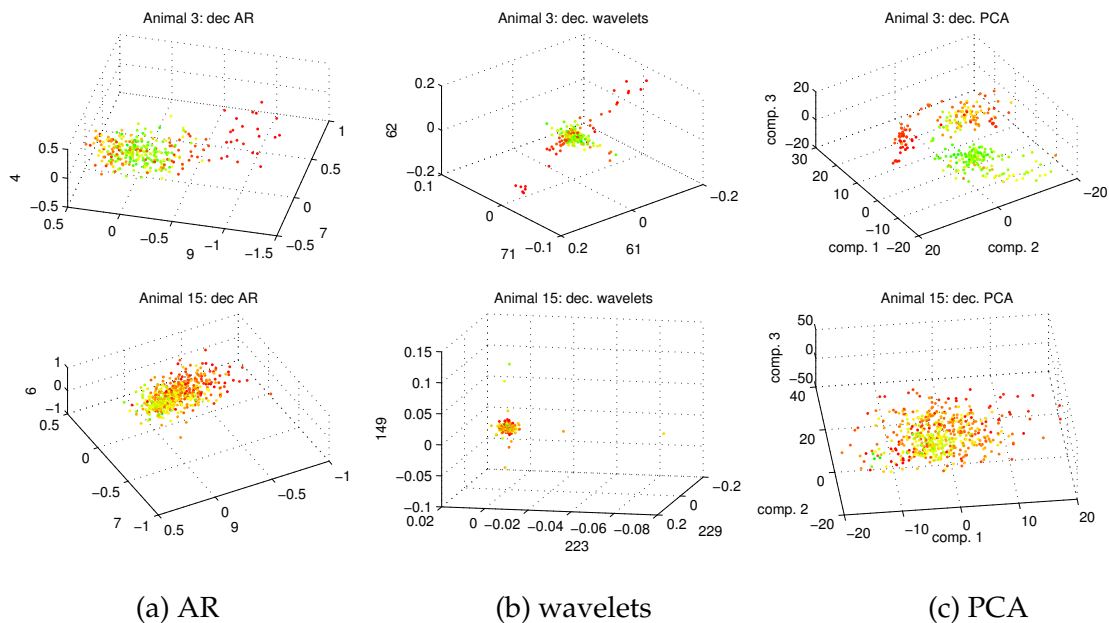


Figura 4.3: Métodos de decomposição testados. (a): modelagem AR ( $n=10$ ), (b): decomposição por wavelets, (c): decomposição por PCA. A decomposição é exibida para dois animais diferentes, mestrando características gerais de cada uma.

Dada a diversidade de características das séries temporais, a separação de ondas foi executada independentemente para cada animal, resultando em diferentes classificações. A comparação final entre os animais foi feita utilizando a visão geral da evolução dos grupos indentificados, através de sua distribuição temporal. Quanto à extração de características, as três formas (PCA, decomposição por wavelets e modelagem AR) foram executadas em cada animal, escolhendo-se a que apresentasse melhor segregação dos dados. Os resultados seguiram, em geral, as formas apresentadas na Figura 4.3, onde se observa que:

- a decomposição por wavelets, ao contrário da referência utilizada (Quiroga et al., 2004), extrai dados muito semelhantes para as ondas, resultando em um agrupamento compacto e dificultando a distinção entre grupos;

- a modelagem AR tem seus parâmetros variando contínua e consistentemente no tempo, resultando em ótima classificação temporal dos padrões;
- a decomposição por PCA se mostrou a mais eficiente nos casos de sincronia com o estímulo: a mudança de valores permitiu clara distinção. Nos demais casos, porém, nenhuma organização dos dados foi observada.

Por fim, a melhor separação é submetida a um algoritmo de agrupamento por  $k$ -médias (Lewicki, 1998), onde o parâmetro  $k$  é inserido manualmente pela observação dos dados. O resultado final de exibição (Figura 4.4) é, então, adicionado da informação das análises temporais, conforme disposto a seguir.

Os métodos de análise temporal – mapa de primeiro retorno e defasagem – foram inicialmente comparados de modo a se escolher um padrão para ser utilizado em todos os animais, tanto para detecção automática descrita quanto para a detecção forçada que consta na seção 4.2. A Figura 4.5 ilustra as características principais de cada análise: o mapa de primeiro retorno permite visualizar a tendência temporal de repetição das ondas, sendo interessante sua aplicação para determinação do período de repetição para o grupo PTZ (sem estimulação) – esta foi, inclusive, a análise utilizada para se determinar o período de 2s de estimulação utilizado neste trabalho (Cota, 2007) –, mas falha na detecção de algumas ondas consecutivas, caso no qual gera pontos espúrios. Este fato não ocorre utilizando a defasagem, que ainda possui a vantagem de poder ser sobreposta ao sinal bruto dividido em janelas, facilitando a validação de sua detecção. A análise temporal adotada para as detecções foi, portanto, a defasagem em relação ao estímulo.

## 4.2 Detecção Forçada

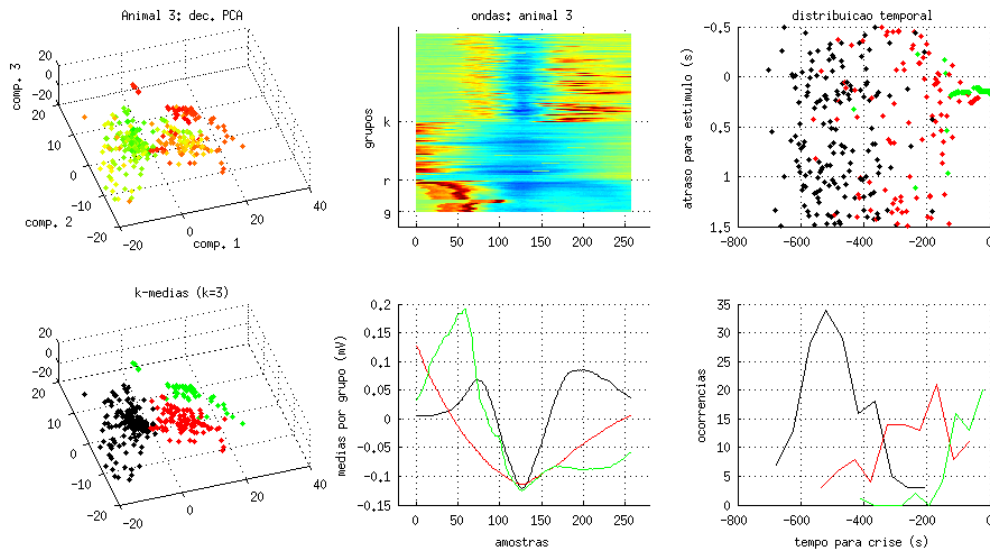
Tendo em vista a contínua evolução do sinal EEG, propôs-se o reconhecimento de uma determinada forma de onda ao longo do tempo, partindo de um sinal de referência e percorrendo todo o registro à procura de janelas de tempo com conteúdo semelhante. Desta maneira, pode-se averiguar o disparo de um determinado circuito neural ao longo do registro, acompanhando sua forma de onda característica, assim como seu comportamento temporal.

A sequência de operações do algoritmo de detecção forçada é exibida na Figura 4.6, que acompanha passo a passo a seleção da terceira forma de onda exibida para o animal 12. O algoritmo consta das seguintes etapas:

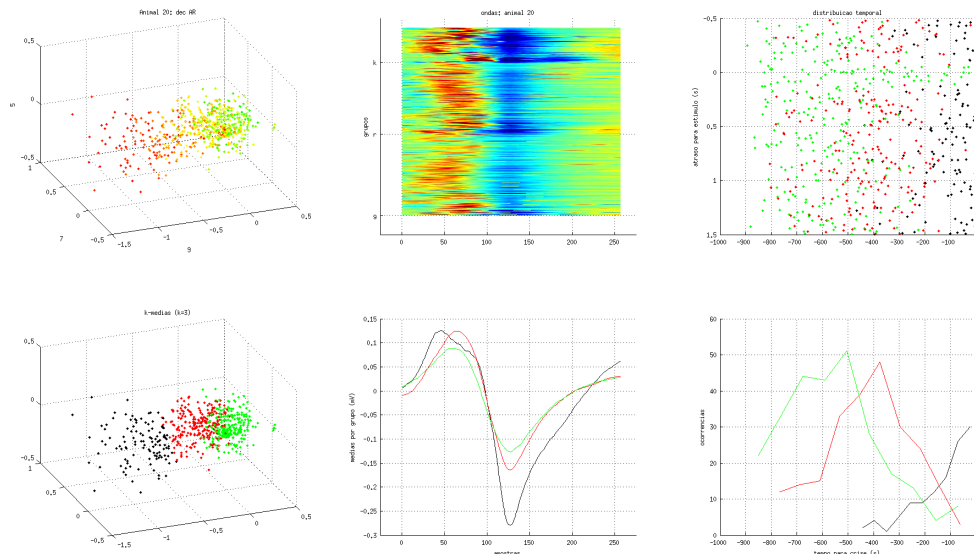
- *seleção de uma forma de onda*: o formato de onda de referência é escolhido manualmente. Suas características gerais são a pertinência a um formato de onda que exista na iminência da crise, duração compatível com o estipulado na detecção automática (250ms) e localização temporal precoce (400 ~ 600s antes da crise) (Figura 4.6a,b).
- *adaptação do formato*: esta etapa automática é a essência do algoritmo, e é detalhada mais à frente. Através da busca de formatos de onda próximos na vizi-

nhança do formato escolhido, é possível a adaptação gradual do formato original até algum formato componente do potencial de ação final (Fig. 4.6d).

- *validação da seleção*: o objetivo geral desta detecção é estudar diferentes assinaturas de EEG, logo o sinal escolhido é comparado aos sinais já gravados para aquele mesmo animal. A métrica utilizada na detecção dos formatos de onda próximos é utilizada na comparação dos sinais, indicando casos em que os dados seriam



(a) decomposição por PCA



(b) decomposição por modelagem AR

Figura 4.4: Algoritmo de detecção automática. A primeira coluna exibe a decomposição escolhida e respectiva divisão por k-médias. Ao meio, os formatos de onda agrupados (cima) e a média de cada grupo (baixo). À direita, a assinatura temporal de cada onda e o histograma de ocorrências ao longo do tempo.

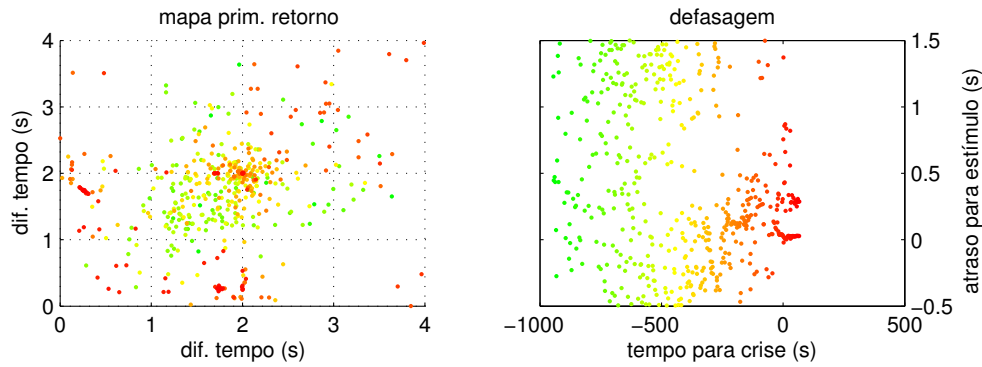


Figura 4.5: Comparação de análises temporais para detecção

considerados como do mesmo circuito (Fig. 4.6d,f)

A detecção de ondas próximas foi implementada de várias maneiras e testada exhaustivamente – o algoritmo, dada a inicialização e comparação final de forma manual, é pouco determinístico quanto aos resultados. A partir do ponto de escolha da onda de referência, o registro na vizinhança da onda (a divisão final escolhida foi de janelas de 20s, um compromisso entre quantidade de ondas – 10 ciclos de estimulação – e velocidade de adaptação) é percorrido ponto a ponto, extraíndo de cada vez uma janela de mesma duração que a onda de referência, de onde se passa à comparação. A comparação direta, visando adaptação a mudanças de amplitude e expansão/contração temporal, passa por uma série de padronizações. Os modelos de compensação de amplitude testados foram, para um formato de onda genérico  $x$ :

- Ajuste no intervalo  $[-1,1]$ : divisão pelo valor máximo absoluto,  $x = x/\max(|x|)$ ;
- Ajuste no intervalo  $[0,1]$ :  $x = (x - \min(x))/(\max(x) - \min(x))$ ;
- Normalização:  $x = (x - \mu_x)/\sigma_x$ .

Para compensação de expansão/compressão temporal, o algoritmo de executado para várias ondas  $x'$  construídas a partir de  $x$  através de interpolação por *splines*, reamostragem e corte centralizado, de modo a garantir mesma duração (no caso de expansão).

Em todos estes casos, a distância entre dois formatos de onda foi quantificada pelo valor quadrático médio da diferença entre seus pontos, expresso por

$$d = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (r_k - x_k)^2 ,$$

para uma onda de referência  $r$  e uma onda de teste  $x$  constituídas por  $n$  pontos cada.

Os testes com a expansão temporal da onda na série de dados foram abandonados, pois como o registro se torna gradativamente mais organizado, houveram muitas ocorrências em que a onda se adaptava ao sinal de fundo, cada vez mais lento e de menor amplitude, descaracterizando portanto o objetivo de mapear disparos característicos até a crise.



Como alternativa a estes métodos, e desconsiderando a expansão temporal, a padronização e o cálculo de distância foram implementados também, de uma só vez, através do coeficiente de correlação de Pearson (conforme as análises temporais na seção 3.2.2), quantificando a distância como o complemento do coeficiente, ou seja,  $d = 1 - C_p$ . Após testes experimentais, esta análise foi a adotada para geração dos gráficos aqui representados, por apresentar consistência nos formatos de onda adaptados e por apresentar custo computacional relativamente baixo.

Após calculadas as distâncias entre todas as ondas da janela de análise e a onda de referência, faz-se a escolha das ondas mais próximas para atualização da referência para a próxima janela. Primeiramente, escolhem-se os mínimos locais de distância na janela como candidatos a ondas próximas. Em seguida, faz-se a ordenação dos pontos quanto à distância. Como etapa final, escolhe-se um determinado número de ondas para se

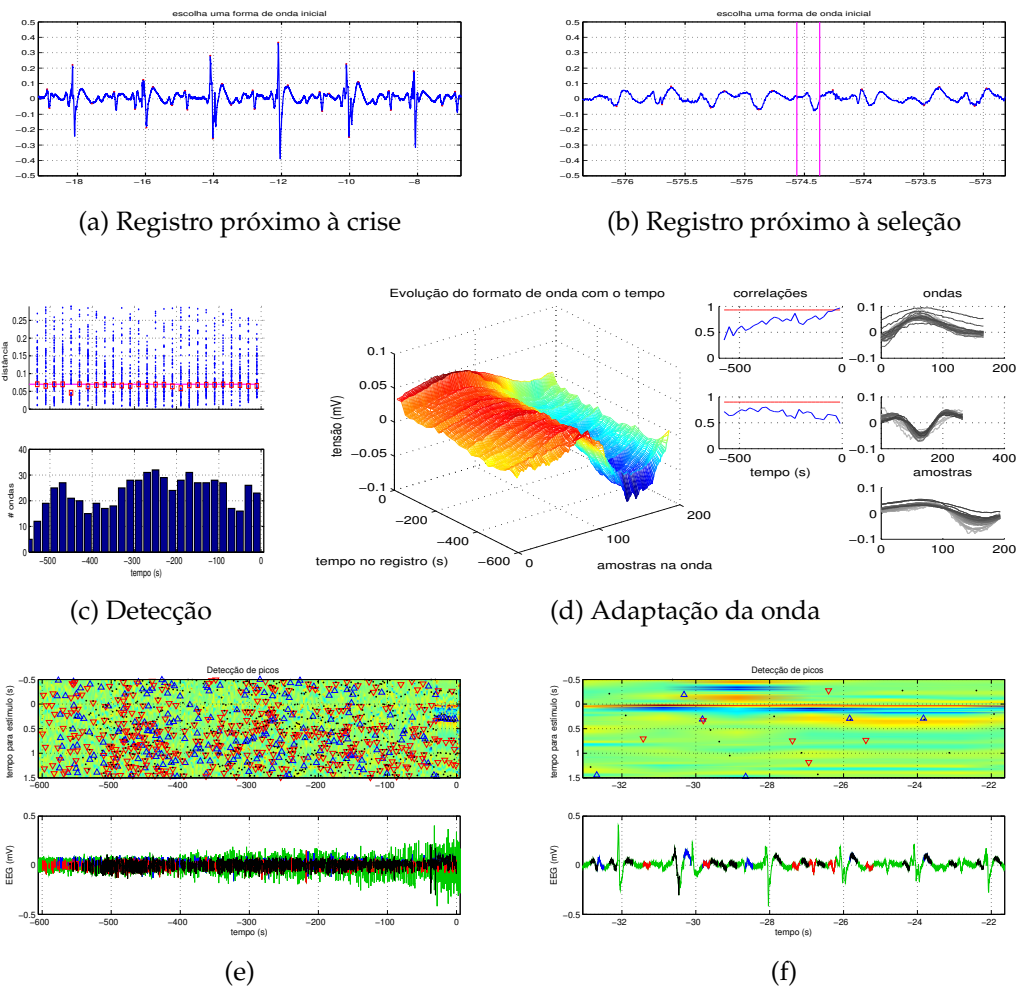


Figura 4.6: Algoritmo de detecção forçada. O sinal selecionado em (b) é semelhante ao formato exibido em  $t = -13s$  em (a). Este sinal apresenta grande frequência no registro (c) e se acomoda em uma forma de onda semelhante ao primeiro sinal já gravado (d). Em (e) temos a representação dos três sinais salvos no registro e em (f) visualizamos o momento em que o primeiro (azul) e terceiro (preto) sinais se adaptam no mesmo ponto do registro.



fazer a promediação e atualização da referência. Para a escolha deste número, foram implementados três métodos: determinação de um número fixo, seleção de pontos abaixo de um certo valor de referência (tolerância) e detecção de agrupamento. Esta última análise consiste em, a partir de um número mínimo de pontos ( $n = 3$ ), escolher recursivamente o próximo ponto até que a distância deste ao grupo seja maior que o dobro da distância entre o último e o penúltimo elemento do grupo (vide seção A.4). A escolha final foi o método de tolerância, por garantir ondas suficientemente próximas, restrito a um número mínimo de pontos ( $n = 3$  e  $tol = 0,07$ , conforme Figura 4.6c).

Definidos os detalhes de detecção, o seguimento da onda de referência é finalmente executado através da aplicação recursiva da detecção, em janelas subsequentes de 20s, retornando para cada uma um formato de onda. Esta análise foi feita objetivando a identificação, em cada animal, de três formatos de onda diferentes – apresentando entre si, durante todo o registro, uma distância maior que a tolerância utilizada para encontrá-las automaticamente. Estas ondas representam diferentes circuitos neurais, sob a assunção que cada um tem sua própria assinatura eletroencefalográfica (Reichinnek et al., 2010), permitindo a análise temporal comparativa dos mesmos. Esta análise temporal foi executada através do mesmo gráfico de defasagem utilizado na detecção automática, permitindo a comparação entre as duas formas de detecção.

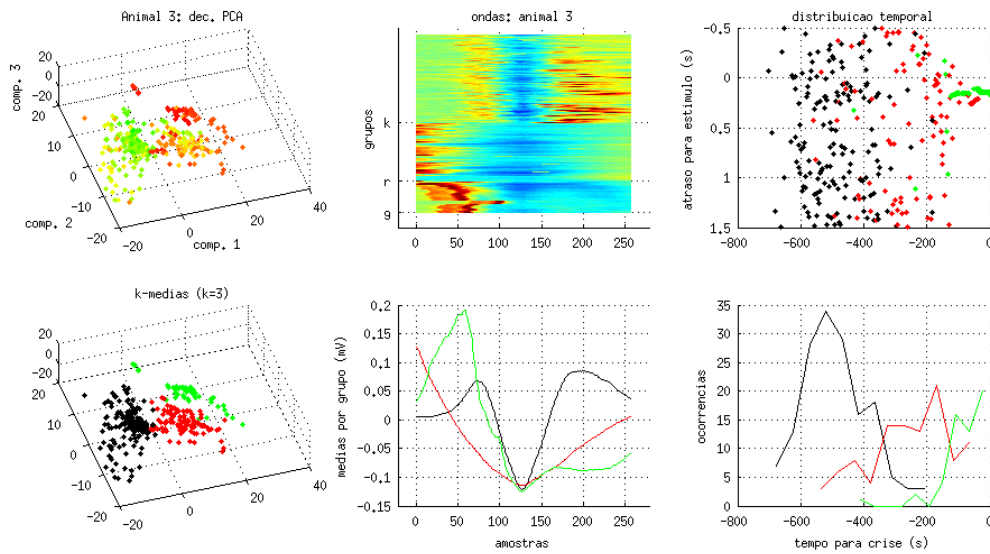
## 4.3 Resultados e Discussão

A detecção automática de potenciais de ação permitiu, como esperado, identificar formatos de onda bem diversificados (vide Apêndice B), o que permitiu a análise de sua separação temporal assim como a separação em grupos, precedida de extração de parâmetros, comentados a seguir. Para os animais que apresentaram potencial evocado claro, como já dito, a decomposição utilizada para caracterização foi a PCA, e nos demais casos, AR.

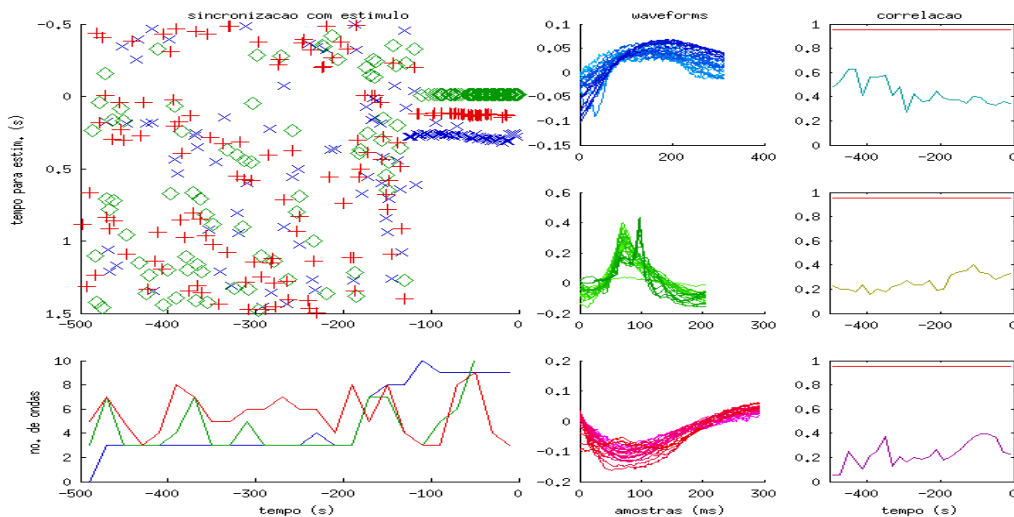
Independente do método de decomposição, no entanto, pôde-se observar que, apesar de utilizar técnicas simples, os grupos de onda identificados são temporalmente consistentes. De modo geral, os resultados da detecção automática indicam formatos de onda diferentes que predominam em instantes de tempo diferentes, ou coexistem, mas têm certa estrutura temporal. Citando como exemplo a Figura 4.7a, observamos uma forma de onda em preto de baixa amplitude e maior ocorrência em torno de  $-500s$ . Esta onda vai, aos poucos, dando lugar à representada em vermelho, de maior amplitude e mais lenta, concentrada na vizinhança de  $-200s$ . Por fim, a onda em verde, caracterizada por um pico súbito, seguida de uma depressão lenta, surge nas imediações da crise, e além disto ocorre de maneira síncrona à estimulação. Esta figura demonstra que a detecção automática permite quantificar a evolução dos formatos de onda, e correlacionar a evolução deste formato com a sincronia ao estímulo, exemplificando o processo de recrutamento neural.

A Figura 4.7b exibe a detecção forçada para o mesmo sinal, de onde se notam as principais diferenças entre os dois algoritmos: como neste caso os formatos de onda são forçadamente atualizados, mesmo que não haja formatos tão próximos, a evolução

pode ser representada, não se limitando às características iniciais da onda escolhida – presença de rápidas variações (picos). A aplicação do método em três formatos de onda distintos permite ainda observar a evolução gradativa das ondas para a composição do potencial de ação final sincronizado ao estímulo, além de confirmar a unicidade de cada formato, pois estes se mantêm distintos ao longo da evolução. Nota-se que, neste caso, além da sincronia à estimulação, cada formato de onda se estabelece em



(a) Detecção automática (Animal 3)



(b) Detecção forçada (Animal 3)

Figura 4.7: Comparação entre detecções automática e forçada. O gráfico da detecção forçada contém a assinatura temporal dos três modelos diferentes e sua frequência de ocorrência ao longo do tempo (à esquerda), a adaptação destes modelos ao longo do tempo (centro) e a correlação cruzada entre estes (à direita). Nota-se que, independente do tipo de detecção, é possível visualizar o acoplamento temporal à estimulação elétrica, com a detecção forçada retornando maior informação sobre esta organização.

uma defasagem fixa a partir desta, ou seja, o estímulo serve como ponto de referência, caracterizando um *atrator neural* que força diferentes grupos de neurônios à sincronia, ainda que cada um se conecte à rede com um atraso distinto.

O principal ganho no uso de estimulação elétrica, conforme determinado por estas análises, está no fato de o sistema construir uma resposta temporal regida por um sinal conhecido, e não de maneira totalmente autônoma, o que permite um fácil reconhecimento de um período pré-crise. A detecção em uma animal sem estimulação desenvolve sua própria assinatura temporal, como por exemplo a exibida na Figura 4.8, que precisa ser estimada por um mapa de primeiro retorno, é inconstante ao longo do tempo e varia de animal para animal.

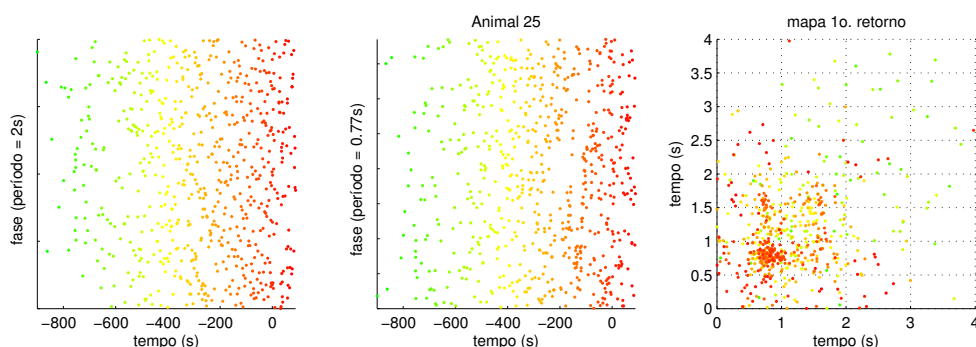


Figura 4.8: Estimação de recorrência temporal para um animal do grupo *PTZ*. A divisão original em janelas de 2s (esquerda) não retorna qualquer indício de sincronia. O período de recorrência é estimado através de um mapa de primeiro retorno (direita), refazendo a divisão neste caso com uma janela de 770ms (centro). A divisão, ainda sim, não ocorre claramente (compare com a Figura 4.5, pg.37, em que os pontos finais, em vermelhos, estão muito mais organizados), pois a rede responde seguindo um atrator neural interno de comportamento desconhecido e variável.

## 4.4 Conclusão do Capítulo

A conclusão geral sobre a classificação foi que, apesar das técnicas simples utilizadas, obteve-se êxito em detectar a mudança das formas de onda ao longo do tempo, separando classes em que a distinção de características ocorre conforme o registro prossegue, assim como a caracterização das classes que existem ao longo do tempo e que coexistem temporalmente. A caracterização de uma classe de ondas condizentes ocorrendo de maneira síncrona à estimulação serve como métrica inequívoca da iminência de crise, sendo corretamente caracterizada nos dois casos, com maior detalhe no caso da detecção forçada.



## Conclusões

---

A aplicação de estimulação elétrica como auxiliar na predição de crises epiépticas se mostrou eficiente ao permitir a aplicação de métodos simples (sincronia) para caracterização do momento pré-ictal que precede a crise. Os métodos temporais normalmente utilizados para análise do EEG obtiveram respostas condizentes com as já apresentadas na literatura, tendo este trabalho utilizado principalmente da redistribuição dos potenciais de ação (organização temporal) decorrente do acoplamento à estimulação elétrica.

Quanto à detecção dos potenciais de ação, o mapeamento forçado de ondas escolhidas manualmente pareceu encontrar formas que convergem para algum momento do potencial evocado pré-crise (quando presente), havendo casos de convergência para os mesmos formatos e estabilização em diferentes defasagens com a estimulação elétrica. Ainda que não haja a garantia de que as formas de onda não tenham se desfigurado pelo sinal (pela aplicação de médias ao longo do algoritmo), há bons indícios de que cada potencial de ação de alguma forma se adapta e se sincroniza ao estímulo, formando assim um potencial evocado consistente, que é indicador conclusivo de iminência da crise epiléptica.

### 5.1 Atendimento aos Objetivos Iniciais

O atendimento dos resultados do trabalho aos objetivos iniciais propostos pode, agora, ser validado:

- *validação do experimento*: Conforme seção 3.3.1, as crises desenvolvidas pelos grupos *PTZ+EE* e *PTZ* foram estatisticamente semelhantes, o que juntamente à ausência de crises no grupo *EE* valida as suposições iniciais para realização do experimento – a estimulação elétrica por si só não provoca crise nem altera sua manifestação.
- *quantificação de alterações no EEG e comparação com métodos clássicos*: tanto pelos métodos de análise temporal (seção 3.3.2) quanto por caracterização dos potenciais de ação (seção 4.3) observa-se a evolução gradual do EEG de um padrão neutro até mudança abrupta no decorrer da crise epiléptica. Os métodos clássicos, essencialmente as ferramentas de análise temporal, obtiveram respostas condizentes com a literatura (Litt and Echauz, 2002; Jachan et al., 2008): análises

"lineares"(momentos estatísticos) detectam somente a transição entre os estados normal e epiléptico; ferramentas não lineares (Lyapunov e dimensão fractal) conseguem, em alguns casos, perceber a mudança dinâmica que precede a crise, o que vale também para a detecção por sincronismo (correlação). O diferencial deste trabalho foi a aplicação de estimulação, o que permitiu a aplicação de algoritmos de detecção de sincronismo de modo temporal em um mesmo canal, contrastando com a aplicação padrão na comparação da resposta de múltiplos canais (Pereda et al., 2005). A estimulação permitiu também a utilização da informação temporal dos potenciais de ação detectados na qualificação da dinâmica do sistema.

- *atestar a validade da mudança dinâmica provocada pela estimulação elétrica*: a estimulação não alterou quantitativamente o recrutamento neural – a evolução de energia é semelhante para os grupos *PTZ+EE* e *PTZ*, conforme seção 3.3.2 –, mas alterou sua organização temporal, o que é perceptível em sua dinâmica – há uma *organização temporal* do sinal em resposta à estimulação, o que permite tratá-la como um *atrator neural*, e possibilita os resultados obtidos pela aplicação da detecção da sincronia dos potenciais de ação tanto como uma análise temporal (em relação ao momento do estímulo) quanto por detecção direta (algoritmos do Capítulo 4). A estimulação, portanto, se mostrou essencial por provocar uma alteração dinâmica significativamente vantajosa para a aplicação de algoritmos de predição.
- *analisar a eficiência da predição e limitações do método*: conforme exposto na introdução aos objetivos do trabalho (seção 1.2), não é possível analisar a eficácia da predição quanto à ocorrência ou não da crise, uma vez que as crises são provocadas por medicamento e sempre ocorrem em um prazo de cerca de dez minutos após o início do experimento. O que se analisa neste caso é a eficiência em retornar um parâmetro prévio que caracterize um momento *pré-ictal* – no caso a cadência temporal, ou sincronismo à estimulação, observado nos potenciais de ação gerados. Deste modo, a aplicação do estímulo força uma sincronia neuronal em um padrão conhecido (fornecido ao sistema) e facilmente identificável, que nos casos de sucesso ocorreu em uma margem da ordem de 1 minuto (60s). Infelizmente, esta detecção se mostrou bastante sensível ao posicionamento do eletrodo de estimulação (seção 3.3.1), o que constitui no momento a maior limitação para aplicação deste método de predição.

Em vista destas análises, pode se considerar que o trabalho cumpriu seus objetivos iniciais, indo ainda além destes ao reforçar a ideia do atrator neural gerado pela estimulação elétrica, que tem sido utilizado como base para futuros trabalhos do NNC.

## 5.2 Publicações Feitas

A produção bibliográfica resultante deste mestrado consiste em duas participações em congresso e um artigo, ainda não aceito para publicação. O primeiro trabalho (Costa et al., 2010) se trata de estudos preliminares sobre métodos de redução de dimensionalidade e análise de sinais, utilizando neste caso a transformada *chirplet*, que

foi descartada pelo alto custo computacional e pouco ganho de informação. Em 2011, a justificativa e implementação do algoritmo de detecção forçada – e suas implicações na estrutura temporal das ondas detectadas – foi apresentado (Oliveira et al., 2011), visando argumentação da metodologia com a comunidade acadêmica. O trabalho de predição, como um todo, foi também apresentado em evento interno do NNC (Medeiros et al., 2010).

O artigo final, ainda não publicado (Medeiros et al., 2013), trata da exploração biológica do termo *atrator neural*, justificando o experimento e analisando os resultados de acoplamento neural sincronizado à estimulação, conforme demonstrado ao longo do trabalho, que abrem possibilidade para a implementação de um sistema confiável de supressão de crises através de uma malha fechada de controle.

### 5.3 Trabalhos Futuros

A continuação direta do projeto do NNC é a repetição dos experimentos em um grupo de animais com marcação de atividade celular (c-Fos) e em animais não anestesiados, o que gera uma nova base de dados para aplicação das técnicas já utilizadas. Quanto às técnicas em si, o presente trabalho pecou pela falta de análises que tirassem proveito dos dois canais de medição (justificado pelo fato de um dos canais ter sido contaminado por ruído em maior escala, gerando dados desequilibrados), assim como um algoritmo de varredura de potenciais de ação que dispense a escolha manual de formatos de onda. Para efeito dos resultados esperados, o trabalho atendeu aos critérios propostos.

A continuação dos experimentos será acompanhada em um aprimoramento na metodologia de obtenção de dados, que tanto aumenta a confiabilidade das observações quanto permite a aplicação de novos métodos, que disporão de mais dados para análise e terão sua eficácia melhor comprovada.

### 5.4 Considerações Finais

O processamento de séries de EEG apresenta um desafio não só pela complexidade do sinal como também pela interdisciplinaridade do processo. Apesar de boas expectativas iniciais, muitos estudos ainda precisam ser feitos até uma eventual aplicação de supressão de crises. As análises realizadas neste trabalho servem como guia e como base para novos métodos, abrindo caminho para que experimentos futuros possam encontrar novas abordagens ao problema de controle da epileptogênese, até possibilitar que este processo seja, enfim, compreendido e controlado com sucesso.





---

## Referências Bibliográficas

---

- Aksenova, T. I., Chibirova, O. K., Dryga, O. A., Tetko, I. V., Benabid, A., and Villa, A. E. P. (2003). An unsupervised automatic method for sorting neuronal spike waveforms in awake and freely moving animals. *Methods*, 30:178–87.
- Andrzejak, R. G., Chicharro, D., Elger, C. E., and Mormann, F. (2009). Seizure prediction: any better than chance? *Clinical Neurophysiology*, 120:1465–78.
- Baumgartner, C., Serles, W., Leutmezer, F., Patarraia, E., Aull, S., and Czech, T. (1998). Preictal SPECT in temporal lobe epilepsy: regional cerebral blood flow is increased prior to electroencephalography-seizure onset. *J Nucl Med*, 39:978–82.
- Blatt, M., Wiseman, S., and Domany, E. (1996). Superparamagnetic clustering of data. *Physical Review Letters*, 76(18):3251–4.
- Calabrese, A. and Paninski, L. (2011). Kalman filter mixture model for spike sorting of non-stationary data. *Journal of Neuroscience Methods*, 196:159–69.
- Cao, L. (1997). Practical method for determining the minimum embedding dimension of a scalar time series. *Physica D*, 110:43–50.
- Chan, H., Wu, T., Lee, S., Lin, M., He, S., Chao, P., and Tsai, Y. (2010). Unsupervised wavelet-based spike sorting with dynamic codebook searching and replenishment. *Neurocomputing*, 73:1513–27.
- Chan, H.-L., Wu, T., Lee, S.-T., Fang, S.-C., Chao, P.-K., and Lin, M.-A. (2008). Classification of neuronal spikes over the reconstructed phase space. *Journal of Neuroscience Methods*, 168:203–11.
- Chisci, L., Mavino, A., Perferi, G., Sciandrone, M., Anile, C., Colicchio, G., and Fuggetta, F. (2010). Real-time epileptic seizure prediction using AR models and support vector machines. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 57(5):1124–32.
- Chua, K. C., Chandran, V., Acharya, U. R., and Lim, C. M. (2010). Application of higher order statistics/spectra in biomedical signals – a review. *Medical Engineering & Physics*, 32:679–89.
- Costa, F. E., Oliveira, L. B., Costa, M. D., and Tierra-Criollo, C. J. (2010). Emprego da transformada chirplet na análise de potenciais de campo locais. In *XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, Tiradentes/MG.

- Cota, V. R. (2007). *Hiperexcitabilidade e Hipersincronismo em Modelos Animais de Epilepsia: Aspectos Temporais do Recrutamento de Substratos Neurais na Ictogênese*. PhD thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Belo Horizonte.
- Cota, V. R., Medeiros, D. C., Vilela, M. R. S. P., Doretto, M. C., and Moraes, M. F. D. (2009). Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. *Epilepsy & Behavior*, 14:26–31.
- De Clercq, W., Lemmerling, P., van Duffel, S., and van Paesschen, W. (2003). Anticipation of epileptic seizures from standard EEG recordings. *The Lancet*, 361:970–1.
- Delamont, R., Julu, P., and Jamal, G. (1999). Changes in a measure of cardiac vagal activity before and after epileptic seizures. *Epilepsy Res*, 35:87–94.
- Eells, J. B., Clough, R. W., Browning, R. A., and Jobe, P. C. (2004). Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylenetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience*, 123:279–92.
- Elliot, R. E., Morsi, A., Kalhorn, S. P., Marcus, J., Sellin, J., Kang, M., Silverberg, A., Rivera, E., Geller, E., Carlson, C., Devinsky, O., and Doyle, W. (2011). Vagus nerve stimulation in 436 consecutive patients with treatment-resistant epilepsy: Long-term outcomes and predictors of response. *Epilepsy & Behavior*, 20:57–63.
- Freestone, D. R., Kuhlmann, L., Grayden, D. B., Burkitt, A. N., Lai, A., Nelson, T. S., Vogrin, S., Murphy, M., D'Souza, W., Badawy, R., Nesic, D., and Cook, M. J. (2011). Electrical probing of cortical excitability in patients with epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 22:S110–8.
- Gluckman, B. J., Neel, E. J., Netoff, T. I., Ditto, W. L., Spano, M. L., and Schiff, S. J. (1996). Electric field suppression of epileptiform activity in hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 76(6):4202–5.
- Gram, L. (1990). Crises e síndromes epilépticas. In da Costa, J. C., editor, *Epilepsy: A Lancet Review*. The Lancet, London.
- Guerreiro, C. A. M., Guerreiro, M. M., Cendes, F., and Lopes-Cendes, I. (2000). *Epilepsia*. Lemos Editorial, São Paulo, 3 edition.
- Harroud, A., Bouthillier, A., Weil, A. G., and Nguyen, D. K. (2012). Temporal lobe epilepsy surgery failures: A review. *Epilepsy Research and Treatment*, (201651).
- Herbst, J. A., Gammeter, S., Ferrero, D., and Hahnloser, R. H. R. (2008). Spike sorting with hidden markov models. *Journal of Neuroscience Methods*, 174:126–34.
- Hsu, D., Chen, W., Hsu, M., and Beggs, J. M. (2008). An open hypothesis: Is epilepsy learned, and can it be unlearned? *Epilepsy & Behavior*, 13:511–22.

- Hume, J. R. and Grant, A. O. (2004). Fármacos utilizados nas arritmias cardíacas: Base iônica da atividade elétrica da membrana. In Katzung, B. G., editor, *Farmacologia Básica e Clínica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9 edition.
- Jachan, M., Drentrup, H. F., Schelter, B., and Timmer, J. (2008). The history of seizure prediction. In Schelter, B., Timmer, J., and Schulze-Bonhage, A., editors, *Seizure Prediction in Epilepsy: From Basic Mechanisms to Clinical Applications*. Wiley-VCH.
- Jarque, C. M. and Bera, A. K. (1987). A test for normality of observations and regression residuals. *International Statistical Review*, 55(2):163–172.
- Kalitzin, S., Velis, D., Suffczynski, P., Parra, J., and Lopes da Silva, F. (2005). Electrical brain-stimulation paradigm for estimating the seizure onset site and the time to ictal transition in temporal lobe epilepsy. *Clinical Neurophysiology*, 116:718–28.
- Kalitzin, S. N., Velis, D. N., and Lopes da Silva, F. H. (2010). Stimulation-based anticipation and control of state transitions in the epileptic brain. *Epilepsy & Behavior*, 17:310–23.
- Kim, K. H. (2006). Improved algorithm for fully-automated neural spike sorting based on projection pursuit and gaussian mixture model. *International Journal of Control, Automation and Systems*, 4(6):705–13.
- Kumar, A., Rotter, S., and Aertsen, A. (2010). Spiking activity propagation in neural networks: reconciling different perspectives on neural coding. *Nature Reviews: Neuroscience*, 11:615–27.
- Letelier, J. C. and Weber, P. P. (2000). Spike sorting based on discrete wavelet transform coefficients. *Journal of Neuroscience Methods*, 101:93–106.
- Lewicki, M. S. (1998). A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network: Comput. Neural Syst.*, 9:53–78.
- Litt, B. and Echauz, J. (2002). Prediction of epileptic seizures. *The Lancet: Neurology*, 1:22–30.
- Lopes, R. and Betroumi, N. (2009). Fractal and multifractal analysis: A review. *Medical Image Analysis*, 13:643–9.
- Lopes da Silva, F. H., Blanes, W., Kalitzin, S. N., Parra, J., Suffczynski, P., and Velis, D. (2003a). Dynamical diseases of brain systems: Different routes to epileptic seizures. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 50(5):540–8.
- Lopes da Silva, F. H., Blanes, W., Kalitzin, S. N., Parra, J., Suffczynski, P., and Velis, D. N. (2003b). Epilepsies as dynamical diseases of brain systems: Basic models of the transition between normal and epileptic activity. *Epilepsia*, 44:72–83.

- Medeiros, D. C. (2009). Estimulação elétrica codificada temporalmente interfere no recrutamento de redes neurais icogênicas em modelos animais. Master's thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Belo Horizonte.
- Medeiros, D. C., Guidine, P. A. M., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Oliveira, L. B., Mendes, E. M. A. M., and Moraes, M. F. D. (2010). Evoked potentials triggered by electrical stimulation signal seizure onset: A new approach to seizure prediction. In *XVIII Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia e Simpósio de Comemoração de 10 anos do Núcleo de Neurociências (NNC)*, volume 1, page 60, Belo Horizonte/MG.
- Medeiros, D. C., Oliveira, L. B., Mourão, F. A. G., Bastos, C. P., Pereira, G. S., Mendes, E. M. A. M., and Moraes, M. F. D. (2013). Temporal rearrangement of interictal spike discharges by low frequency electrical stimulation: Potential application in seizure prediction. Em submissão.
- Merkwith, C., Parlitz, U., Wedekind, I., Engster, D., and Lauterborn, W. (2009). OpenTSTOOL user manual. Drittes Physikalisches Institut, Universität Göttingen. <http://www.physik3.gwdg.de/tstool/>. Acesso em janeiro/2013.
- Moisy, F. (2008). Fractal dimension using the 'box-counting' method for 1D, 2D and 3D sets. Matlab Central File Exchange. <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/13063-boxcount>. Acesso em janeiro/2013.
- Moraes, M. F. D., Chavali, M., Mishra, P. K., Jobe, P. C., and Garcia-Cairasco, N. (2005a). A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures of GEPR-9s. *Brain Research*, 1033:1–12.
- Moraes, M. F. D., Mishra, P. K., Jobe, P. C., and Garcia-Cairasco, N. (2005b). An electrographic analysis of the synchronous discharge patterns of GEPR-9s generalized seizures. *Brain Research*, 1046:1–9.
- Mormann, F., Kreuz, T., Rieke, C., Andrzejak, R. G., Kraskov, A., David, P., Elger, C. E., and Lehnertz, K. (2005). On the predictability of epileptic seizures. *Clinical Neurophysiology*, 116:569–87.
- Moser, H. R., Weber, B., Wieser, H. G., and Meier, P. (1999). Electroencephalograms in epilepsy: analysis and seizure prediction within the framework of Lyapunov theory. *Physica D*, 130:291–305.
- Nair, S. P., Shiau, D., Principe, J. C., Iasemidis, L. D., Pardalos, P. M., Norman, W. M., Carney, P. R., Kelly, K. M., and Sackellares, J. C. (2009). An investigation of EEG dynamics in an animal model of temporal lobe epilepsy using the maximum Lyapunov exponent. *Experimental Neurology*, 216:115–21.
- Naït-Ali, A. (2009). *Advanced Biosignal Processing*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Nicoll, R. A. (2004). Introdução à farmacologia das drogas do SNC. In Katzung, B. G., editor, *Farmacologia Básica e Clínica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9 edition.

- Noether, G. E. (1983). *Introdução à estatística: uma abordagem não-paramétrica*. Rio de Janeiro, 2 edition.
- Novak, V., Reeves, A., Novak, P., Low, P., and Sharbrough, F. (1999). Time-frequency mapping of R-R interval during complex partial seizures of temporal lobe origin. *J Auton Nerv Syst*, 77:195–202.
- Oliveira, L. B., Medeiros, D. C., Mendes, E. M. A. M., and Moraes, M. F. D. (2011). Detecção da evolução de um padrão de onda para uma crise epiléptica. In *X Conferência Brasileira de Dinâmica, Controle e Aplicações*, Águas de Lindóia/SP.
- Parlitz, U. (1998). Nonlinear time-series analysis. In Suykens, J. A. K. and Vandewalle, J., editors, *Nonlinear Modeling – Advanced Black-Box Techniques*, pages 209–39. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Pereda, E., Quiroga, R. Q., and Bhattacharya, J. (2005). Nonlinear multivariate analysis of neurophysiological signals. *Progress in Neurobiology*, 77:1–37.
- Porter, R. J. and Meldrum, B. S. (2004). Drogas anticonvulsivantes. In Katzung, B. G., editor, *Farmacologia Básica e Clínica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9 edition.
- Quiroga, R. Q., Nadasdy, Z., and Ben-Shaul, Y. (2004). Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Computation*, 16:1661–87.
- Reichinnek, S., Künsting, T., Draguhn, A., and Both, M. (2010). Field potential signature of distinct multicellular activity patterns in the mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 30(46):15441–9.
- Rosenblum, M. and Pikovsky, A. (2004). Delayed feedback control of collective synchrony: An approach to suppression of pathological brain rhythms. *Physical Review E*, 70(041904).
- Sato, S., Sano, M., and Sawada, Y. (1987). Practical methods of measuring the generalized dimension and largest Lyapunov exponent in high dimensional chaotic systems. *Prog. Theor. Phys.*, 77:1–5.
- Schulze-Bonhage, A. and Kühn, A. (2008). Unpredictability of seizures and the burden of epilepsy. In Schelter, B., Timmer, J., and Schulze-Bonhage, A., editors, *Seizure Prediction in Epilepsy: From Basic Mechanisms to Clinical Applications*. Wiley-VCH.
- Shoham, S., Fellows, M. R., and Normann, R. A. (2003). Robust, automatic spike sorting using mixtures of multivariate t-distributions. *Journal of Neuroscience Methods*, 127:111–22.
- Small, M. (2005). *Applied nonlinear time series analysis: applications in Physics, Physiology and Finance*, volume 52 of *World Scientific Series on Nonlinear Science A*. World Scientific Publishing Co.

- Stratton, P. and Wiles, J. H. (2008). Comparing kurtosis score to traditional statistical metrics for characterizing the structure in neural ensemble activity. In Marinaro, M., Scarpetta, S., and Yamaguchi, Y., editors, *Dynamic Brain – from Neural Spikes to Behaviors*, volume 12, pages 115–22, Berlin/Heidelberg. Springer.
- Suffczynski, P., Kalitzin, S., Lopes da Silva, F., Parra, J., Velis, D., and Wendling, F. (2008). Active paradigms of seizure anticipation: Computer model evidence for necessity of stimulation. *Physical Review E*, 78(051917).
- Tass, P. A. (2003). A model of desynchronizing deep brain stimulation with a demand-controlled coordinated reset of neural subpopulations. *Biological Cybernetics*, 89:81–8.
- Valentín, A., Alarcón, G., Honavar, M., Seoane, J. G., Selway, R. P., Polkey, C. E., and Binnie, C. D. (2005). Single pulse electrical stimulation for identification of structural abnormalities and prediction of seizure outcome after epilepsy surgery: a prospective study. *The Lancet: Neurology*, 4:718–26.
- Valentín, A., Anderson, M., Alarcón, G., Seoane, J. J. G., Selway, R., Binnie, C. D., and Polkey, C. E. (2002). Responses to single pulse electrical stimulation identify epileptogenesis in the human brain in vivo. *Brain*, 125:1709–18.
- Van Quyen, M., Martinerie, J., Navarro, V., Baulac, M., and Varela, F. (2001). Characterizing neurodynamic changes before seizures. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 18(3):191–208.
- Velisek, L., Kubova, H., Pohl, M., Stankova, L., Mares, P., and Schickerova, R. (1992). Pentylentetrazole-induced seizures in rats: an ontogenic study. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 346:588–91.
- Weisstein, E. W. (2004). Kurtosis. From MathWorld—A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/Kurtosis.html>.
- Winterhalder, M., Maiwald, T., Voss, H. U., Aschenbrenner-Scheibe, R., Timmer, J., and Sculze-Bonhage, A. (2003). The seizure prediction characteristic: a general framework to assess and compare seizure prediction methods. *Epilepsy & Behavior*, 4:318–25.
- World Health Organization (2012). Epilepsy: Fact sheet n.º 999. october 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>. Acesso em dez/2012.
- World Health Organization, International Bureau for Epilepsy, and International League Against Epilepsy (2005). *Atlas: epilepsy care in the world*. WHO press, Geneva, Suíça.
- Yang, C., Yuan, Y., and Si, J. (2010). High performance spike detection and sorting using neural waveform phase information and SOM clustering. *International Joint Conference on Neural Networks*.

- Yuan, Y., Li, Y., and Mandic, D. P. (2008). Comparison analysis of embedding dimension between normal and epileptic EEG time series. *Journal of Physiological Sciences*, 58(4):239–47.
- Yuan, Y., Yang, C., and Si, J. (2009). An advanced spike detection and sorting system. *Proceedings of International Joint Conference on Neural Networks*, pages 14–19.





---

# Rotinas em Matlab

---

## A.1 Pré-processamento

```
function preproc(num)
% Faz o pré-processamento do arquivo bruto de registro do animal 'num'

% Abre o arquivo e carrega os dados
fid=fopen(sprintf('raw/Animal %02u.raw', num));
Canais=fread(fid, [3,inf], 'int16');
fclose(fid);

% Corrige o ganho do circuito de conversão. A/D de 16 bits com sinal,
% alimentado com 5V e ganho 1000 na captação - resposta em mV
Canais=Canais*5/(2^16-1);

% primeira parte: seleção manual da janela de tempo
figure(1)
plot((1:size(Canais,2))/1000, [Canais(1,:) ' Canais(2,:) '-2 Canais(3,:) '-3])
title('selecione o tempo inicial')
comeco=ginput(1)*1000;
title('selecione o tempo final')
fim=ginput(1)*1000;
comeco=round(comeco(1)); fim=round(fim(1));

% estimação dos momentos de estimulação
dt=(Canais(2,:)-[0 Canais(2,1:end-1)]);
lim=3*std(dt(comeco+(1e5:3e5)));
ii=comeco+find(dt(comeco:fim)>lim);
if isempty(ii) % grupo PTZ
    ii=comeco+1000:2000:fim-1000;
else
    % insere os que estão faltando (e remove ruídos)
    cont=1;
    while cont<length(ii)
        if (ii(cont+1)-ii(cont))<1000
            ii=[ii(1:cont-1) ii(cont+1:end)];
        elseif (ii(cont+1)-ii(cont))>3000
            ii=[ii(1:cont) fix((ii(cont+1)+ii(cont))/2) ii(cont+1:end)];
            cont=cont+2;
        else
            cont=cont+1;
        end
    end
end
```

```

        end
    end
end
t=ii/1000;
plot(diff(t))

% montagem da matriz de acordo com a divisão em janelas
j=inputdlg('Janela de tempo apos o sinal (s): ','',1,{ '1.5' });
j=1000*min(str2double(j),2);
janela=j+1-2000:j;
tj=janela/1000;
C1=zeros(length(ii),2000);
C3=zeros(length(ii),2000);
for i=1:length(ii)
    C1(i,:)=Canais(1,ii(i)+janela);
    C3(i,:)=Canais(3,ii(i)+janela);
end

can1=C1;  can3=C3;

% i=input(' Salvar (S/n)? ','s');
% if( strcmp(i,'n') || isempty(i))
%     eval(sprintf('save prep/a

```

## A.2 Análises Temporais

```

% análises a serem feitas
nomes={'variancia' 'assimetria' 'curtose'...
        'dim. boxcount' 'exp. Lyapunov'...
        'correlacao temporal' 'ganho de energia' };

% janela de tempo para divisão (ms)
jan=2000;
tt=-800:jan/1000:40-1e-6;

animal=nan(numel(tt),numel(nomes),31);

load t0
warning('off','MATLAB:chckxy:IgnoreNaN')

for an=[1 3 7:31]
    % preparo do sinal
    eval(sprintf('load prep/a%02d',an));
    can1=can1'; can1(490:510,:)=nan;
    ii=find(t-d(1,an)>-800,1)+(0:numel(tt)-1);
    if max(ii)>size(can1,2),
        fprintf('(crescendo o sinal)')
        can1=[can1 nan(2000,max(ii)-size(can1,2))];
    end
    can1=can1(:,ii);
    c1=can1(:);
    s=spline(1:10:numel(c1),c1(1:10:end),1:numel(c1))';

```

```

c1(isnan(c1))=1e-6;

can1=reshape(c1, jan, [])';
nj=size(can1,1);

% análises estatísticas
sd=std(can1,0,2).^2;
sk=skewness(can1,0,2);
ku=kurtosis(can1,0,2)-3;

% detecção de potencial evocado (ganho de energia)
antes=can1(:,250:450); depois=can1(:,550:750);
razao=log(std(depois,0,2)./std(antes,0,2))/log(2);

% correlação com a janela anterior
cc=zeros(nj,1);
for i=2:nj
    cc(i)=corr(can1(i,:),can1(i-1,:));
end

% dimensão boxcount
c1(c1==1e-6)=nan;
s=reshape(s, jan, [])';
bc=nan(nj,1);
for i=1:nj
    [nn,rr]=boxcount(diff(s(i,:))>0);
    ba=-gradient(log(nn))./gradient(log(rr));
    bc(i)=mean(ba(1));
end

% máximo expoente de Lyapunov
Lyap=zeros(nj,1);
for i=1:nj
    e=embed(signal(can1(i,:)),7,8);
    [text l]=evalc('data(largelyap(e,1000,150,40,2))');
    Lyap(i)=mean(diff(suave(l(20:120))));
end

% reúne a matriz final
tudo=[sd sk ku bc Lyap cc razao];
animal(:, :, an)=suave(tudo);
fprintf(' OK\n')
end
% fim

(...)

grupo=('+0+000-----+-----++PPPPPEEEEEEE')';
ordem=[1 3 12 17 18 19 2 7:11 13:16 4 5 20:25 6 26:31];
animal=animal(:, :, ordem);
grupo=grupo(ordem);

for i=1:7

```

```

% sub-gráfico da análise
(...)

% estatísticas
for j=1:size(animat,1)
    [H stats]=kwstat(squeeze(animat(j,i,:)),grupo);
    c=multcomp(stats);
    p(i,j)=1-max(c(:,1));
end

% médias por grupo
g1=suave(nanmean(squeeze(animat(:,i,26:31)),2),4);
g2=suave(nanmean(squeeze(animat(:,i,20:25)),2),4);
g3=suave(nanmean(squeeze(animat(:,i,[7:11 13:16])),2),4);
g4=suave(nanmean(squeeze(animat(:,i,[1 3 12 17 18 19])),2),4);
% traçado dos gráficos de média (gn) e análise estatística (p)
(...)

```

### Cálculo dos parâmetros para o expoente de Lyapunov (TSTOOL)

```

% tau
T=cell(31,1);
for an=[1 3 7:31]
    fprintf('animat %2d\n',an)
    eval(sprintf('load prep/a%02d',an))
    tau=zeros(size(can1,1),1);
    for i=1:size(can1,1)
        [s,a]=evalc('data(amutual(...
            signal(can1(i,:)'),29));');
        for j=2:29
            if a(j+1)>a(j), break, end
        end
        tau(i)=j;
    end
    T{an}=tau;
end

% histogramas
mm=cell2mat(M(an));
tt=cell2mat(T(an));
(...)

% m
tau=8;
tol=.03;
M=cell(31,1);
for an=[1 3 7:31]
    fprintf('%d\n',an)
    eval(sprintf('load prep/a%02d',an))
    can1(isnan(can1))=1e-6;
    m=zeros(size(can1,1),1);
    parfor i=1:size(can1,1)
        c=data(cao(signal(can1(i,:)'),...
            12,8,3,1000));
        dc=[diff(c); 0];
        m(i)=find((dc<tol),1)+1;
    end
    M{an}=m;
end

```

### Teste estatístico

```

function [H param]=kwstat(x,group)
(...)
% separate by group
[g s]=sort(group);
group=group(s);
x=x(s);

% sort ranks from data
[dump xx]=sort(x);
[dump rank]=sort(xx);

% calculate sum of ranks and n for
each group
curr=group(1);

```

```

group(1)=1;
index=1;
for i=2:length(group)
    if group(i)≠curr
        index=index+1;
        curr=group(i);
    end
    group(i)=index;
end
ngroup=index;

S=zeros(ngroup,1);
n=zeros(ngroup,1);
for i=1:ngroup
    gi=group==i;
    S(i)=sum(rank(gi));
    n(i)=sum(gi);
end
N=length(x);

% Kruskal-Wallis statistic
H=12/(N*(N+1))*sum(S.^2./n)-3*(N+1);
param=[S n];

function c=multcomp(param)
% c: probabilities of data being
% from the same distribution
% (ngroup x ngroup matrix)

S=param(:,1);
n=param(:,2);
r=S./n;
N=sum(n);
ngroups=numel(n);

d=zeros(ngroups);
for i=1:ngroups
    for j=i+1:ngroups
        d(i,j)=(r(i)-r(j))/...
            sqrt(N*(N+1)/12*(1/n(i)+1/n(j)));
    end
end
d=d+d'+diag(nan(ngroups,1));
c=2*(1-normcdf(abs(d)));

```

## A.3 Detecção Automática

```

an=3;
% preparação dos dados
eval(sprintf('load prep/a%02d',an))
can1(:,490:510)=nan;
can1=can1'; c1=can1(:);
c1(isnan(c1))=1e-6;
load t0, t_estim=t(1)-.499-d(1,an);
t=(1:numel(can1))/1000+t(1)-.5)-d(1,an);
s=suave(c1,7);

% detecção de picos (desvio padrão dos primeiros 200s)
d=[0; s(2:end)-s(1:end-1)];
base=std(d(1:2e5));
f=find(abs(d-mean(d))>3*base);

% densidade de detecção
w=250; dens=hamming(w);
c=zeros(numel(c1)+w,1);
for i=1:numel(f)
    c(f(i)+(1:w))=c(f(i)+(1:w))+dens;
end
c=c((1:numel(c1))+w/2)/w;

% momento dos picos (máximos locais)
tol=.09;

```

```

janela=w/2;
m=reshape(c, janela, numel(c)/janela);
[M I]=max(m);
p=nan(numel(M),1);
for i=2:numel(M)-1
    if M(i)>tol && M(i)>M(i-1) && M(i)>M(i+1), p(i)=(i-1)*janela+I(i); end
end
p=p(~isnan(p));

% alinhamento dos picos (extração do sinal)
dir=-1;
tp=p;
C1=[nan(w,1); s; nan(w,1)];
for i=1:numel(p)
    [I I]=max(dir*C1(w+p(i)+(-w:w)));
    tp(i)=p(i)+I-w;
end
clear C1

% eliminando repetidos
for i=1:numel(tp)-1, if tp(i+1)==tp(i), tp(i)=nan; end, end
tp=tp(~isnan(tp));
np=numel(tp);

% construindo a matriz de picos
P=nan(256,np);
for i=1:np
    P(:,i)=c1(tp(i)+(-127:128));
end
t0=find(t(tp)>0,1)-1;

% Decomposição por modelo AR
ordem=10;
r=nan(np,ordem);
M=nan(size(P,1)-ordem,ordem);

for i=1:t0;
    for j=1:ordem
        M(:,j)=P(j:end-ordem+j-1,i)';
    end
    r(i,:)=(pinv(M)*P(ordem+1:end,i))';
end

% ordena coeficientes por teste de não-normalidade
jb=skewness(r).^2/6+(kurtosis(r)-3).^2/24;
[rr,ii]=sort(jb,'descend');

fim=find(t(tp)<0,1,'last');
figure(1),clf,subplot(231)
plott(r(1:fim,ii(1:3)),t(tp(1:fim)))
title(sprintf('Animal %d: dec AR',an)),grid on
xlabel(ii(1)),ylabel(ii(2)),zlabel(ii(3))

d=r(1:fim,ii(1:10));

```

```

% Decomposição por waveletes
w0=wavedec(P(:,1),5,'db4');
W=nan(numel(w0),size(P,2));
W(:,1)=w0;
for i=2:size(P,2), W(:,i)=wavedec(P(:,i),5,'db4'); end, W=W';

ws=repmat(std(W),size(W,1),1); Wn=W; Wn(abs(W)>3*ws)=nan;
jb=skewness(Wn).^2/6+(kurtosis(Wn)-3).^2/24;
[rr,ii]=sort(jb,'descend');

fim=find(t(tp)<0,1,'last');
figure(1),clf,subplot(231)
plott(W(1:fim,ii(1:3)),t(tp(1:fim)))
title(sprintf('Animal %d: dec. wavelets',an)),grid on
xlabel(ii(1)),ylabel(ii(2)),zlabel(ii(3))

d=abs(W(1:fim,ii(1:10)));

% Decomposição por PCA
[p,c,a]=princomp(zscore(P'));

fim=find(t(tp)<0,1,'last');
figure(1),clf,subplot(231)
plott(c(1:fim,1:3),t(tp(1:fim)))
title(sprintf('Animal %d: dec. PCA',an)),grid on
xlabel('comp. 1'),ylabel('comp. 2'),zlabel('comp. 3')

d=c(1:fim,1:10);

% k-médias (nc centros)
nc=3;
st='krgcmby';
classe=kmeans(d,nc,'replicates',8);
(...)

% Gráficos
[co,io]=sort(classe);
lim=zeros(1,nc); for i=1:nc, lim(i)=find(co==i,1,'last'); end
figure(1)
subplot(232),imagesc(P(:,io)'),
title(sprintf('ondas: animal %d',an))
subplot(235)
for i=1:nc, plot(mean(P(:,classe==i),2),st(i)), end
xlabel('amostras'),ylabel('medias por grupo (mV)')
subplot(233),cla,hold on
for i=1:numel(classe),
plot(t(tp(i)),mod(t(tp(i))-t_estim,2)-.5,[st(classe(i)) '.'])
end
title('distribuicao temporal'),ylabel('atraso para estimulo (s)')
subplot(236),cla,hold on
for i=1:nc, [h,x]=hist(t(tp(classe==i)),10); plot(x,h,st(i)), end
ylabel('ocorrencias'),xlabel('tempo para crise (s)')

```

## A.4 Detecção Forçada

```

an=12;
eval(sprintf('load prep/a%02d',an));
N=numel(can1);

can1=can1'; can1(490:510,:)=nan; c1=can1(:);
load t0, t0=t(1)-.5-d(1,an);
t=(1:N)/1000+t0;

c1(isnan(c1))=1e-6;
clear x* t0 res w | can* t j d

% escolhe a onda inicial
mm=mmLocal(c1,200);
figure(1)
    plot(t,c1,t(mm),c1(mm),'r.')
    title('escolha uma forma de onda inicial')
% padrão inicial
p=ginput(2); if p(1)>p(2), p=[p(2) p(1)]; end
p(1)=find(t>p(1),1)-1;
p(2)=find(t>p(2),1);

% inicialização
ex=c1(p(1):p(2));           % onda exemplo (modelo)
lx=numel(ex);

tipo_norm='c';             % c: correlação, ?: normaliza(?)
tipo_esc='t';              % s: estatístico, f: no. fixo, t: tolerância
tol=.07;

% escalas=[1.07 1.14 1]; escala=1 em último
escalas=1;
j_modelo=20;               % janela de atualização do modelo (s)
ndist=3;                   % no. mínimo de ondas em cada janela

ti0=ceil(t(p(1))/j_modelo)*j_modelo; % janela inicial
n_rep=abs(ti0/j_modelo);
ii0=find(t>ti0,1)+(0:j_modelo*1000-1);

onda=zeros(lx,n_rep+1);
onda(:,1)=ex;
ti=[t(p(1)) ti0+j_modelo/2:j_modelo:0]; % tempo centrado em cada janela

% laço de execuções (até t=0)
ii=ii0;
ee=1:n_rep;                % escala escolhida em cada janela de tempo
ips=cell(1,n_rep);        % índices das ondas reconhecidas
D=cell(1,n_rep);          % distâncias das ondas em cada iteração

for vez=1:n_rep
    dist=nan*ii(:);
    d_ac=inf;               % distância média para esta escala
    for escala=escalas;

```



```

es=escala_t(ex,escala); lx=numel(es);
% normaliza e calcula distância entre as ondas
if tipo_norm=='c'
    en=es-mean(es); enc=en'*en;
    for i=1:numel(dist)-lx-1
        on=c1(ii(i)-1+(1:lx)); on=on-mean(on);
        dist(i)=1-en'*on/sqrt(enc*on'*on);
    end
else
    en=normaliza(es,tipo_norm);
    for i=1:numel(dist)-lx-1
        on=normaliza(c1(ii(i)-1+(1:lx)),tipo_norm);
        dist(i)=distancia(en,on);
    end
end
dist(isnan(dist))=max(dist);
% ordena as ondas por distância (encontrando os picos locais)
mf=mmLocal(dist-max(dist),floor(lx/2));
[cs,ip_]=sort(dist(mf));
D{vez}=cs;
% escolhe as ondas
nf=min(numel(mf),ndist);
if tipo_esc=='s'
    % estatística
    for i=nf:min(20,numel(mf)-1)
        if cs(i+1)-cs(i) > (cs(i)-cs(i-2)), break, end
    end, nf=i;
elseif tipo_esc=='t'
    % tolerância
    nf=find(cs > tol,1)-1;
    if isempty(nf),nf=0; end
    nf=max(ndist,nf);
end
ip_=mf(ip_(1:nf));
% guarda a escala de menor distância média
da=mean(dist(ip_));
if da<d_ac
    d_ac=da;
    ee(vez)=escala;
    ip=ip_;
end
end % escalas

ips{vez}=ii(1)+ip';
% atualiza o formato de onda como a média das ondas escolhidas
X=nan(lx,numel(ip));
for i=1:numel(ip)
    X(:,i)=c1(ii(ip(i))-1+(1:lx));
end
ex=nanmean(X,2);
ii=ii+j_modelo*1000;
onda(:,vez+1)=ex;
end % vez=n_rep

```

```
ni=zeros(1,numel(ips)); for i=1:numel(ips), ni(i)=numel(ips{i}); end

% estatística nas distâncias
% Indica a frequência com que a onda escolhida é encontrada, servindo para
% avaliar a qualidade da escolha
(...)

% evolução da onda
% Mostra a adaptação do padrão de onda ao longo do tempo e a correlação
% entre os padrões de onda já escolhidos e salvos
(...)

% sincronia com o estímulo
% Mostra o defasamento de cada onda com o estímulo, assim como o das ondas
% já salvas, para comparação
(...)

% salva a onda atual (e parâmetros de escolha)
load P
np=size(P(an).ex,1);
P(an).ex(np+1,:)=[p(1) p(2)];
P(an).janela(np+1)=j_modelo;
P(an).norm(np+1)=tipo_norm;
P(an).escolha(np+1)=tipo_esc;
P(an).tol(np+1)=tol;
P(an).picos{np+1}=picos;
P(an).onda{np+1}=onda_n;
P(an).t=t;
save P P
```

# Resultados Completos por Animal

Neste apêndice constam, para fins de comparação, as análises exploradas ao longo do trabalho aplicadas a cada animal. A apresentação é dada por uma série de gráficos, englobando o sinal bruto, as análises temporais, a detecção manual de potenciais de ação e a detecção forçada, conforme esquema da Figura B.1.

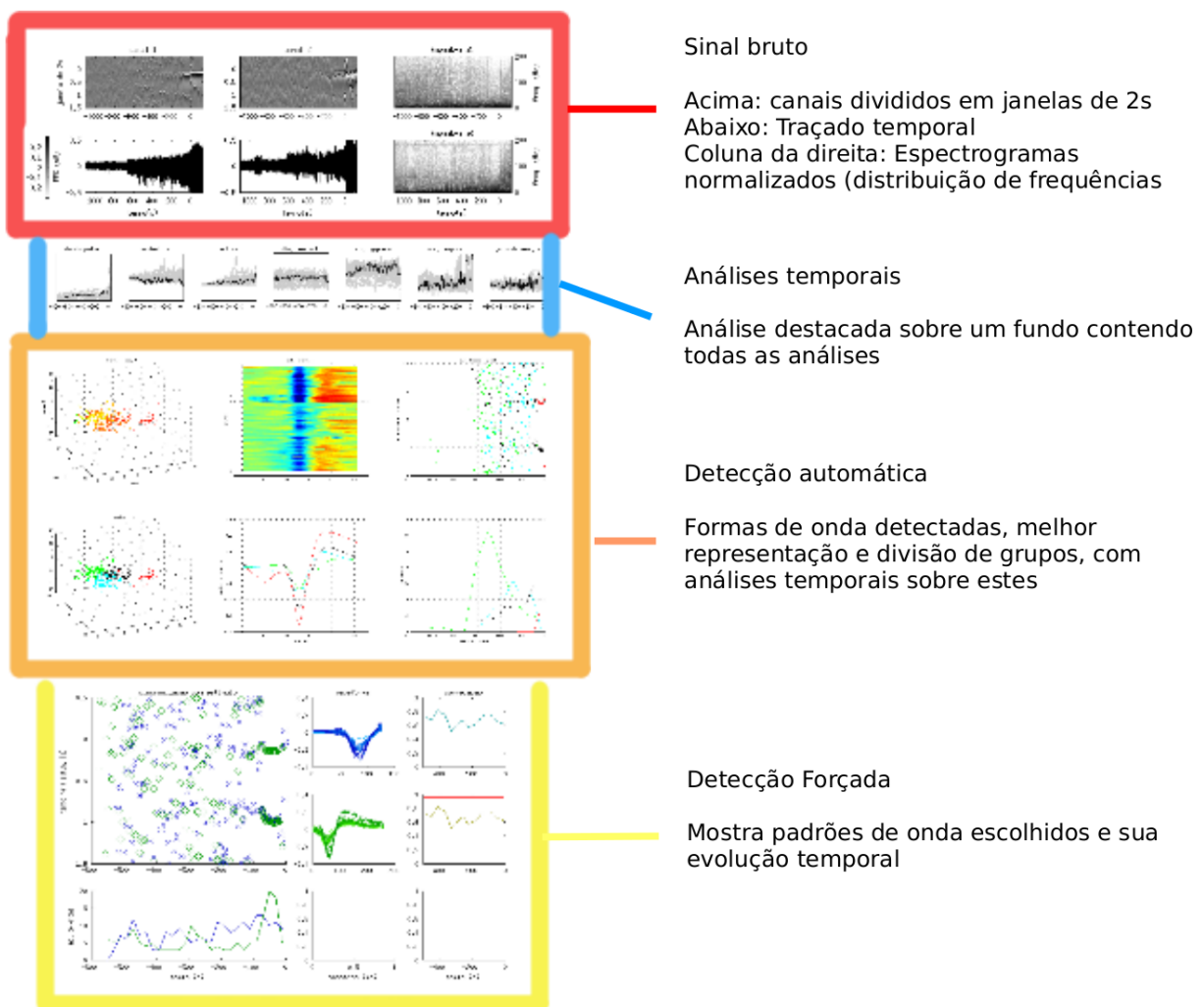


Figura B.1: Estrutura de apresentação dos resultados completos

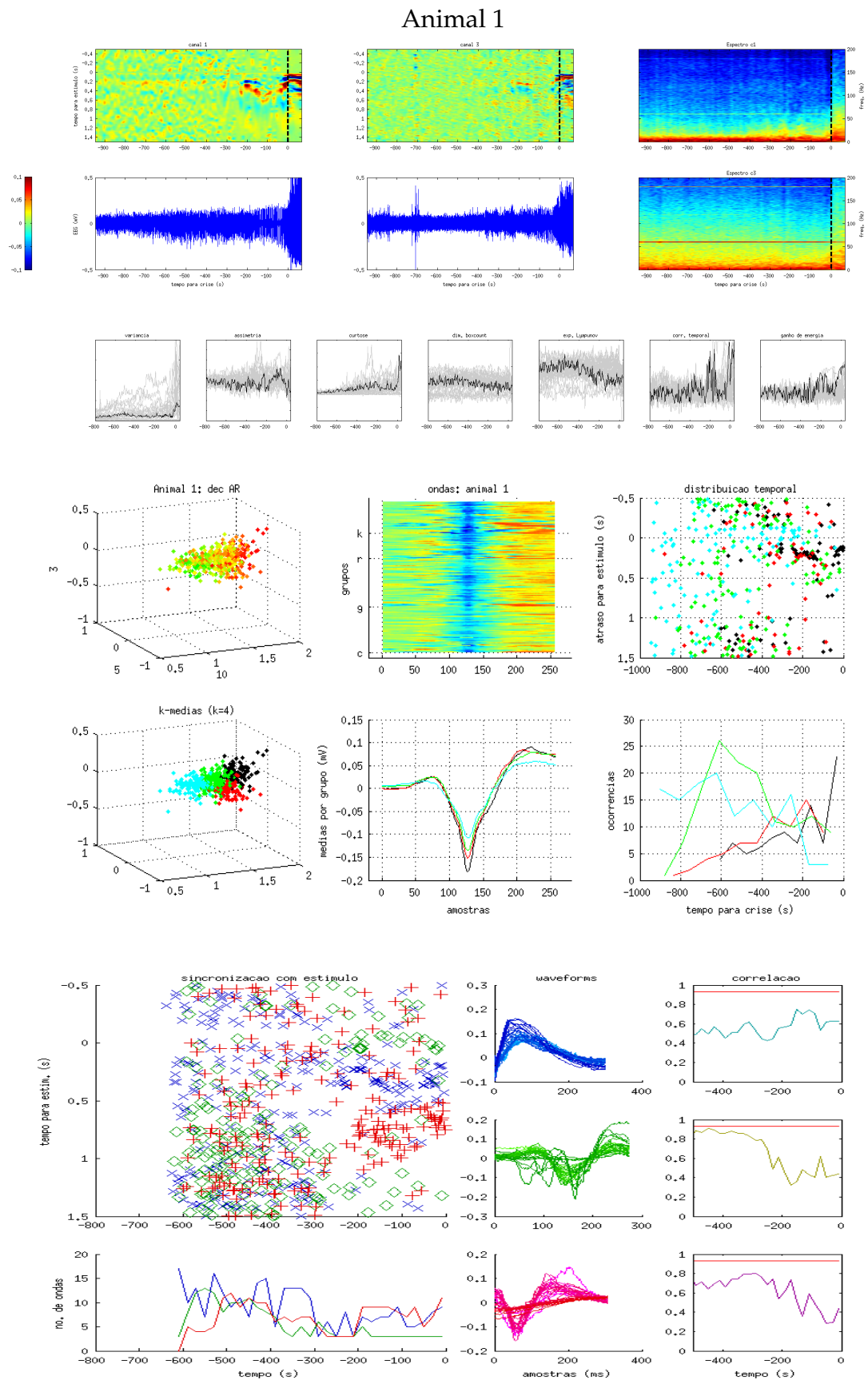


Figura B.2: Análises para o animal 1 – PTZ+EE(+)

## Animal 3

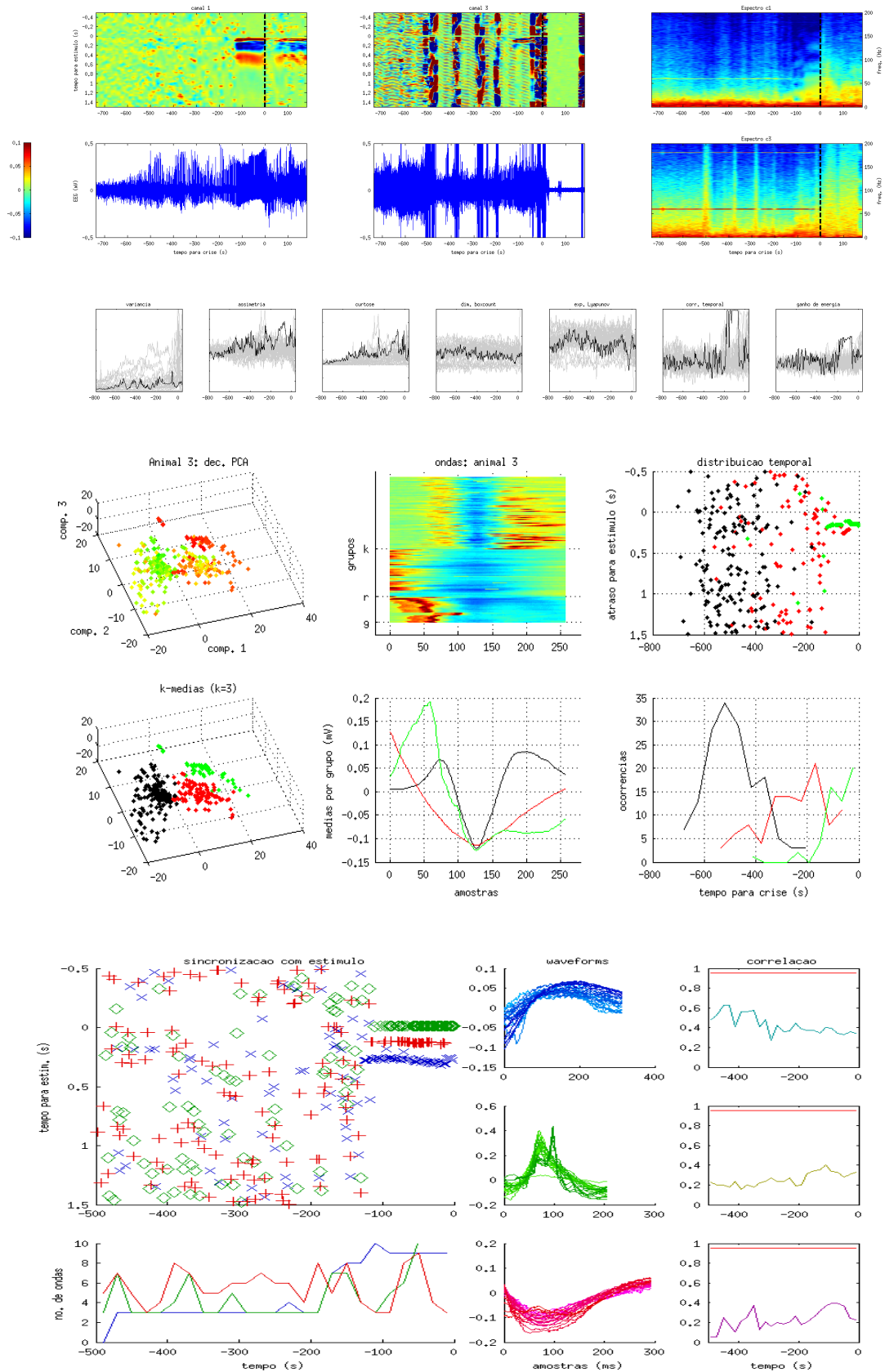


Figura B.3: Análises para o animal 3 – PTZ+EE(+)

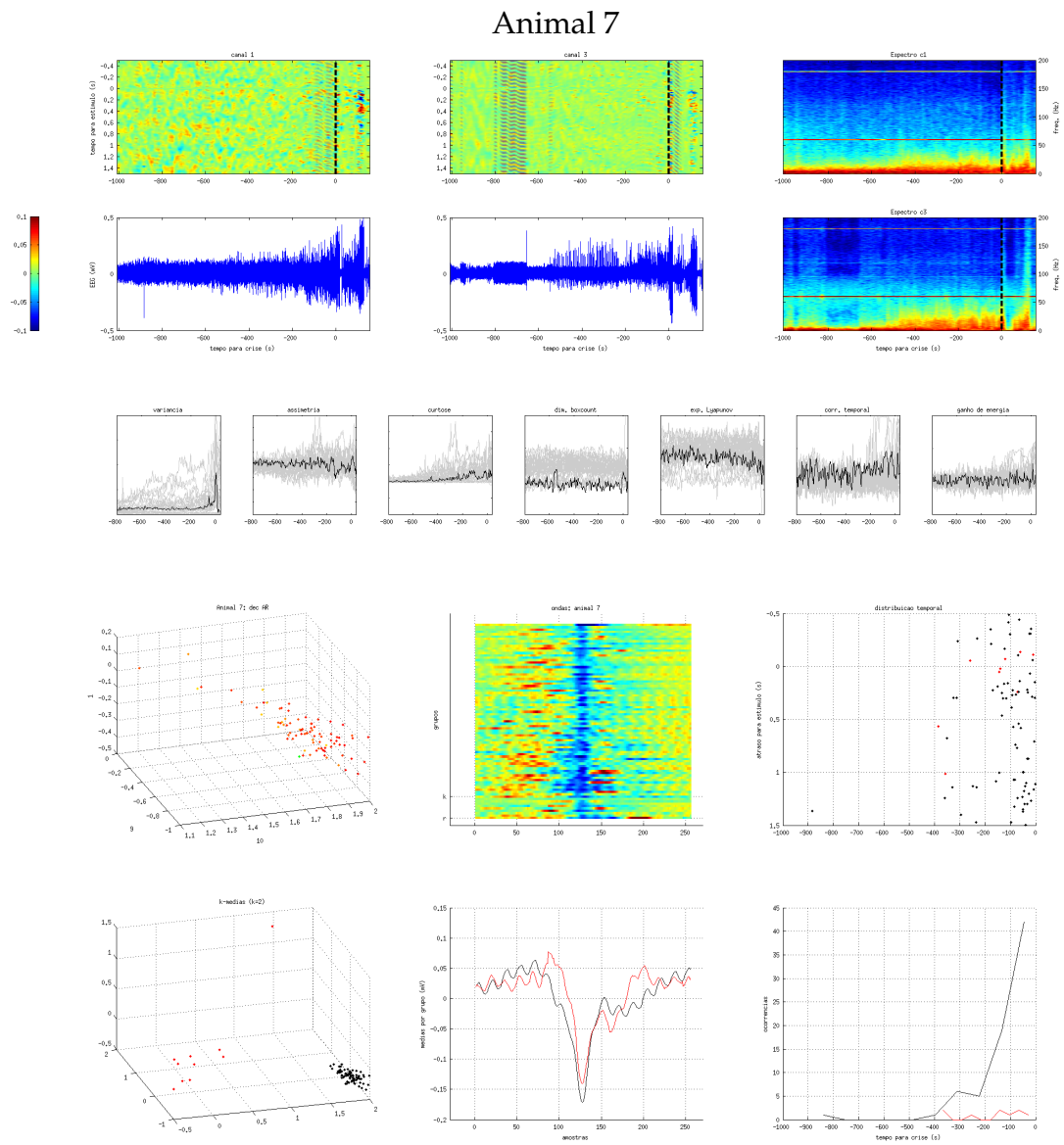


Figura B.4: Análises para o animal 7 – PTZ+EE(-)

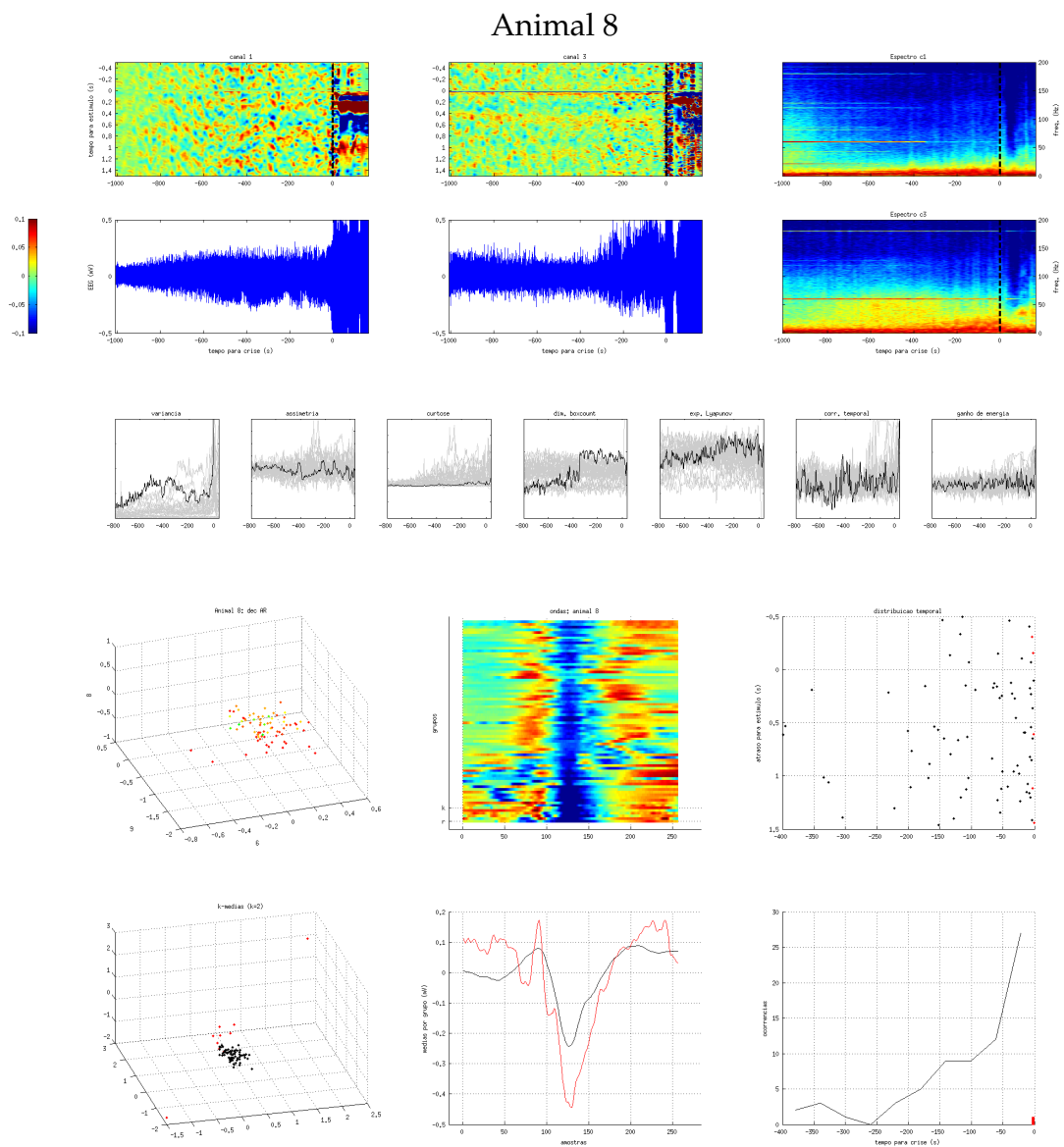


Figura B.5: Análises para o animal 8 – PTZ+EE(-)



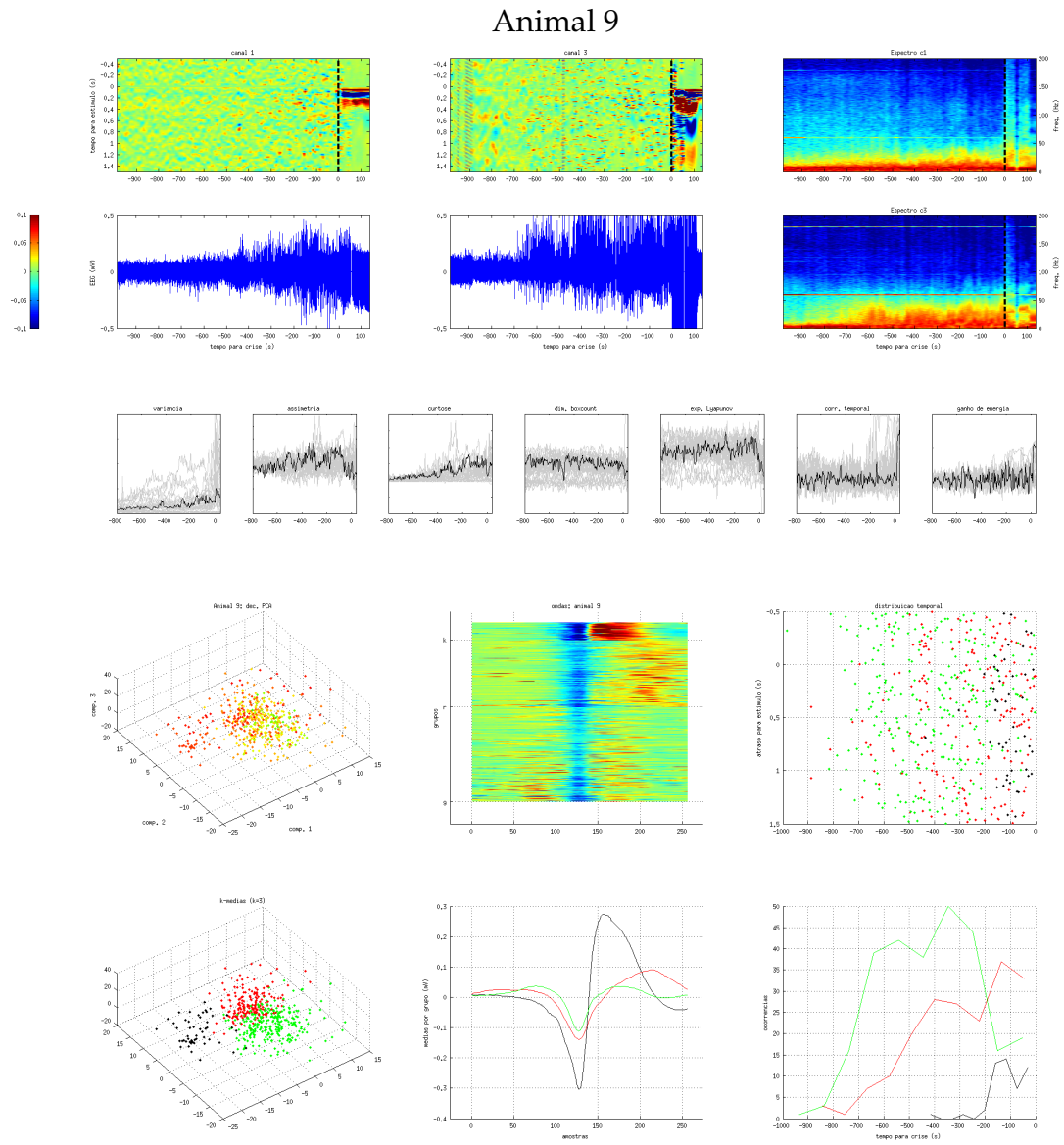


Figura B.6: Análises para o animal 9 – PTZ+EE(-)



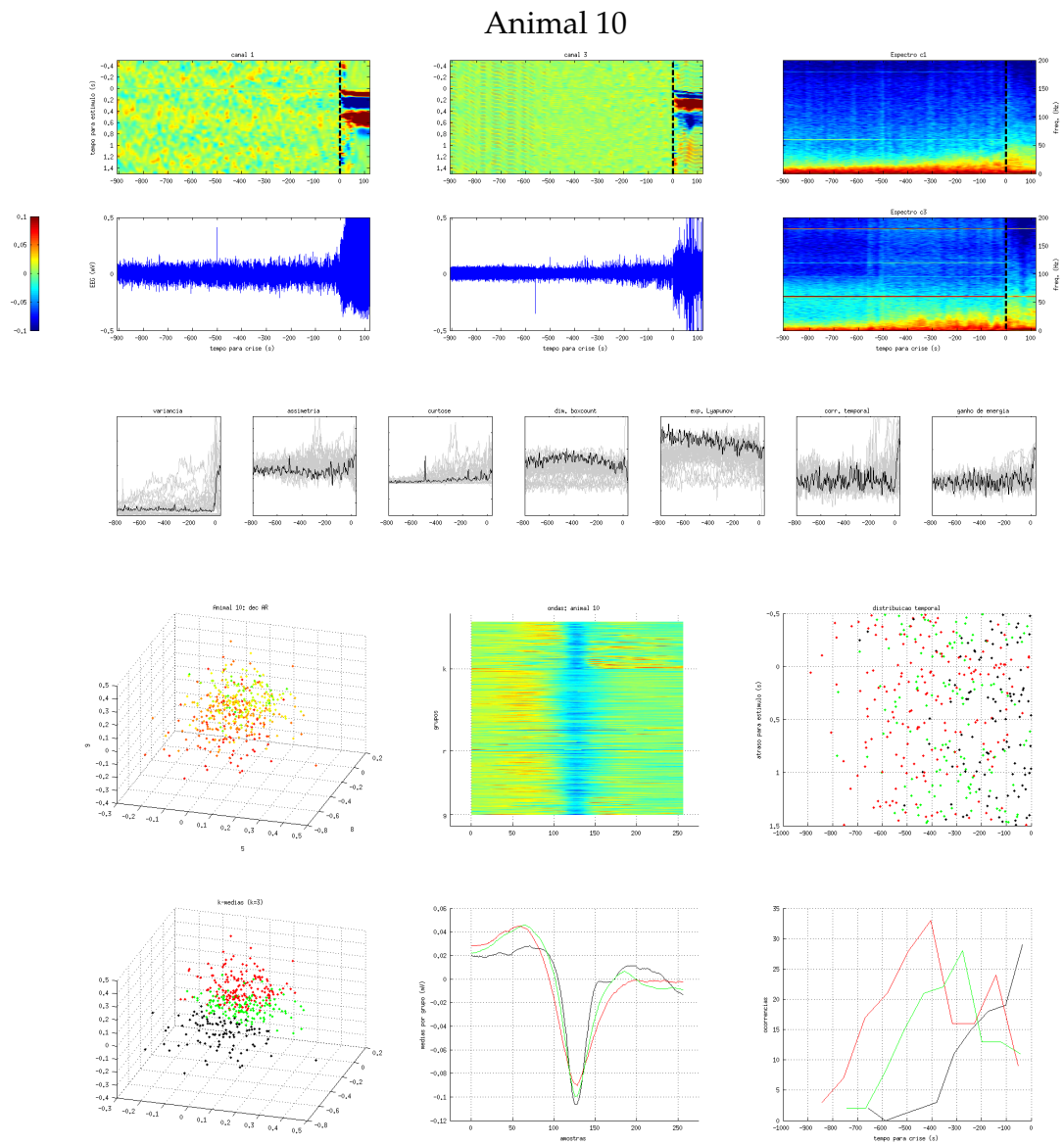


Figura B.7: Análises para o animal 10 – PTZ+EE(-)

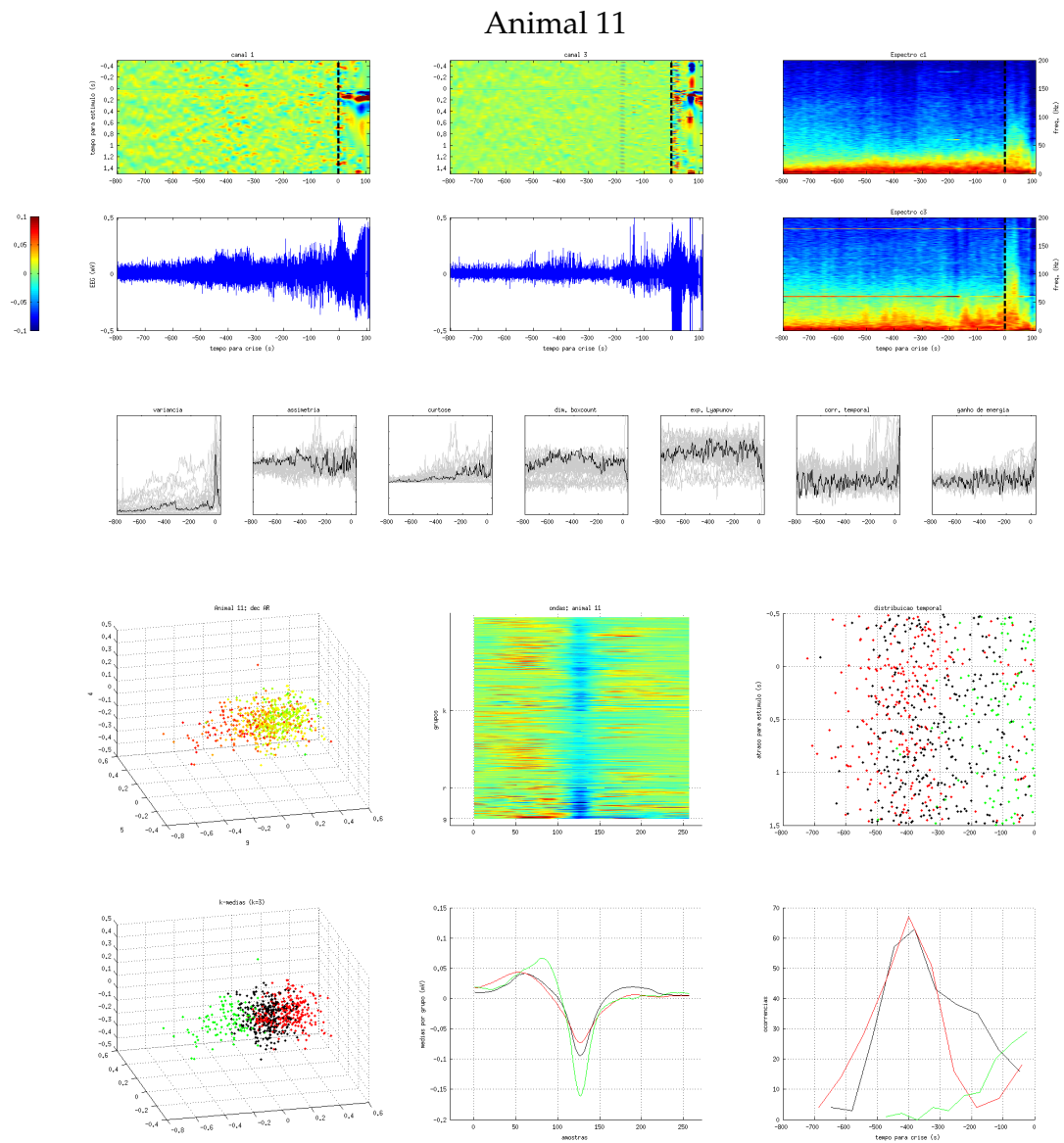


Figura B.8: Análises para o animal 11 – PTZ+EE(-)

## Animal 12

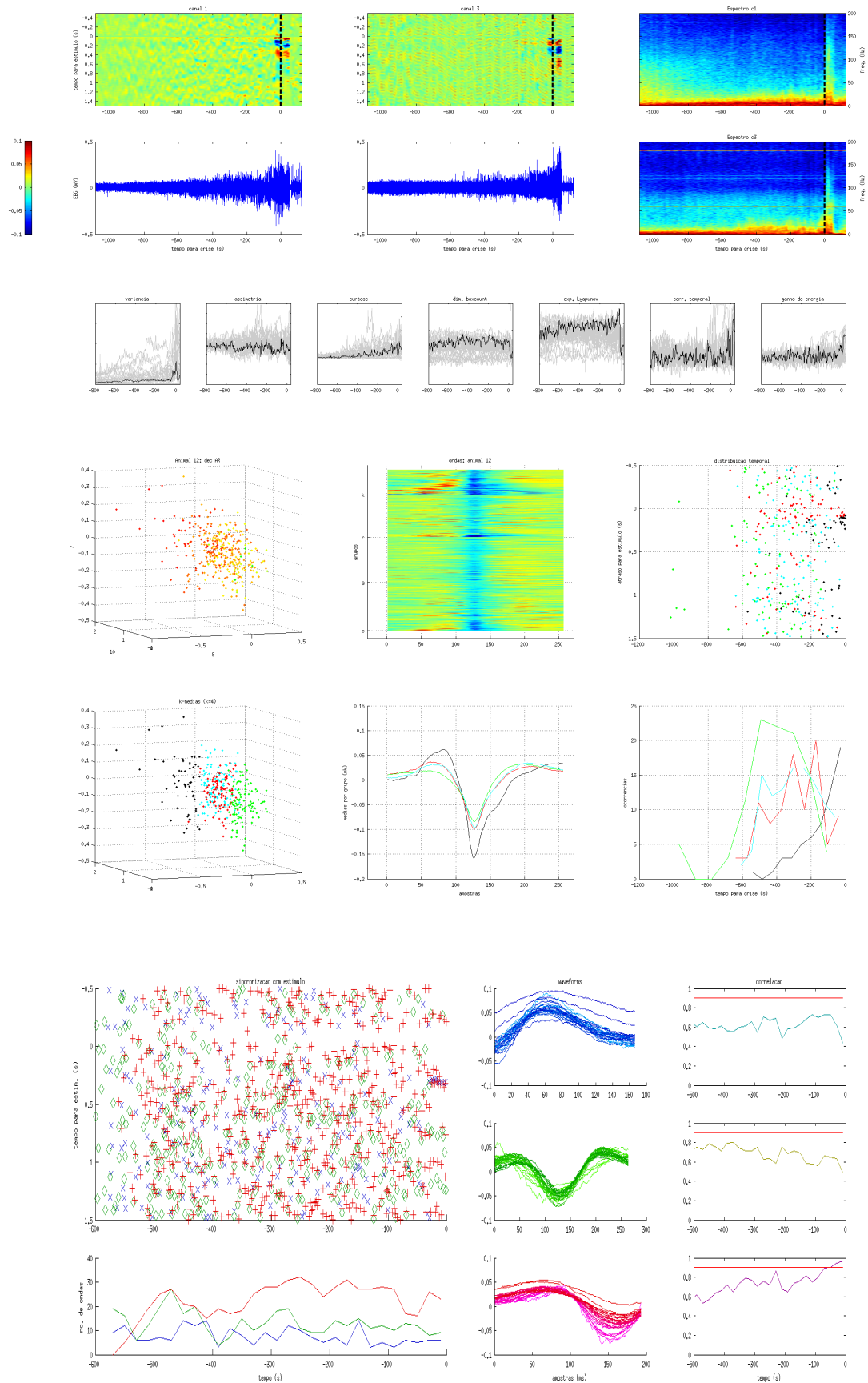


Figura B.9: Análises para o animal 12 – PTZ+EE(+)

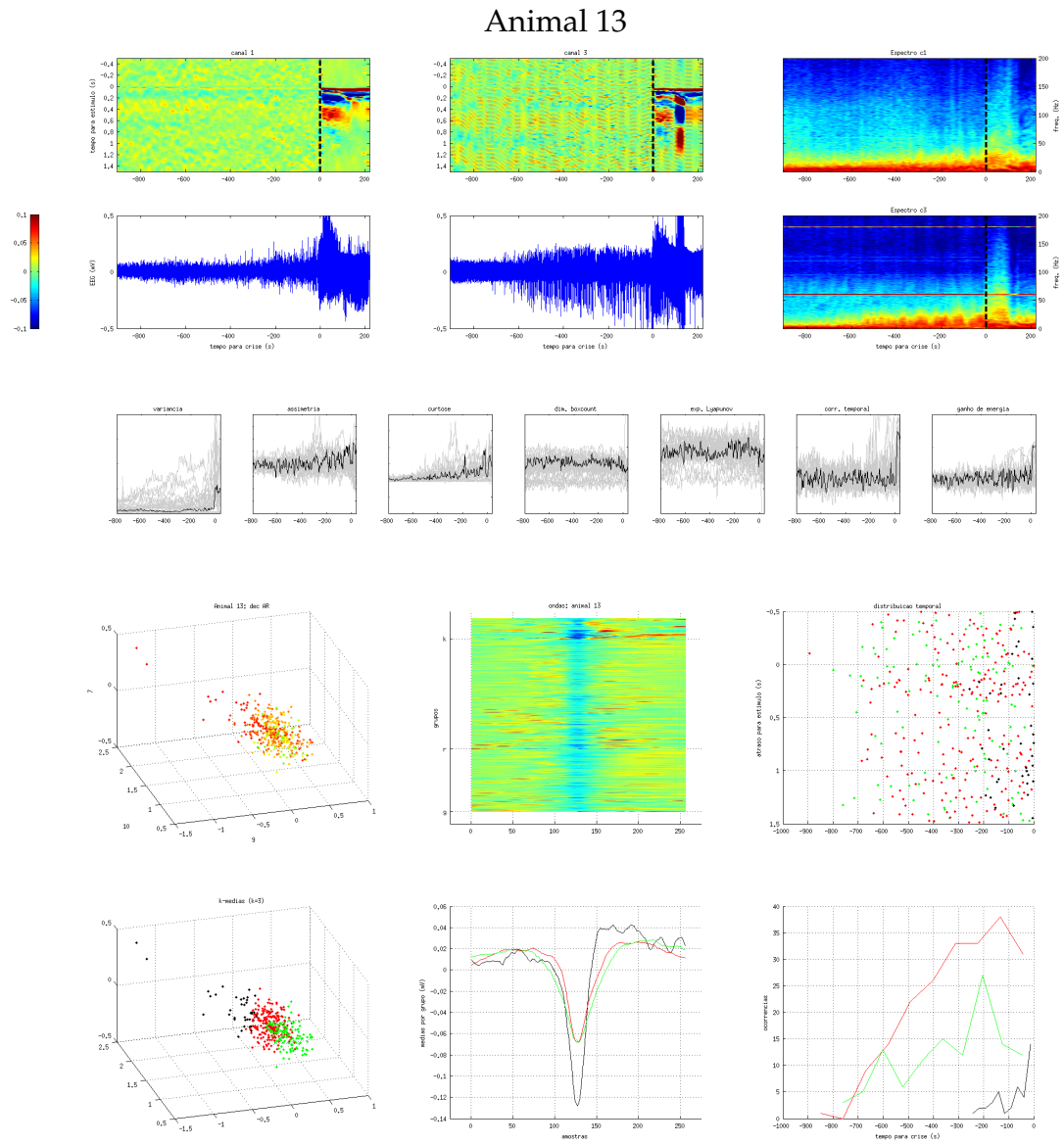


Figura B.10: Análises para o animal 13 – PTZ+EE(-)

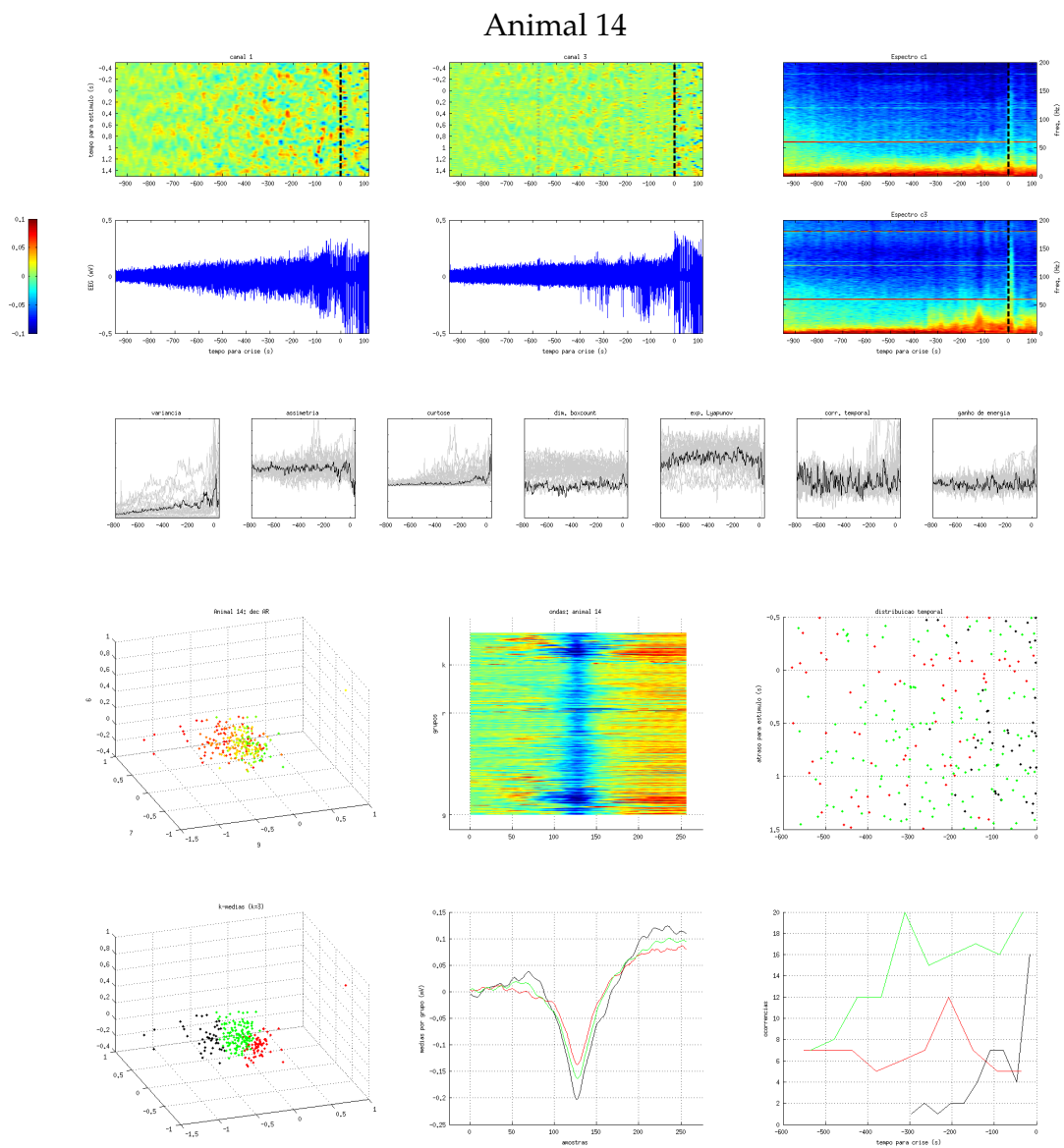


Figura B.11: Análises para o animal 14 – PTZ+EE(-)

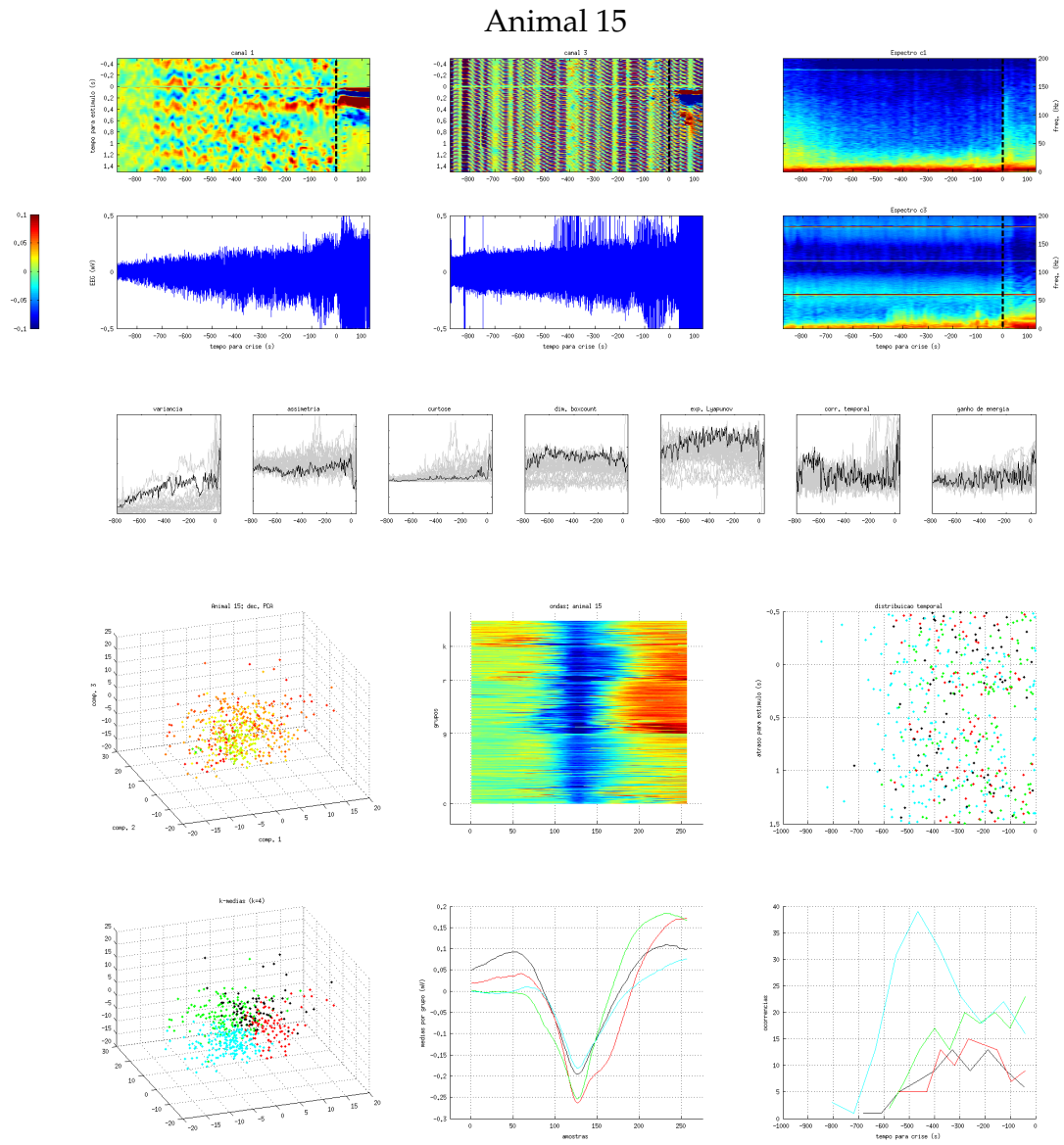


Figura B.12: Análises para o animal 15 – PTZ+EE(-)

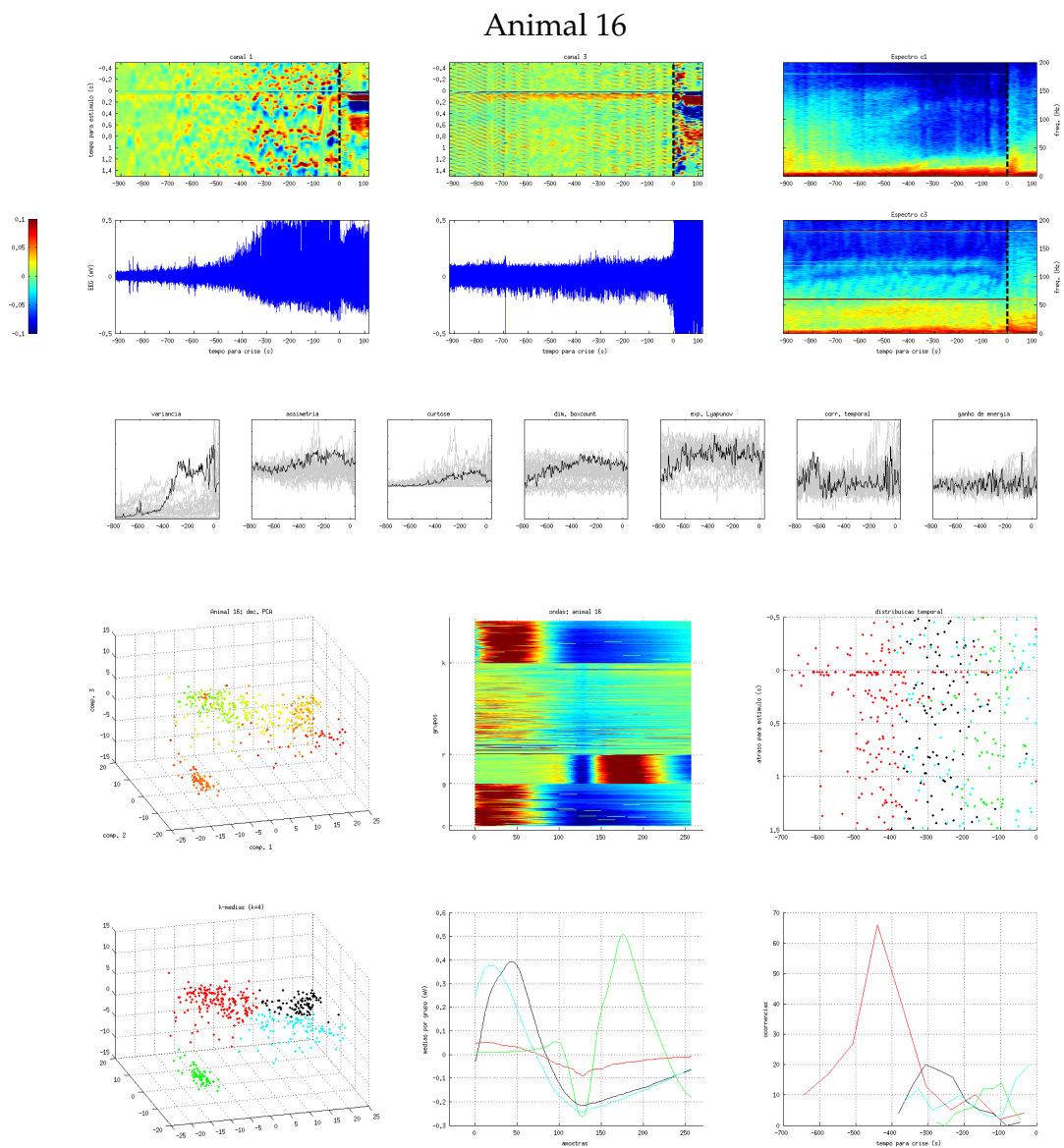


Figura B.13: Análises para o animal 16 – PTZ+EE(-)



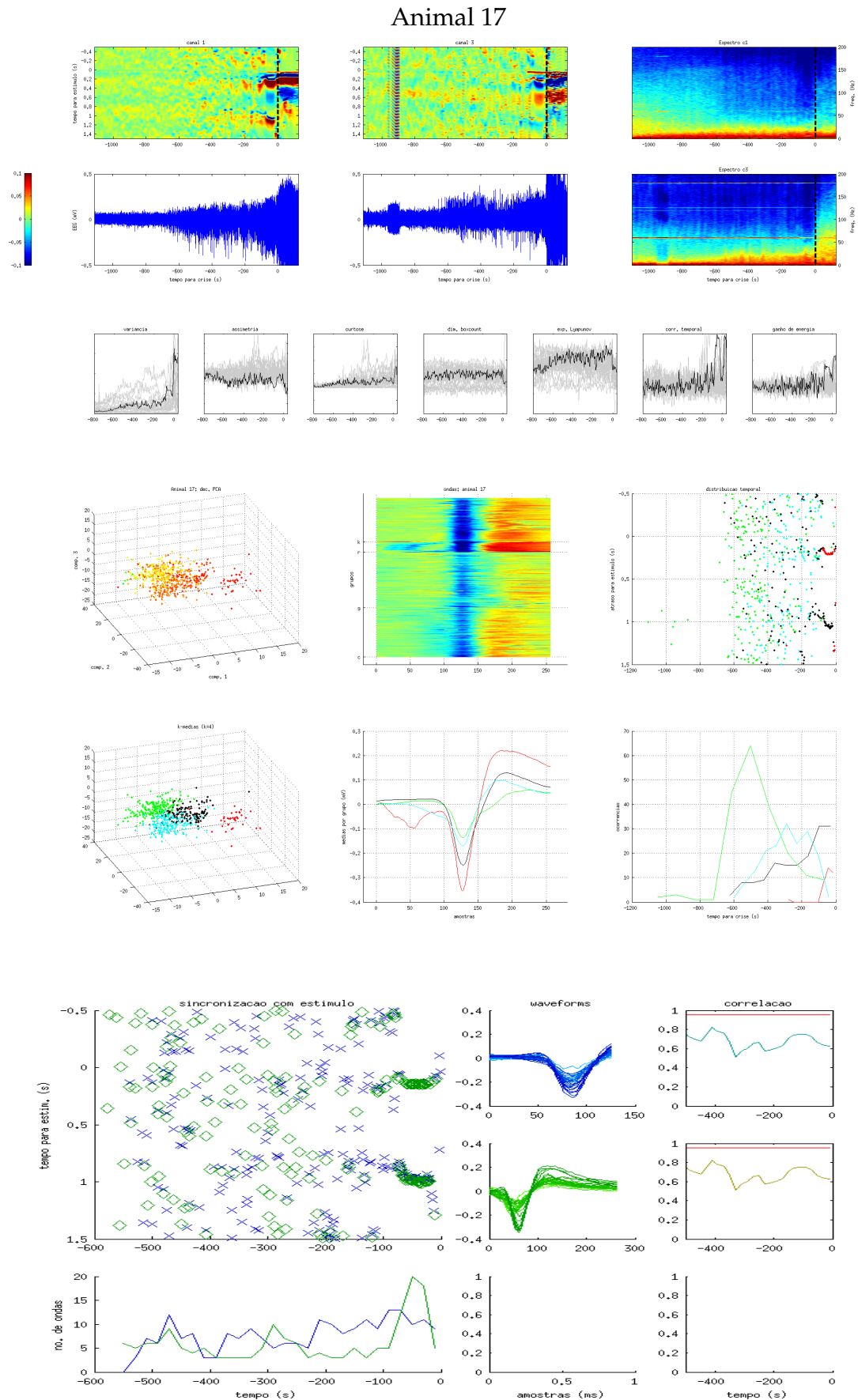


Figura B.14: Análises para o animal 17 – PTZ+EE(+)



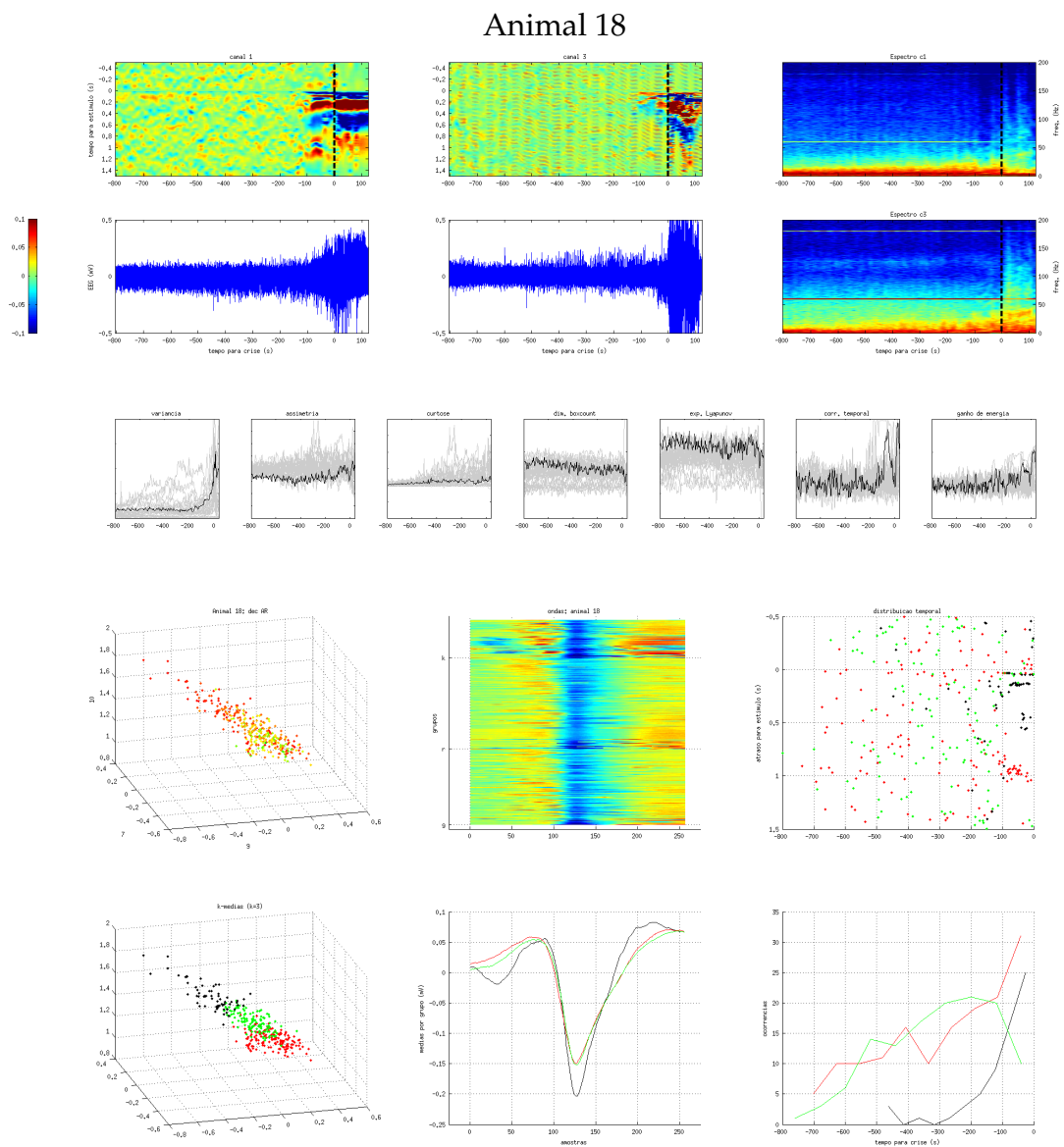


Figura B.15: Análises para o animal 18 – PTZ+EE(+)

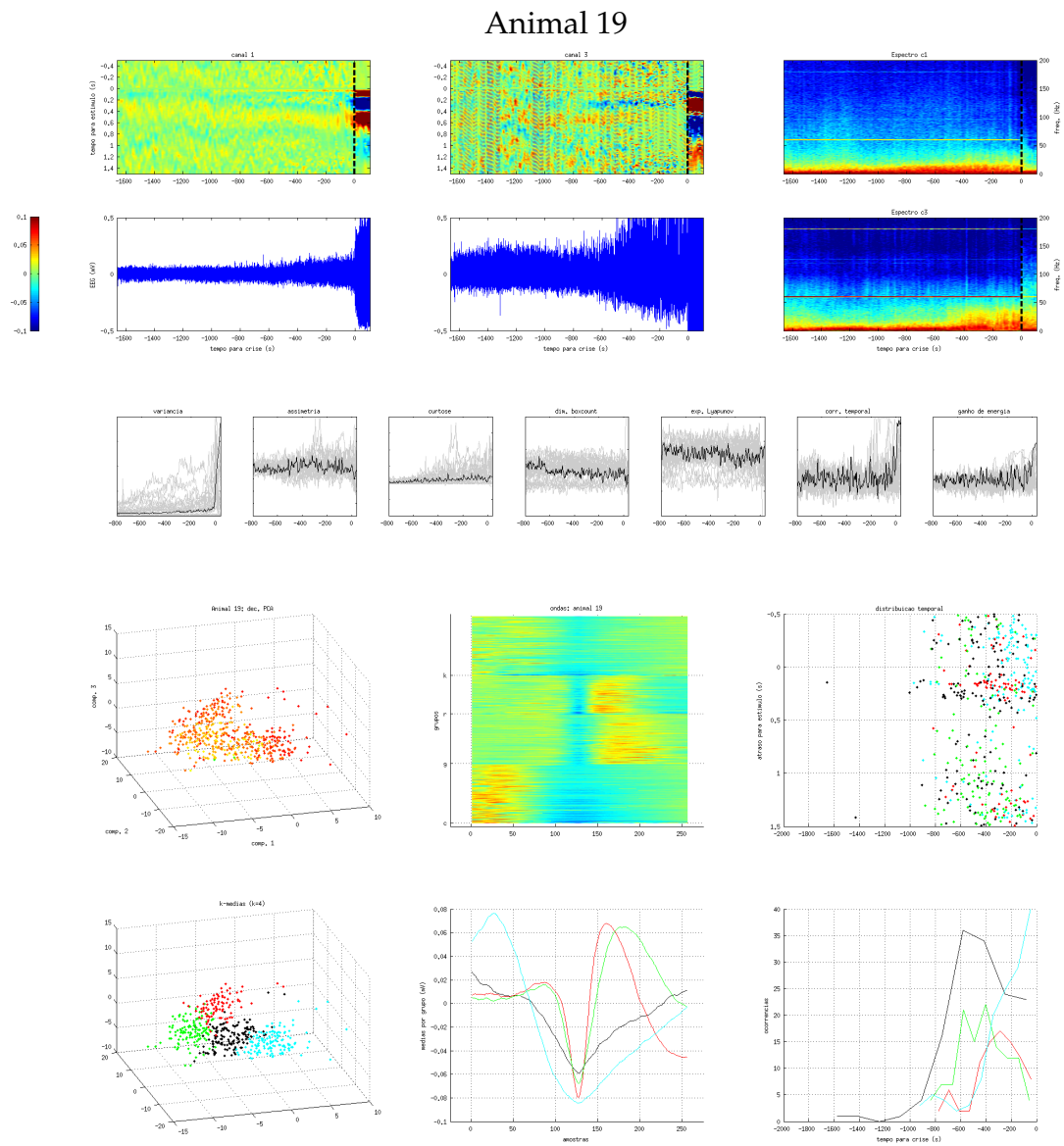


Figura B.16: Análises para o animal 19 – PTZ+EE(+)

## Animal 20

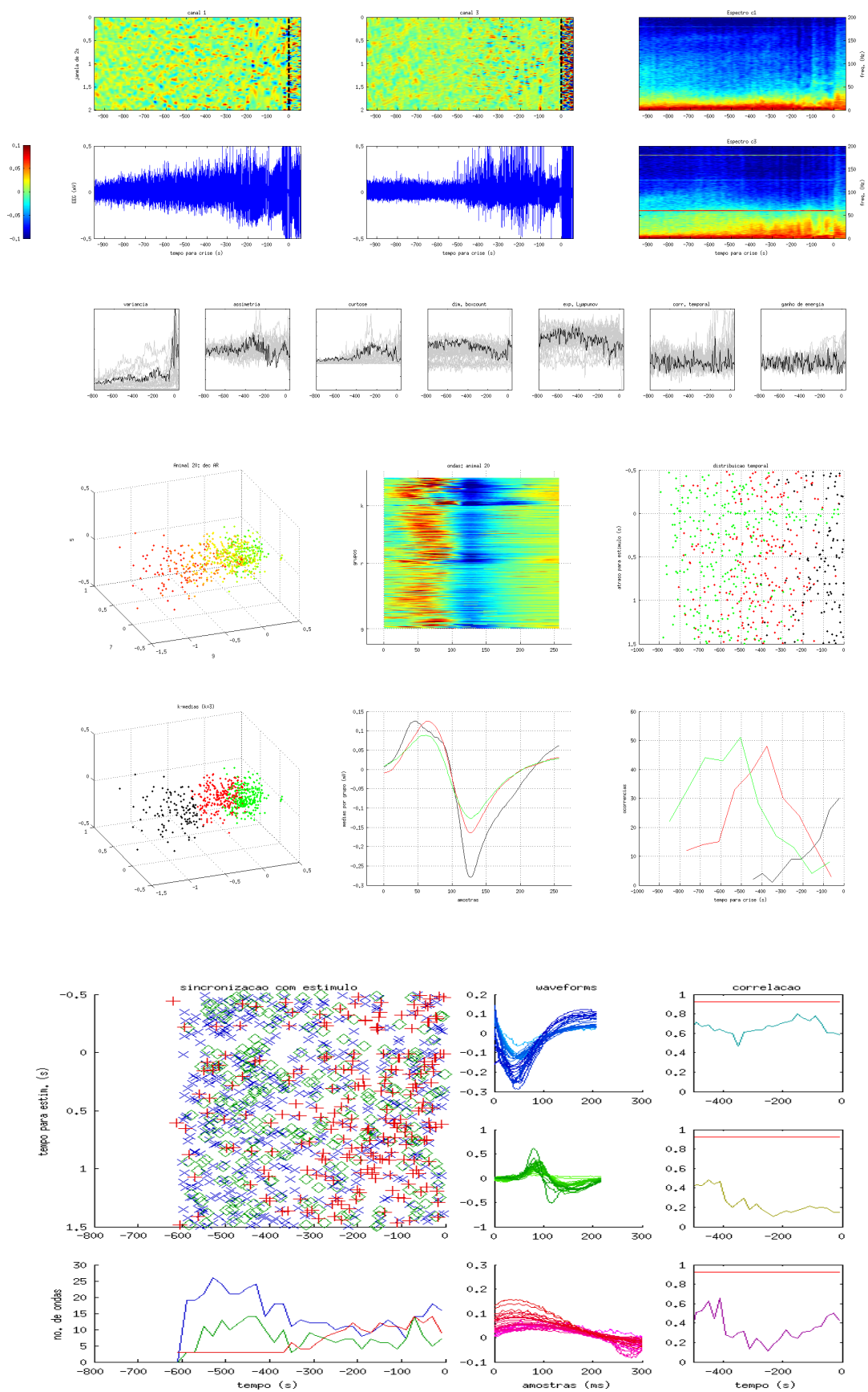


Figura B.17: Análises para o animal 20 – PTZ

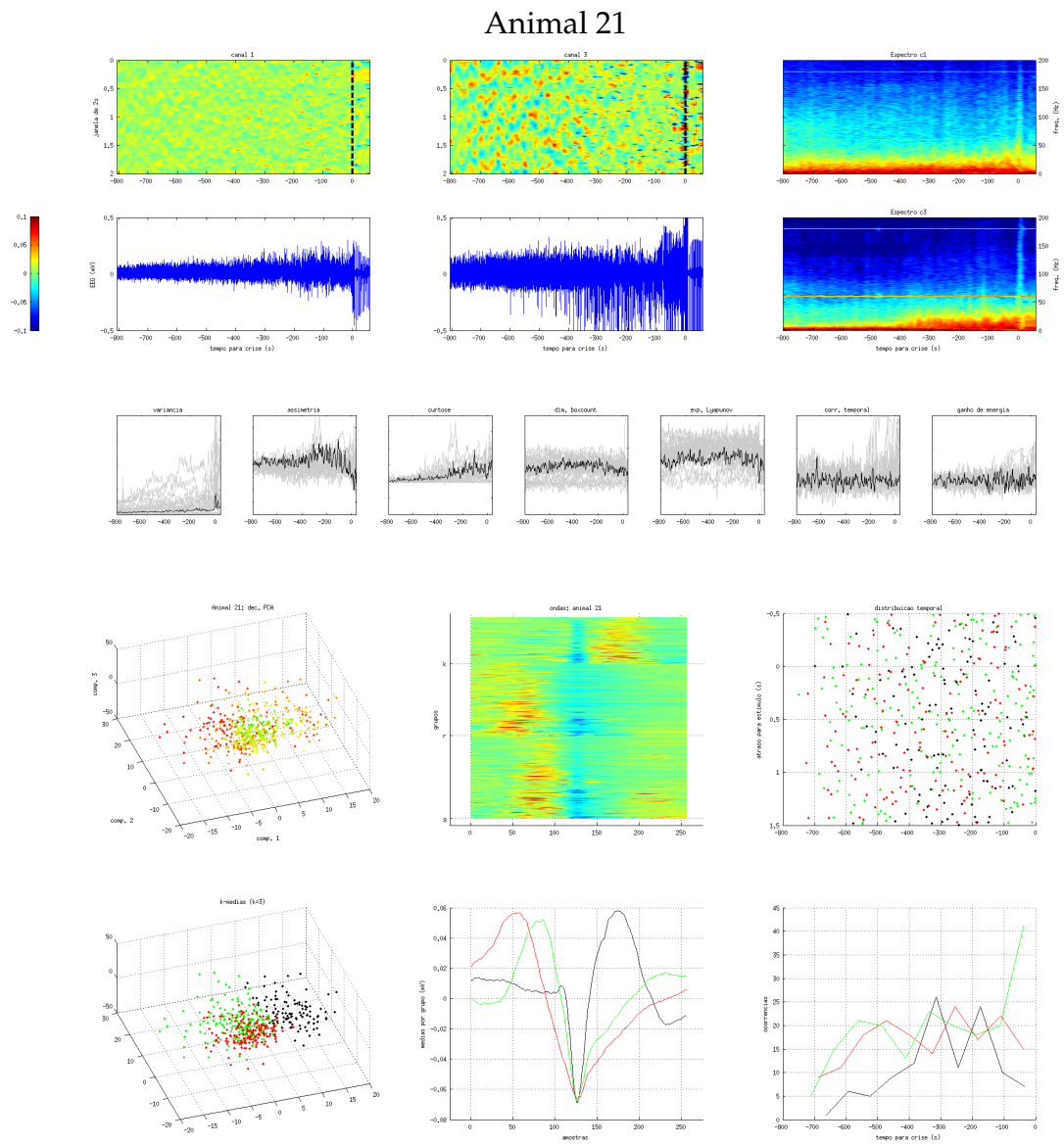


Figura B.18: Análises para o animal 21 – PTZ

## Animal 22

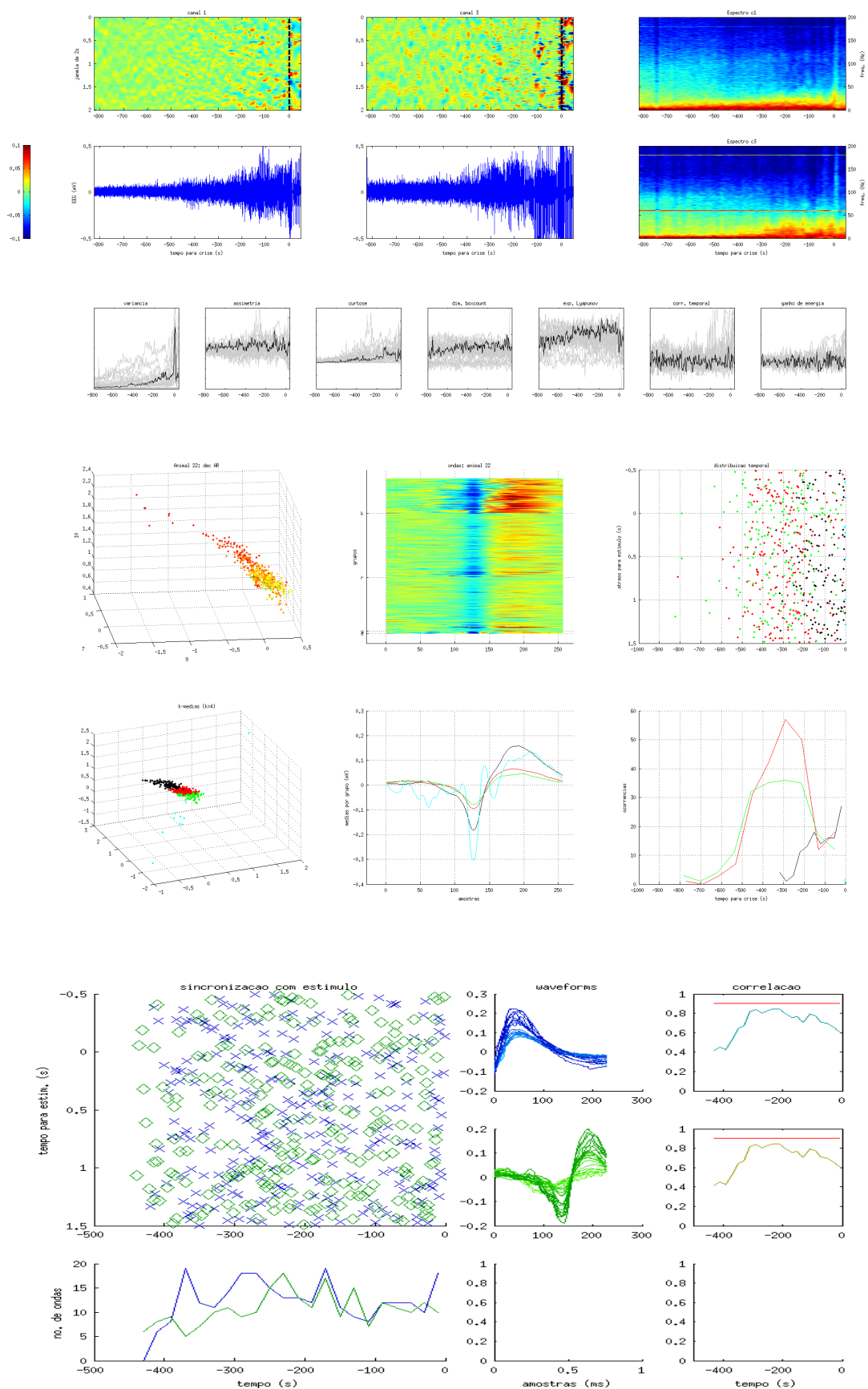


Figura B.19: Análises para o animal 22 – PTZ

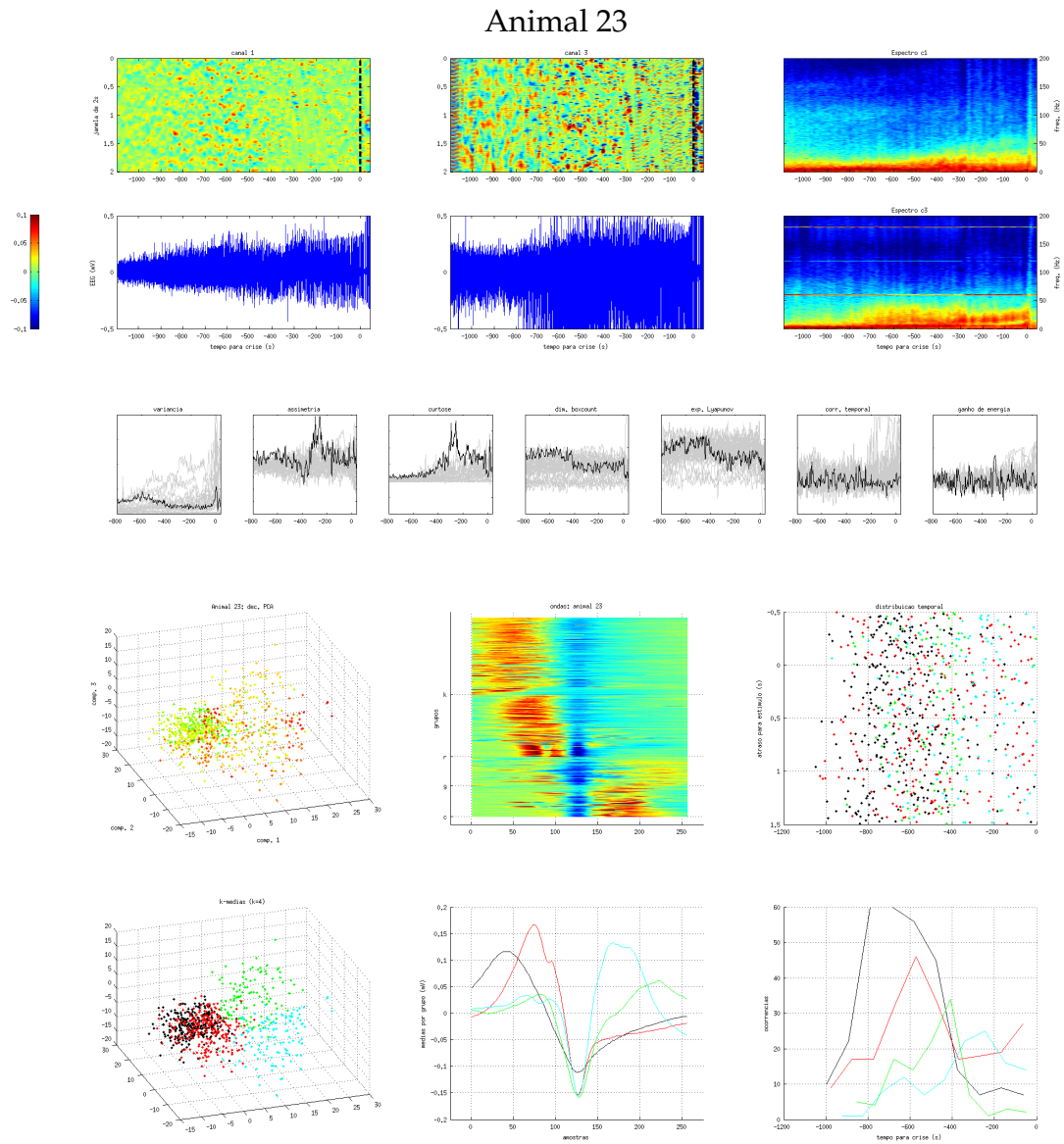


Figura B.20: Análises para o animal 23 – PTZ



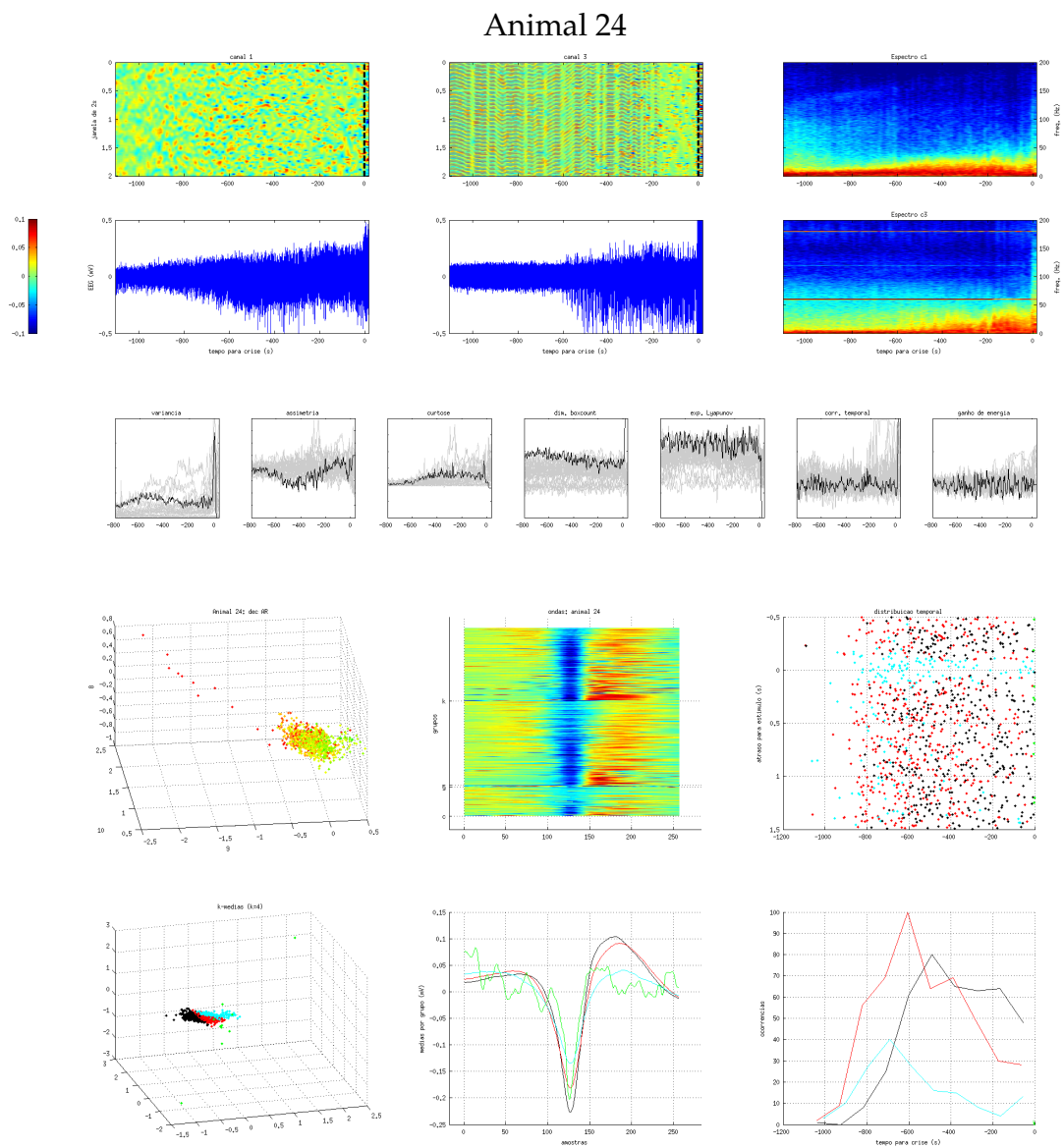


Figura B.21: Análises para o animal 24 – PTZ

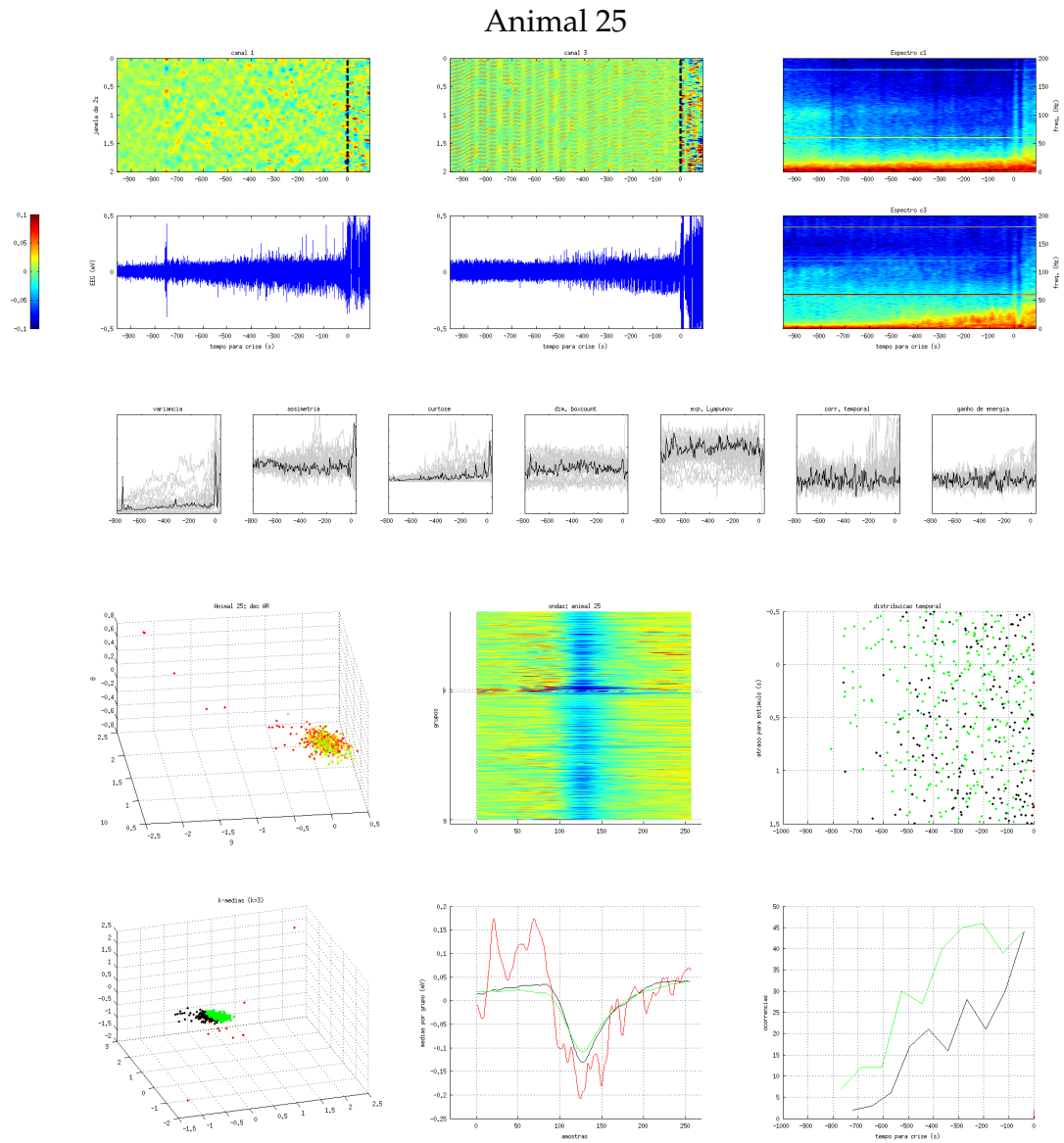


Figura B.22: Análises para o animal 25 – PTZ



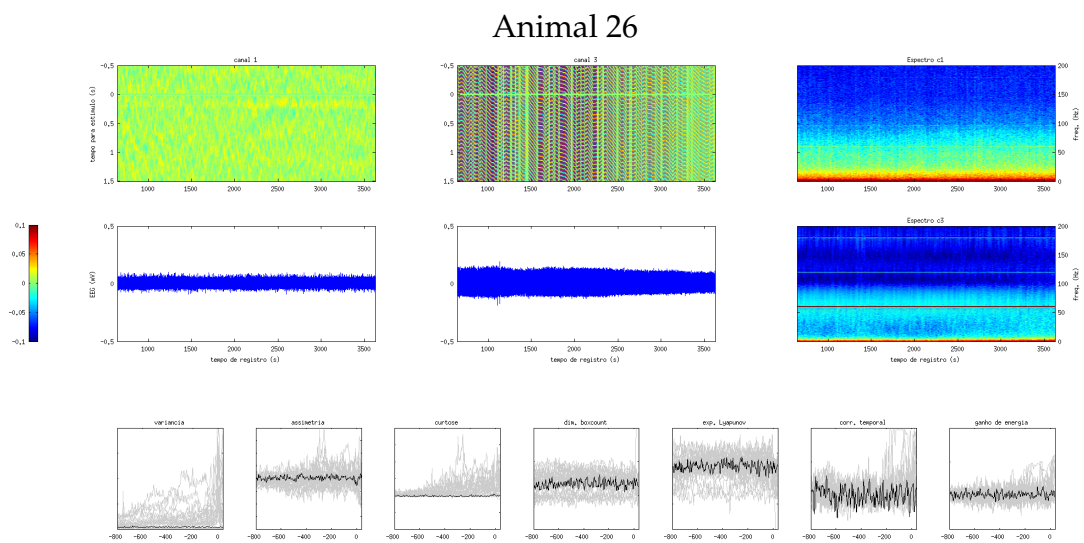


Figura B.23: Análises para o animal 26 – EE

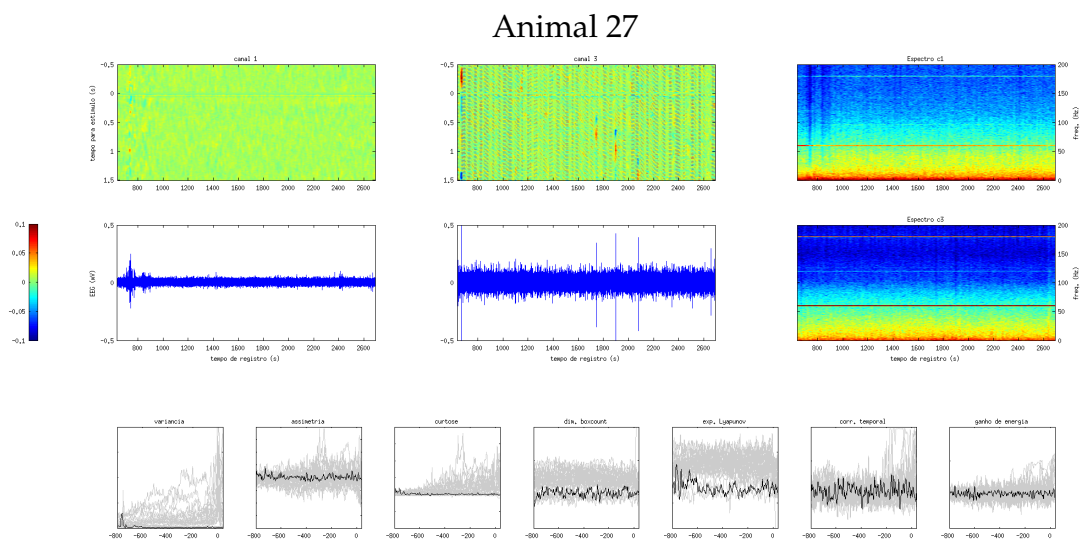


Figura B.24: Análises para o animal 27 – EE

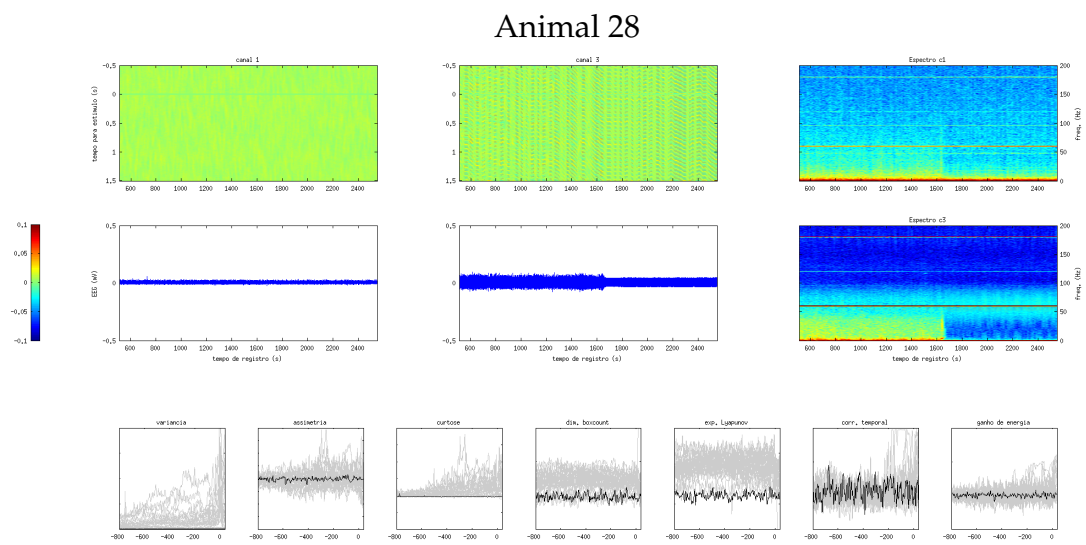


Figura B.25: Análises para o animal 28 – EE

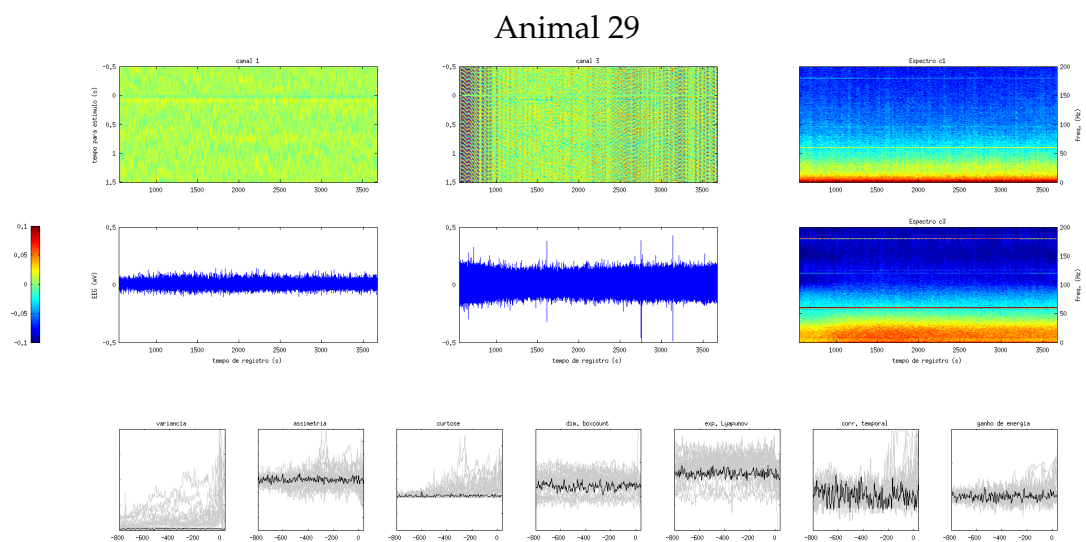


Figura B.26: Análises para o animal 29 – EE

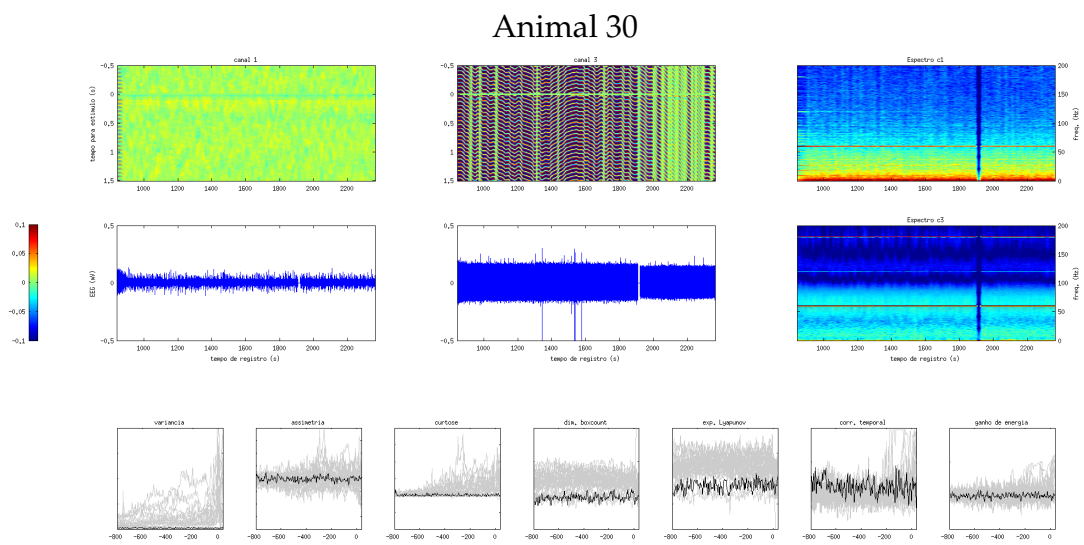


Figura B.27: Análises para o animal 30 – EE

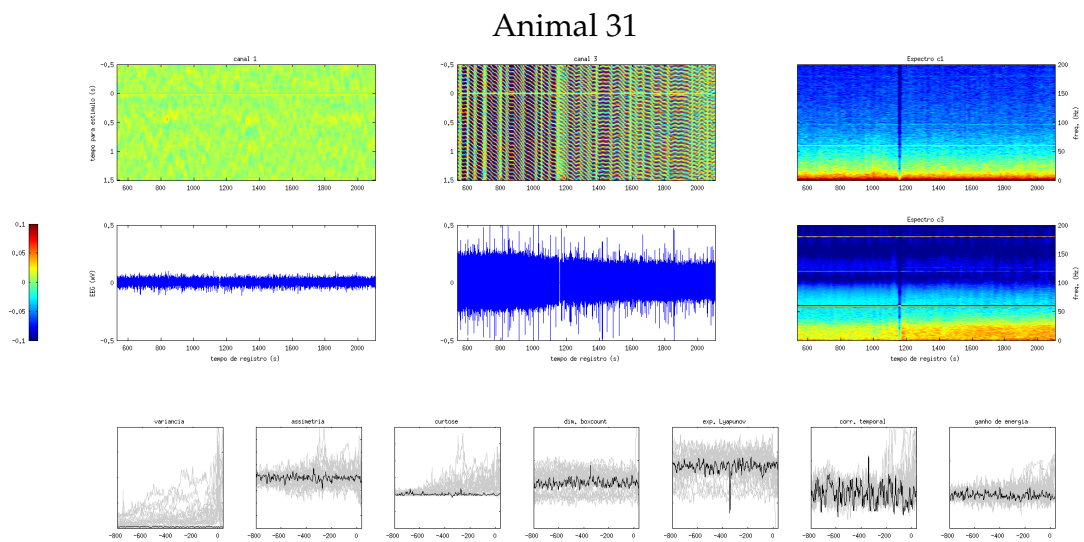


Figura B.28: Análises para o animal 31 – EE



# Certificado do Experimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

## CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 150/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Redes neurais hiperexcitáveis e hipersincrônicas em modelos animais de epilepsia: aspectos da dinâmica temporal de recrutamento neural na epileptogênese**", que tem como responsável **Márcio Flávio Dutra Moraes**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 02/2007**.

Este certificado expira-se em **28/ 02 / 2012**.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 150/2006**, related to the project entitled "**Hyperexcitable and hypersynchronous neural networks in animal models of epilepsy: temporal dynamics aspects of neuronal recruitment in epileptogenesis**", under the supervision of **Márcio Flávio Dutra Moraes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 28, 2007**.

This certificate expires in **February 28, 2012**.

Belo Horizonte, 28 de Fevereiro de 2007.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@proq.ufmg.br](mailto:cetea@proq.ufmg.br)