

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOINFORMÁTICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB

HIPEREXCITABILIDADE E HIPERSINCRONISMO
EM MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIA:
ASPECTOS TEMPORAIS DO RECRUTAMENTO DE
SUBSTRATOS NEURAIS NA ICTOGÊNESE

Aluno: Vinícius Rosa Cota

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Tese de Doutorado apresentada ao programa de doutorado em Bioinformática, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB / UFMG, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Trabalho realizado no:

**NÚCLEO DE NEUROCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA**

Belo Horizonte, Maio de 2007

<< PÁGINA DE APROVAÇÃO >>

<< CERTIFICADO CETEA/UFMG – PROTOCOLO No. 150/2006 >>

"À minha querida avozinha, só minha, vó Lala."

Agradecimentos

Se alguém encontrar em mim alguma garantia de qualidade, ela certamente será devida à procedência. Por isso começo agradecendo a Deus, que me cercou de pessoas maravilhosas para me fazer crescer e me tornar um ser humano melhor a cada dia.

Agradeço à minha esposa Mayra, companheira, amante e amiga, cujo amor e carinho me alimentam e me sustentam nessa batalha da vida. Agradeço em especial a esse anjo em forma de moleca, minha filha, Maria Luiza, cujo nascimento trouxe novas razões e esperanças, definindo os meus caminhos rumo a destinos bem superiores na vida. Um simples sorriso seu, junto com um sonoro “papaiêê” me dá (e me deu) forças para superar os obstáculos e seguir adiante.

Muito obrigado aos meus pais, Benedito e Maria, cuja dedicação à educação dos filhos me ofereceu os mais nobres valores do caráter. O gosto pela honestidade, pelo trabalho e pela família são os tesouros recebidos e com muito carinho guardados por mim, vida afora. Agradeço também ao meu irmão, o Lu, talentoso músico e biólogo,

cuja inteligência social muito me fez crescer, oferecendo-me o seu companheirismo e seus bons “conselhos de irmão mais velho”. Muito obrigado aos meus familiares (“vó meu viu!?”), desse e do outro lado da vida, por cuidarem de mim, representando verdadeira extensão do meu lar. Ao Neuren (PhD em boa cerveja), Geralda (in memoriam) Wallace, Fernanda e família pelo apoio e carinho numa das fases mais difíceis – ainda que maravilhosa – de toda a minha vida.

Agradeço ao meu outro irmão Lu, o de coração, por todo carinho e atenção, muitas vezes mal correspondidos. Ao meu brother de laboratório, Gabriel papo-bom, pela amizade e pela solidariedade ao longo de todo o doutorado. Muito obrigado aos meus amigos do NNC: Pati, Elvano, Lu, Maira, Dani, Sérgio, Rezende, Brandão, Lopes (Mascarenhas), Eric, Gioconda, Maura, João Níquel-náusea, Léo, Áila, Zé Maurício, Brina, Fumega, Marielle, Suellen, Mariana, Alessandra, Adriana, Guilherme e Daniel histológico pela força na reta final. À toda turma genial da iniciação científica e todo mundo mais do lab cujos nomes me escapam à ingrata memória, muito obrigado por fazerem do meu local de trabalho, uma ambiente tranquilo, cúmplice na ciência e inspirado de boas idéias.

Grande abraço com obrigado para o pessoal do departamento de Fisiologia e Biofísica: Marco Túlio, Priscila, Kátia, Jonas, Knulpe, Daniel da endócrino e Nívea, Fabrício, Cláudio Heitor, Renato grande violeiro, Érica, Cinthia, Daniel da hipertensão, Gonzaga, Rodrigo, Rose, Jânua, Celinha e Professores (com P maiúsculo). Valeu também para turma da velha guarda: Michel, Lucas, Cláudia, Simonton, Dante, Ari e todos mais. Um obrigado em especial à amiga Aline Nardoni. Obrigado também para o brilhante Bê Sgarbi e esposa. À turma sensacional da bioinformática: Chico Tosco, Chico Lobo, Maurício (o Mudado), Gustavo, Thiago, Cris, Raquel, Adriano, KLouro e muitos outros, valeu! Do lado de fora da academia, segue o grato abraço em especial

aos amigos Roberta, Pedro, Flávia e Livia. Nesse momento, é claro que tem que ir o pedido de desculpas, porque sei que vários nomes foram deixados de lado. Acreditem, é fruto unicamente das noites mal dormidas fechando o texto da tese!

Um abraço e muito obrigado aos professores do departamento de Fisiologia e do curso de Bioinformática. A André, Grace, Carol, Juliana e Pimentel pela inteligente direção dessa máquina de fazer ciência, que é o NNC. Obrigado também pelos conselhos científicos e a amizade. Em especial, obrigado à professora Glória, cuja tranquilidade e paciência de monge foram postos à prova por mim. Felizmente e graças à imensa boa vontade da nova coordenadora, minhas solicitações, quando cabíveis, sempre foram prontamente atendidas. Valeu também aos secretários do curso, a Kátia e depois o Alberto, pelo trabalho disposto e competente.

Muito obrigado cheio de carinho à família Moraes, que, junto com o Márcio, resolveu topar a difícil empreitada de me transformar em um cientista. Espero não os ter desapontado.

Agradeço, sobretudo, a todo povo brasileiro, cujo dinheiro suado e escasso financiou a bolsa e todos os outros custos dessa pesquisa. Obrigado à CAPES, CNPq e FAPEMIG por administrarem esse recurso com a competência devida.

Agradeço também, à Natureza, de onde tirei vidas animais para a realização dos experimentos. Guardo imenso respeito por cada ratinho usado, pois significam o mais precioso recurso com o qual pude contar nessa pesquisa.

Enfim, muito obrigado a todos, pois foram fundamentais no meu processo de formação acadêmica e como cidadão, marido e pai. Guardo enorme carinho por todos. Eu nunca me esquecerei de vocês!

No entanto, este é um momento de conclusão científica e profissional. Portanto, peço licença para fazer a reverência devida a quem de fato fez toda a diferença nesse processo: o amigo, irmão mais velho e mestre por excelência, meu orientador Márcio Moraes. Agradeço profundamente pela brilhante orientação, que foi eficaz na árdua tarefa de fazer de mim um doutor. Muito obrigado, também, pela amizade, que além dos incansáveis conselhos profissionais e de vida, ofereceram-me valores morais inéditos. Na verdade, não há palavras que possam expressar a gratidão por ter trocado o tempo com a família ou o do descanso merecido, para cuidar dos problemas da minha pequenez. A ti mestre, devo muito, certamente mais do que conseguirei retribuir. Gostaria, então, de começar a quitar essa enorme dívida fazendo uma homenagem: se a essência do indivíduo puder ser definida por suas idéias e seus valores, saiba amigo Márcio, que viverás enquanto eu respirar. Pois a sombra de teus ensinamentos e o esboço das tuas qualidades permanecerão em mim até que a tempo e a morte me convidem a reintegrar a natureza.

Sumário

Sumário	i
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumo.....	1
Abstract	3
I – Introdução	5
<i>I.1 – Epilepsias</i>	6
I.1.1 – Conceitos e definições.....	6
I.1.2 – Mecanismos da ictogênese: hiperexcitabilidade, hipersincronismo e redes reverberantes.....	9
I.1.3 – Limitações das Epilepsias.....	13
I.1.4 – Estimulação elétrica do sistema nervoso como tratamento para as Epilepsias	15
I.1.5 – Detecção e Predição de crises	17
I.1.6 – Caracterização e modulação da neurodinâmica da ictogênese	21
I.1.7 – Modelos animais em epileptologia.....	22
<i>I.2 – Objetivos</i>	25
<i>I.3 – Metodologia</i>	26
I.3.1- Indução dos modelos animais de epilepsia	26
I.3.2- Registro e estimulação	27
I.3.3- Cirurgia de implante de eletrodos crônicos.....	28
I.3.4- Análise do EEG	30

II – Sistema de registro e estimulação	36
II.1 – Sistema de registro	40
II.1.1 – Considerações iniciais.....	40
II.1.2 – Pré-amplificador ou <i>headstage</i>	41
II.1.3 – Módulos condicionadores.....	44
II.1.4 - Interface	48
II.1.5 – Conversor A/D.....	51
II.1.6 - Gabinetes.....	51
II.1.7 – Software de registro e análise.....	52
II.1.8 – Testes e <i>benchmarking</i>	53
II.1.9 - Uso do sistema.....	55
II.2 – Estimulador elétrico	58
II.2.1 – Considerações iniciais.....	58
II.2.2 - Visão geral do estimulador.....	59
II.2.3 – Interface com o PC e software de configuração de parâmetros	61
II.2.4 – Gerência de energia.....	63
II.2.5 – Isolamento óptico.....	64
II.2.6 – Controlador de frequência de disparo	65
II.2.7 – Gerador de pulsos	67
II.2.8 – Gerência de opções	69
II.2.9 – Estágio de saída	70
II.2.10 – Medição dos parâmetros elétricos.....	73
II.2.11 – Avaliação do sistema em um protocolo de LTP.....	73
II.3 – Discussão	76
III – Aspectos temporais do EEG durante a ictogênese.....	81

<i>III.1 – Aspectos temporais do EEG e predição de crises por PTZ em eletrodos corticais</i>	85
III.1.1 – Considerações iniciais.....	85
III.1.2 – Metodologia	85
III.1.3 - Resultados.....	86
III.1.4 – Discussão.....	96
<i>III.2 – Aspectos temporais do EEG e predição de crises por pilocarpina em eletrodos corticais</i>	104
III.2.1 – Considerações iniciais.....	104
III.2.2 – Metodologia	104
III.2.3 – Resultados	105
III.2.4 – Discussão.....	113
<i>III.3 Aspectos temporais do EEG e predição de crises por pilocarpina em eletrodos profundos</i>	117
III.3.1 – Considerações iniciais.....	117
III.3.2 – Metodologia	117
III.3.3 – Resultados	118
III.3.4 – Discussão.....	127
<i>III.4 – Discussão geral dos experimentos III.1 a III.3 e conclusões</i>	130
IV – Modulação da neurodinâmica do sistema límbico visando supressão de crises ..	138
IV.1 – Considerações iniciais	139
IV.2 – Metodologia	140
IV.3 – Resultados	144
IV.4 – Discussão	146

V – Medição da força de reverberação do sistema límbico: uma proposta para preditor de crises.....	149
<i>V.1 – Considerações iniciais</i>	150
<i>V.2 – Metodologia</i>	153
<i>V.3 – Resultados</i>	155
<i>V.4 – Discussão</i>	161
VI – Discussão geral	166
Apêndice A: fundamentos matemáticos	175
<i>A.1 – Energia</i>	176
<i>A.2 – Espectro de potência</i>	178
<i>A.3 – Autocorrelação e correlação cruzada</i>	179
<i>A.4 – Dimensão fractal</i>	181
<i>A.5 – Similaridade dinâmica</i>	183
Apêndice B – Lógica do sistema de gerenciamento de opções.....	186
Referências bibliográficas	190

Lista de figuras

Figura 1 - Cartografia das metodologias de predição de crises segundo a capacidade de predição. Extraído de Van Quyen, 2001a.....	20
Figura 2 - Procedimento cirúrgico de implante de eletrodos crônicos.	29
Figura 3 - Aspecto final da cirurgia.	29
Figura 4 - Eletrodo para registros bipolares profundos.....	30
Figura 5 - Diagrama de blocos do sistema de registro e do estimulador elétrico.....	41
Figura 6 - Circuitos das duas versões do <i>headstage</i> : EECMG-CAA (A) e EEG-CAA (B).	43
Figura 7 – Placa do <i>Headstage</i>	44
Figura 8 - Diagrama de blocos do amplificador de ponte.....	45
Figura 9 - Placa do amplificador de ponte.	46
Figura 10 - Diagrama de blocos do amplificador de biopotenciais.	46
Figura 11 - Diagrama de blocos do amplificador de biopotenciais com ganho programável.	47
Figura 12 - Placa do amplificador de biopotenciais.	47
Figura 13 - Placa do amplificador de biopotenciais com ganho programável.	47
Figura 14 - Diagrama funcional da interface de 16 canais.....	49
Figura 15 - Diagrama funcional da interface de 64 canais.....	50
Figura 16 - Placa da interface de 16 canas sem e com módulos conectados.	50
Figura 17 - Gabinetes para a interface e os módulos, mostrando detalhes mecânicos para polarização do encaixe.	52
Figura 18 - Sinais de ECG captados durante <i>benchmarking</i> a partir do sistema comercial (A) e do sistema desenvolvido (B).....	55

Figura 19 – Dicionário vetocardiográfico. Alças vetocardiográficas correspondentes às despolarizações atrial (A) e ventricular (B) e à repolarização ventricular (C) de um registro obtido de um animal após a microinjeção de salina. A letra D corresponde ao vetocardiograma (VCG) equivalente a um ciclo cardíaco completo no mesmo período de tempo. A letra E mostra uma extra-sístole ventricular apresentada por esse mesmo rato 527s após a administração da TsTX. Extraído do texto de qualificação da aluna Patrícia Maia Guidine, com autorização.....	57
Figura 20 - Diagrama de blocos do estimulador elétrico.....	59
Figura 21 - Aparência final da placa do estimulador elétrico	61
Figura 22 - <i>Screenshot</i> da tela do programa de configuração e controle do estimulador elétrico.....	63
Figura 23 - Circuito do gerador de frequências.....	66
Figura 24 - Frequência de disparo dos pulsos segundo capacitor selecionado e posição do tap central.....	67
Figura 25 - Circuito do gerador de pulsos.....	68
Figura 26 - Duração do pulso segundo capacitor selecionado e posição do tap central.	68
Figura 27 - Circuito do sistema de gerência de opções.....	69
Figura 28 - Circuito do estágio de saída.	71
Figura 29 - Amplitude de corrente de saída segundo posição do tap central.....	72
Figura 30 – Resultados do experimento de LTP usando o estimulador elétrico desenvolvido. Morfologia do fEPSP antes (A) e depois (B) do estímulo de alta frequência (HFS). Evolução da amplitude do fEPSP ao longo de todo o experimento. Extraído e adaptado da dissertação de mestrado da aluna Luciana Estefani Drumond, com autorização.	75

Figura 31 - EEG do CxE do rato 09 durante o período de referência (A) e após a injeção de PTZ (B). A seta indica o início eletrográfico.....	88
Figura 32 – EEG do CxE de um rato representativo (09) durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (separados pela linha vertical tracejada) (A) e a respectiva análise linear no domínio do tempo: energia média (B), energia acumulada (C) e auto-correlação (D).	89
Figura 33 - Análise linear no domínio da frequência do rato 09 durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (B). O registro de EEG do CxE é mostrado (A) para comparação.	90
Figura 34 - Análise não linear do rato 09, com o EEG do CxE durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (A), a curva de dimensão fractal (B) e a similaridade dinâmica (C).	91
Figura 35 - Correlação cruzada entre córtices esquerdo e direito do rato 09 (A) e o atraso do pico de correlação (B).	92
Figura 36 - Análise não linear do rato 07, com o EEG do CxE durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (A), a curva de dimensão fractal (B) e a similaridade dinâmica (C).	93
Figura 37 - EEG do CxE do rato 07 durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (separados pela linha vertical tracejada) (A) e a respectiva análise linear no domínio do tempo: energia média (B), energia acumulada (C) e auto-correlação (D).	94
Figura 38 - Análise linear no domínio da frequência do rato 07 durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (B). O registro de EEG do CxE é mostrado (A) para comparação.	95

Figura 39 - Correlação cruzada entre córtices esquerdo e direito do rato 07 (A) e o atraso o pico de correlação (B).	95
Figura 40 - Trechos de EEG do CxE de um rato representativo (R11) no período inter-ictal (A) e nos períodos pré-ictal e ictal (início eletrográfico indicado pela seta) (B), incluindo detalhes amplificados da morfologia (detA, detB, detC).....	107
Figura 41 - Trechos e detalhes do EEG ictal do CxE de outros ratos do experimento.	108
Figura 42 - Análise linear no domínio do tempo de uma única crise de um rato representativo (R11 - CxE), contendo a energia média (A), energia acumulada (B), incrementos de energia (C) e autocorrelação do sinal (D).	109
Figura 43 - Análise linear no domínio da frequência do rato 11, CxE. EEG inter-ictal de referência (até 250 s), pré-ictal (até 375 s) e ictal concatenados (A), espectro de potência (B) e comparação estatística do espectro de potência (C).	110
Figura 44 - Correlação cruzada entre córtices de um rato ilustrativo (14), durante uma única crise, com a magnitude da correlação (A) e o atraso do seu pico (B).	111
Figura 45 - Análise não linear de três crises do rato 11, CxE, com a dimensão fractal (A) e a similaridade dinâmica (B). As curvas referentes aos períodos basais estão em preto e as referentes à transição pré-ictal para ictal, estão em cinza.....	112
Figura 46 - Trechos do EEG do rato 5 na amígdala (AMY) e no hipocampo, durante o período inter-ictal (A) e na transição de pré-ictal para ictal (B) com fronteira demarcada pela seta.....	119
Figura 47 - Análise linear no domínio do tempo do EEG do hipocampo do rato 05 durante uma única crise: energia média (A), energia acumulada (B), incrementos de energia acumulada (C) e autocorrelação (D).	120
Figura 48 - Análise linear no domínio da frequência: espectro de potência do EEG do hipocampo do rato 05.....	121

Figura 49 - Análise linear no domínio da frequência do hipocampo de rato 05 em 16 das 17 crises identificadas.	122
Figura 50 - Análise linear no domínio do tempo do hipocampo do rato 05 ao longo de todo o registro: energia média (A), incrementos de energia acumulada (B) e autocorrelação (C).....	123
Figura 51 - Correlação cruzada entre amígdala e hipocampo do rato 05 ao longo de todo o registro: valor da correlação (A) e atraso do pico de correlação (B)	124
Figura 52 - Correlação cruzada entre amígdala e hipocampo do rato 06 durante a única crise detectada: valor da correlação (A) e atraso do pico (B).....	125
Figura 53 - Análise não linear do EEG do hipocampo do rato 05: dimensão fractal (A) e similaridade dinâmica (B).	126
Figura 54 - Proposta de modelo de ictogênese	132
Figura 55 - Modelo de neurodinâmica da ictogênese	135
Figura 56 - Padrões temporais de estimulação elétrica usados: histograma de duração do intervalo entre pulsos (painéis à esquerda) e simulação temporal do padrão dos estímulos periódico (painéis superiores) não periódico (painéis inferiores).	141
Figura 57 - Diagrama esquemático do desenho experimental.	143
Figura 58 - Limiar de PTZ para mioclônias de membros anteriores (MP) (A) e para a crise tônico clônica generalizada (CTCG) (B) dos diversos grupos experimentais. Grupos com letras diferentes entre si indicam diferença estatisticamente significativa.....	144
Figura 59 - Modelo da neurodinâmica da ictogênese incorporando os mecanismos de ação dos padrões de estimulação elétrica.	147
Figura 60 - Potencial evocado no hipocampo pela estimulação elétrica da amígdala em um rato anestesiado.	156

- Figura 61 - Evolução temporal do potencial evocado mostrado como uma superfície codificada por cores: cor azul representa vales e cor vermelha representa picos. Cada linha da imagem é um potencial evocado..... 157
- Figura 62 - Atraso da correlação cruzada entre potenciais evocados durante o período de referência, o período pré-ictal e o período ictal. As fronteiras entre períodos são demarcadas com a linha vertical cheia e a tracejada. Esta última indica início eletrográfico. A linha vertical traço-ponto indica o instante de início da CTCG. 158
- Figura 63 - Superfícies codificadas por cor da seqüência de potenciais evocados nos períodos de referência e pré-ictal. 159
- Figura 64 - Análise estatística do atraso do pico de correlação 5 s do período pré-ictal imediatamente antes do início eletrográfico e do últimos 5 s do período de referência. * $p < 0,01$, teste t de Student. 160
- Figura 65 - Sobreposição da superfície de pontenciais evocados com o atraso da correlação entre potenciais. 162
- Figura 66 - Circuito do sistema de gerência de opções 187

Lista de tabelas

Tabela 1 – Classificação das crises epiléticas	7
Tabela 2 - Classificação das epilepsias	8
Tabela 3 - Sequência de acionamento dos estágios de saída segundo estados dos bits de polaridade e de número de fases.	70
Tabela 4 - Parâmetros elétricos do estimulador medidos com uma carga puramente resistiva de 8,2 KW.	73
Tabela 5 - Latência média para início das crises máximas e mínimas	87
Tabela 6 - Intervalos entre deflexões significativas e início eletrográfico	96
Tabela 7 - Valores das latências a partir do início eletrográfico das deflexões positivas dos parâmetros	112
Tabela 8- Intervalos entre deflexões significativas e início eletrográfico	126
Tabela 9 - Tabela de contingência de animais que apresentaram comportamento de rearing. As letras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p < 0,05 teste exato de Fischer).	145

Lista de abreviaturas

AMY – Amígdala

CA – Corno de Amon

CBZ – Carbamazepina

CI - Circuito integrado

cols. - colaboradores

CTCG – Crise tônico clônica generalizada

DBS – Deep Brain Stimulation

DFT – Discrete Fourier Transform

d.p. – desvio padrão

EE – Estimulação elétrica

EEG – Eletroencefalografia / eletroencefalograma

ELT – Epilepsia de Lobo Temporal

e.p.m. – Erro padrão da média

FDA – Food and Drug Administration

fEPSP – Field Excitatory Post Synaptic Potential

FFT – Fast Fourier Transform

GEPR – Genetic Epileptic Prone Rats

HFS – High Frequency Stimulation

HP – Hipocampo

i.m. – intra-muscular

i.p. – intra-peritonal

i.v. – intravenoso

MP – Mioclonia parcial / mioclonia de membros anteriores

PB – Fenobarbital

PHT - Fenitoína

PTZ – Pentilenotetrazol

s.c. – sub-cutâneo

SE – Status Epilepticus

SFT – Short Fourier Transform

SN – Sistema nervoso

SNC – Sistema nervoso central

VPA – Ácido Valpróico

WAR – Wistar Audiogenic Rat

Resumo

As Epilepsias representam uma desordem neurológica grave e de grande prevalência mundial. Sua manifestação clínica, a crise epiléptica, está comumente associada a movimentos automáticos, ataxia e perda de consciência, que podem causar danos materiais, lesões e até mesmo a morte. Uma considerável parcela dos pacientes com Epilepsia não obtém controle adequado das crises através do tratamento clássico. Aliada à imprevisibilidade das crises, a Epilepsia pode trazer grande prejuízo na qualidade de vida dos pacientes refratários, que sofrem de severas restrições no acesso ao trabalho e ao lazer. Por outro lado, novas formas de tratamento da doença, tais como a estimulação elétrica do sistema nervoso, e dispositivos automáticos de predição de crises têm enorme potencial para reverter esse obscuro cenário. Nesse contexto, o objetivo dessa tese foi realizar avanços tanto no campo da estimulação elétrica anti-convulsivante quanto no de metodologias de predição e detecção de crises. Para isso, os trabalhos foram divididos em quatro fases principais: 1) desenvolvimento tecnológico, segundo requisitos específicos dos experimentos, de um sistema computadorizado de registro de múltiplas variáveis fisiológicas e um estimulador elétrico do SNC totalmente controlado por computador; 2) caracterização eletrofisiológica de modelos animais clássicos em epileptologia experimental, visando avaliar um repertório de metodologias de detecção e predição de crises disponível na bibliografia corrente. Em paralelo, foi feita a elaboração de um modelo do processo ictogênico, capaz de agrupar harmonicamente o conhecimento atual com os resultados obtidos nesta parte; 3) modulação do processo ictogênico, segundo o conceito do modelo proposto, de maneira a facilitar ou impedir comportamentos convulsivos, através do simples manejo do padrão temporal de estimulação elétrica; 4) proposição e teste de uma nova

metodologia de predição de crises, baseada no modelo, através da análise da forma do potencial evocado no hipocampo através da estimulação elétrica da amígdala.

Dentre os desenvolvimentos tecnológicos, ressaltam-se as inovações no sistema de registro e no estimulador, concretizadas através de um *headstage* com amplificação diferencial e o controle digital da amplitude de corrente do estímulo. Entre os achados científicos, salientam-se: A) correlatos dos parâmetros eletrofisiológicos com fases distintas da expressão motora das crises; B) comprovação da eficiência de metodologias de análise linear na detecção do início eletrográfico; C) efeito pró-convulsivante da estimulação elétrica periódica a 4 Hz, na amígdala, provavelmente via efeito de ressonância com redes reverberantes no sistema límbico; D) efeito anti-convulsivante da estimulação elétrica de baixa frequência (4 pulsos por segundo) e com intervalos entre pulsos aleatórios, possivelmente via efeito anti-ressonante com circuitos ictogênicos de prosencéfalo, impedindo seu acoplamento com circuitos de tronco encefálico e; E) possibilidade de predição de crise medindo-se o atraso do pico da auto-correlação do potencial evocado no hipocampo através da estimulação elétrica da amígdala, possível parâmetro avaliador da função de transferência neural no sistema límbico.

Abstract

Epilepsy is a serious neurological disorder of great prevalence worldwide. Its clinical manifestation, the epileptic seizure, is commonly related to automatisms, ataxia and loss of consciousness, which may lead to material damage, injury or even death. A considerable number of epileptic patients do not attain adequate seizure control through common treatment. Together with the unpredictability of seizures, Epilepsy has a strong potential for jeopardizing life quality level of patients with refractory condition, who may suffer from severe restrictions accessing work and entertainment. However, new modalities of treatment, such as electrical stimulation of the nervous system, and automatic devices for the prediction of impending seizures, might be able to overcome this obscure scenery. In this context, this thesis' main goal was to contribute to both, anti-convulsant electrical stimulation and seizure detection and prediction methodologies. In order to fulfill these objectives, the work was divided in four main achievements: 1) technological development, according to specific experimental criteria, of a computerized recording system for multiple simultaneous physiological variables; and a brain tissue electrical stimulator fully controlled by a computer; 2) electrophysiological assessment of animal models commonly used in experimental epileptology, evaluating seizure detection and prediction techniques available in current bibliography. Also in this phase, a model of ictogenesis phenomena was conceived in order to match results obtained with current data. 3) Modulation of ictogenesis phenomena, according to the proposed model, in order to facilitate or impinge convulsive behavior, through only the modification of the electrical stimulation temporal pattern. 4) Proposal and evaluation of a new technique to predict seizures, still

based on the model, through analysis of hippocampal potentials waveform evoked by electrical stimulation of the amygdala.

As technological development, innovations in the recording system and stimulator were accomplished by means of a new headstage with differential amplification and digital control of stimulus current amplitude. Among the scientific findings, the most important were: A) electrophysiological parameters correlate with distinct phases of seizure motor expression; B) efficiency of linear analysis on the detection of electrographic seizure onset revisited; C) pro-convulsant effect of 4 Hz periodic electrical stimulation to amygdala, probably due to a resonating effect with oscillating neural network within the limbic system; D) anti-convulsant effect of low-frequency (four pulses per second) randomized interpulse interval electrical stimulation, possibly due to an anti-resonating effect in prosencephalic ictogenic neural networks and impingement of its coupling to brainstem reverberating circuits and; E) possibility of seizure prediction by means of measuring the auto-correlation peak lag of hippocampal potentials evoked by electrical stimulation of the amygdala, value to be considered as an evaluating parameter of neural transfer function in the limbic system.

I – Introdução

“Tudo vale a pena, se a alma não é pequena.”

Fernando Pessoa

1.1 – Epilepsias

1.1.1 – Conceitos e definições

Dá-se o nome Epilepsia à disfunção cerebral crônica caracterizada por episódios espontâneos e recorrentes de atividade neural transitória excessiva e sincrônica (Fisher et al. 2005).

A expressão desta atividade neural disfuncional é denominada crise epiléptica (Fisher et al. 2005) e depende da porção do cérebro envolvida (Engel 1995). As crises epiléticas podem ser as mais diversas, desde convulsões generalizadas, com hiperextensão de membros superiores e inferiores e mioclonias, passando por automatismos faciais (tiques, mastigação, salivação) e até mesmo alterações drásticas de humor como agressividade e afetividade exacerbadas. A Epilepsia representa, portanto, uma multiplicidade de quadros clínicos e, por isso, costumou-se usar o plural da palavra (Epilepsias) para melhor representar o fato de que representa um conjunto de doenças correlacionadas, mas com diferenças essenciais em suas manifestações e causas (Engel 1995).

Atualmente a maior parte das crises epiléticas pode ser classificada em dois grandes grupos: parciais e generalizadas. As parciais envolvem apenas uma porção do encéfalo em sua manifestação, o que é denominado foco epilético. Já as generalizadas envolvem todo o encéfalo desde seu início. Crises parciais podem evoluir e se generalizar e são então denominadas parciais secundariamente generalizadas. Subdividem-se ainda em simples, sem perda da consciência, e complexas, com perda da consciência (ILAE 1981).

Ao contrário da conhecida crise generalizada com manifestações motoras do tipo tônico-clônica (denominada grande mal), algumas crises não têm quaisquer expressões motoras. De particular interesse é a crise de ausência típica (ou pequeno mal) cuja

expressão é a total ausência de manifestações comportamentais, ou seja, o paciente parece ter “se desligado” do mundo.

A tabela 1 (ILAE 1981) resume esta classificação.

Tabela 1 – Classificação das crises epiléticas

I.	Crises parciais (focais)
	a. Crises parciais simples
	b. Crises parciais complexas
	c. Crises parciais secundariamente generalizadas
II.	Crises generalizadas
	a. Ausência
	i. Típica (pequeno mal)
	ii. Atípica
	b. Mioclônica
	c. Clônica
	d. Tônica
	e. Tônico-clônica (grande mal)
	f. Atônica
III.	Não classificadas

Já as epilepsias são classificadas de forma bem mais extensa, resumida aqui na tabela 2 (ILAE 1989).

Tabela 2 - Classificação das epilepsias

I.	Síndromes e Epilepsias Localizadas
II.	Síndromes e Epilepsias Generalizadas
III.	Síndromes e Epilepsias Indeterminadas se Focais ou Generalizadas
IV.	Síndromes Especiais

Para que um paciente seja diagnosticado como portador de Epilepsia é necessário que ele apresente, na ausência de intoxicação ou abstinência, pelo menos uma crise, acompanhada de alterações permanentes no cérebro que aumentem sua susceptibilidade a outras crises. É necessário, também, que a esse quadro esteja associado um distúrbio neurobiológico, cognitivo, psicológico ou social (Fisher et al. 2005).

Há duas principais modalidades de tratamento das Epilepsias em uso corrente na clínica médica: intervenção medicamentosa (Guerreiro & Palmira 2000) e cirurgia de ablação (Neto & Cendes 2000). Há alternativas cujo uso é muito restrito ou que se encontram em fase experimental, tais como a dieta cetogênica (Freeman et al. 2000) e a estimulação elétrica do SN (Theodore & Fisher 2004). Comentar-se-á mais a respeito desta última mais adiante.

O tratamento farmacológico se assenta, historicamente, em bases empíricas e age, de forma geral, no sentido de diminuir a excitabilidade do tecido neural, aumentando o tônus inibitório ou diminuindo o excitatório. Tendo em vista as diferentes causas das epilepsias, o tratamento farmacológico é variado, sendo que cada droga tem efeito diferenciado em cada caso. Abaixo, estão apresentados alguns dos principais anti-convulsivos usados no tratamento das epilepsias com seus respectivos mecanismos de ação.

O barbitúrico fenobarbital (PB) aumenta a inibição GABA-érgica ao prolongar a abertura dos canais de cloreto (Guerreiro & Mello 2004). A fenitoína (PHT) atua de diversas formas no sentido de diminuir a excitabilidade do neurônio, interferindo, sobretudo, no transporte de sódio através da membrana (Garzon et al. 2004). A carbamazepina (CBZ) tanto atua diminuindo a condutância da membrana ao sódio, quanto na neurotransmissão sináptica excitatória, antagonizando purinas, monoaminas, acetilcolina e NMDA (Costa 2004). Já o ácido valpróico (VPA) não tem seus mecanismos farmacológicos bem elucidados, mas, ao que parece, é capaz de elevar os níveis de GABA no sistema nervoso central (Yacubian 2005).

Outra forma de tratamento usada, sobretudo no caso de refratariedade medicamentosa, é submeter o paciente a um procedimento cirúrgico para a ressecção do foco epileptogênico. Obviamente, a determinação precisa do foco é crucial para o sucesso da cirurgia, portanto é recomendada, principalmente, a pacientes com crises de origem focal (Marino Jr 1993).

1.1.2 – Mecanismos da ictogênese: hiperexcitabilidade, hipersincronismo e redes reverberantes

Antes de iniciar esses comentários, faz-se necessária uma breve discussão quanto à terminologia usada no texto. Os termos epileptogênese e ictogênese têm sido usados em epileptologia de forma indiscriminada e muitas vezes conflitante. Ainda que discordando de alguns autores da área, optou-se por usar a palavra ictogênese para o processo neurofisiológico de geração de crises. A razão é a correlação do radical “ictus” ao conceito de espículas, intimamente correlacionadas com crises epiléticas, conforme mostram os diversos estudos eletrofisiológicos (Niedermeyer 1998; Sakamoto & Garzon 2000). O termo epileptogênese fica reservado para denotar o processo

responsável pela geração da condição epiléptica em um cérebro antes saudável. Há uma única exceção, que é o uso do termo composto “foco epileptogênico” e a razão é que ambos os sentidos mencionados são cabíveis. O substrato neural em questão é responsável pela geração de crises, mas também, muito provavelmente, pelo surgimento da condição epiléptica. Assim definidos os termos, acredita-se que a leitura do texto será mais clara e fluente.

Os mecanismos da ictogênese ainda não estão completamente elucidados e diversos estudos têm sido feitos no sentido de se avaliar o papel dos neurônios, da neurotransmissão e dos circuitos neurais, além de outros mecanismos não sinápticos, na origem, propagação e expressão das crises. A seguir, discutiremos aspectos celulares e de redes neurais das epilepsias.

O que tem sido mostrado é que a base da ictogênese reside principalmente no neurônio e na neurotransmissão, mas outros aspectos neurobiológicos relevantes também devem ser levados em conta. McNamara revê a bibliografia para integrar diversos fatores sinápticos e não sinápticos no mecanismo de iniciação de crises pelo aumento de K^+ em micro-domínios extracelulares próximos às células piramidais corticais e da região CA1 hipocampal (McNamara 1994). Ainda neste trabalho, o autor cita as hipóteses de Nadler (Nadler et al. 1980) e Sloviter (Sloviter 1991) para explicar a origem e manutenção da epilepsia de lobo-temporal. A morte das células musgosas levaria o circuito hipocampal à hiperexcitabilidade por deixar de modular células inibitórias, denominadas células cesto (teoria da célula em cesto dormente), e/ou por promover o brotamento de projeções das células granulares para sua própria árvore dendrítica na camada molecular do giro denteado (teoria do brotamento de fibras musgosas). Lothman e cols. usaram fatias para mostrar o aumento da excitação glutamatérgica ionotrópica mediada por receptores NMDA na região CA1 do

hipocampo de ratos com epilepsia de lobo temporal (ELT) induzida por pilocarpina (Lothman et al. 1995). Neste estudo não foram encontradas alterações nos parâmetros elétricos da membrana celular. Mangan e cols., seguindo os trabalhos de Lothman, usaram a mesma técnica e o mesmo modelo de ELT para demonstrar os mecanismos da diminuição de potenciais pós-sinápticos inibitórios (IPSP) na região CA1 do hipocampo (Mangan et al. 1995). Mais recentemente, Bernard e cols. descreveram uma canalopatia dendrítica adquirida em neurônios de ratos com modelos genéticos de ELT, acarretando hiperexcitabilidade neural (Bernard et al. 2004).

Em paralelo a essas idéias, as conexões entre substratos neurais em circuitos reverberantes parecem estar relacionadas com a propagação, manutenção e expressão motora da crise.

O fenótipo da crise parece estar diretamente relacionado com os substratos neurais ativados durante cada fase da expressão motora convulsiva. Eells e cols. usaram marcação de Fos para melhor localizar focos de ativação neural durante crises com diferentes fenótipos em modelos animais (Eells et al. 2004). Crises parciais, tipicamente relacionadas com mioclonias de membros anteriores e automatismos faciais, também denominadas crises de prosencéfalo, de fato ativam seletivamente estruturas prosencefálicas, tais como o córtex, o complexo amigdalóide-hipocampal e núcleos talâmicos. Crises generalizadas com comportamentos tônico-clônicos generalizados, denominadas crises de tronco encefálico, correlacionam-se com uma ativação bem mais abrangente, incluindo o próprio tronco e também prosencéfalo.

A integração destes substratos em circuitos como base para a expressão das crises também tem sido investigada. De Guzman e cols. (de Guzman et al. 2004) usaram cortes cirúrgicos em fatias para avaliar a participação do hipocampo e de áreas para-hipocampais na ictogênese, na sincronização e na manutenção da atividade ictal.

Imamura e cols. (Imamura et al. 2001a), utilizando transecções no hipocampo, demonstraram que conexões entre as porções dorsal e ventral desta estrutura são essenciais para o desenvolvimento completo da crise em modelo animal de crise por ácido caínico. Bertram e cols. (Bertram et al. 1998), utilizando registros profundos de EEG, sugerem que o tálamo exerce um papel sincronizador das estruturas envolvidas na ELT em animais com crises parciais espontâneas.

Em paralelo, Moraes e cols. (2005) isolaram circuitos prosencefálicos através de uma transecção pré-colicular completa em GEPR-9s (Genetic Epileptic Prone Rats) e observaram que, ainda que o prosencéfalo contribua para a atividade eletrográfica epileptiforme (mudança drástica na forma do EEG), o fenótipo comportamental das crises não se altera de forma significativa. Por fim, Moraes e cols. (2000) mostraram, através de registros eletrofisiológicos concomitantes a análise comportamental, que a incidência gradual do fenótipo de crises límbicas durante o abrasamento audiogênico de ratos Wistar audiogênicos (WAR) é acompanhada por um aumento da atividade epileptiforme no lobo temporal e por uma diminuição de manifestações comportamentais associadas a tronco encefálico (por exemplo, de crises tônico-clônicas generalizadas para automatismos faciais e elevação com quedas atônicas). Este último sugere que a modificação do comportamento convulsivo do modelo se deve a uma lenta transferência de atividade epileptiforme de uma rede reverberante para outra.

O que este conjunto de estudos tem mostrado é que a gênese das crises está profundamente correlacionada a uma característica de hiperexcitabilidade e hipsincronismo de atividade do tecido neural. Um nível originalmente fisiológico de atividade neural é capaz de desencadear atividade neural excessiva em porções hiperexcitáveis do tecido por prováveis mecanismos de retroalimentação positiva

(McNamara 1994). As conexões neurais, por sua vez, configuram redes reverberantes que são responsáveis por propagar esta atividade neural exacerbada para outras porções do encéfalo, sincronizando-as e sustentando-as (Dominguez et al. 2005; Pinto et al. 2005; Tolner et al. 2005). Mais ainda, os substratos envolvidos e a dinâmica das redes reverberantes por eles configuradas são a base para a expressão convulsiva da crise epilética nos diversos modelos animais.

Hiperexcitabilidade e hipersincronismo neural e redes reverberantes são, portanto, três aspectos fundamentais a serem levados em consideração na investigação da neurodinâmica da ictogênese. Os mecanismos de ação farmacológica do tratamento medicamentoso das Epilepsias corroboram essa noção. Como poderá ser observado, grande parte da discussão que se segue ao longo do texto se baseia nesses pilares.

I.1.3 – Limitações das Epilepsias

Não é por menos que os órgãos internacionais de combate às Epilepsias mencionam impedimentos diversos para condição de paciente com Epilepsia. De fato, a epilepsia limita o acesso do paciente ao trabalho (Borges et al. 2000), condução de veículos (Devereux 2002) e mesmo atividades esportivas (ILAE 1997). Segundo um estudo recente, estima-se que apenas os custos diretos (internação, medicamentos, etc.) do tratamento da Epilepsia são de U\$ 2372 a U\$ 8343 por paciente por ano, sendo que custos indiretos (desemprego, morte precoce, etc.) podem mais que dobrar estes valores (Cockerell & Sander 1998). A consequência final destes aspectos é uma acentuada diminuição da qualidade de vida dos portadores de epilepsia, principalmente a dos pacientes refratários ao tratamento farmacológico.

Um importante fator de comorbidade associado às Epilepsias é o fato de que crises são, a priori, imprevisíveis (Litt & Echauz 2002). Auras e sinais prodromicos

ocorrem em cerca de 50% dos pacientes que, por outro lado, não conseguem distinguir o momento exato que precede a crise (Rajna et al. 1997). Estando as crises associadas, em sua grande maioria, à perda de consciência e controle motor, os eventos epilépticos têm enorme potencial de causar danos materiais, lesões corporais e até mesmo a morte.

Outra razão advém da intratabilidade de algumas Epilepsias, oriunda tanto da refratariedade ao tratamento medicamentoso quanto da não adequação ao procedimento cirúrgico, impondo dificuldades no combate à doença. De fato, 30% dos pacientes não obtêm controle adequado das crises com os medicamentos (Hauser & Hesdorffer 1990) e desses, 50% não são elegíveis para cirurgia (Wiebe & Blume 2001). Um cálculo grosseiro, a partir de estatísticas otimistas, situa cerca de 400 mil pacientes nessa situação, só no Brasil. Portanto, há uma forte demanda para novas formas de combate às Epilepsias.

Por outro lado, metodologias capazes de detectar possíveis alterações neurodinâmicas que precedem crises teriam grande influência positiva na qualidade de vida de pacientes com Epilepsia, principalmente no caso de refratariedade (Van Quyen 2005). Um sistema de alarme para crises poderia beneficiar o paciente levando-o a se esquivar com antecedência de situações de risco potencial. Também permitiria a tomada de medidas de controle especiais não adequadas ao uso cotidiano, tais como fármacos anti-convulsivos mais potentes ou com efeitos colaterais mais severos. Outro benefício de tal sistema seria a sincronização de equipamentos de imageamento funcional para localização de foco epileptogênico em pacientes submetidos à monitoração pré-cirúrgica. A ativação de tais equipamentos e a injeção de marcadores metabólicos no momento preciso que antecede a crise tem o potencial de diminuir significativamente os custos relacionados à identificação de estruturas candidatas à remoção para tratamento das Epilepsias.

Desenvolvimentos nessas duas frentes, novas modalidades de tratamento e sistemas de predição de crises, têm sido feitos. As seções que se seguem discutem alguns dos principais aspectos da investigação relacionada.

I.1.4 – Estimulação elétrica do sistema nervoso como tratamento para as Epilepsias

Como alternativa ao tratamento medicamentoso no caso de refratariedade ou à cirurgia no caso de inadequabilidade ao procedimento, a estimulação elétrica de estruturas do SN, periférico ou central, vem obtendo interessantes resultados na diminuição do número de crises e da sua gravidade, na clínica médica e na pesquisa científica.

Um dos alvos para esta metodologia é o nervo vago. Essa técnica já vem sendo estudada há tempos, conta com uma vasta bibliografia publicada sobre o assunto e hoje já é aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) norte-americano como terapêutica para pacientes refratários. Revisões do tema podem ser encontradas em Binnie (Binnie 2000), Valencia (Valencia et al. 2001) e Ben-Menachem (Ben Menachem 2002). Contudo, um dos problemas de se usar o nervo vago é a repercussão na regulação cardiovascular por se estimular um nervo diretamente envolvido neste processo. A bibliografia conta com estudos acerca de implicações do tratamento na morte de pacientes, ainda que com resultados controversos (Annegers et al. 1998; Annegers et al. 2000; Lundgren et al. 1998).

Como alternativa, Fanselow e cols. propuseram a estimulação bilateral de outro nervo craniano: o ramo infra-orbitário do Trígêmeo, obtendo um percentual ainda maior na redução do número e da severidade das crises em ratos submetidos ao modelo por Pentilenotetrazol (PTZ), sem quaisquer tipo de conseqüências na regulação

cardiovascular (Fanselow et al. 2000). DeGiorgio e cols iniciaram estudos pilotos da estimulação elétrica do Trigêmeo em seres humanos (DeGiorgio et al. 2003).

Outra possibilidade é a utilização de estruturas centrais do sistema nervoso como alvo para a estimulação elétrica. Kinoshita e cols. avaliaram os efeitos da estimulação elétrica da superfície cortical em pacientes com epilepsia de lobo temporal em preparação para procedimento cirúrgico e comprovaram sua eficácia na supressão das crises (Kinoshita et al. 2004). Mirski e cols. usaram estimulação elétrica de alta frequência no tálamo anterior de ratos submetidos ao modelo de crises por PTZ e encontraram que alta frequência (100 Hz) é anti-convulsivante enquanto baixa frequência (8 Hz) é pró-convulsivante (Mirski et al. 1997).

Estes estudos demonstram que estimulação elétrica adequada do SN, periférica ou central, pode ser eficiente na supressão das crises. Pouco se sabe, por outro lado, qual o mecanismo subjacente à sua eficiência. Parte da comunidade científica acredita que a estimulação elétrica é capaz de deprimir o SN, aumentando sua capacidade de inibição (Di Lazzaro et al. 2004; Vonck et al. 2001; Weinstein S. 2001; Woodbury JW & Woodbury DM 1991). Ou seja, o aspecto de hiperexcitabilidade é o foco. Por outro lado, acredita-se que a estimulação elétrica é responsável por aumentar a desorganização da atividade no SN, atuando no aspecto de hipersincronismo (Hammond et al. 1992; Vonck et al. 2003).

Theodore e cols. escreveram uma revisão detalhada sobre a estimulação elétrica do SN como técnica de combate às crises (Theodore & Fisher 2004).

I.1.5 – Detecção e Predição de crises

“It’s the variability that really makes it so stressful. You never know when it is going to be chaos again and you’ll have one. Just because this morning is terrific doesn’t mean tonight is going to be terrific, either behavior-wise, medication-wise, or any other-wise. So it is the unpredictability of it that is really nerve-racking to live with.”

Este depoimento (Murray 1993) revela o quão debilitante é a imprevisibilidade das crises para um paciente com Epilepsia. Por muito tempo, crises epilépticas foram consideradas fenômenos abruptos, sem qualquer tipo de precursor. Por outro lado, estudos mostram conclusivamente que o início das alterações cerebrais que precedem uma crise podem começar a ocorrer minutos ou até horas antes (Baumgartner et al. 1998; Litt et al. 2001; Novak et al. 1999; Weinand et al. 1997). Sinais prodrômicos, como a aura de alguns tipos de epilepsia, são um indicativo clínico deste fato e corroboram para esta noção.

Ficam definidos, portanto, quatro períodos distintos da atividade encefálica revelada pelo EEG: o período inter-ictal de atividade basal, o período ictal durante a crise, o período pós-ictal após o término da crise comportamental, e o período pré-ictal, de neurodinâmica alterada, possivelmente detectável e que sempre antecede o período ictal.

Existem técnicas matemático-computacionais capazes de extrair do EEG parâmetros descritivos da neurodinâmica subjacente. Estes valores podem se associar a estados mentais ou condições fisiológica / patológicas. Tais técnicas podem ser, de forma rudimentar, divididas em: 1) técnicas lineares no domínio do tempo e da frequência; 2) técnicas não lineares (p.ex. caos) e; 3) técnicas de inteligência artificial (Litt & Echauz 2002).

O uso de técnicas lineares no domínio do tempo, como amplitude, número de espículas e medidas estatísticas têm se mostrado eficazes em detectar, mais do que propriamente em antecipar, a atividade ictal. Entretanto, Litts e cols., utilizando o cálculo de energia acumulada, conseguiram antecipar crises em seres humanos em até 50 minutos (Litt et al. 2001).

Técnicas lineares no domínio da frequência, tais como a FFT ou Wavelets, mostraram, também, maior capacidade em detectar do que em antecipar as crises (Osorio et al. 1998).

A descrição e análise do EEG segundo um sinal proveniente de um sistema caótico (Casdagli et al. 1997; Jung et al. 2003) tem fornecido as técnicas mais eficazes de antecipação de crises. Alguns valores de interesse neste caso são a complexidade da dinâmica do sinal, avaliada por variáveis como a dimensão fractal ou dimensão de correlação, ou seu padrão de convergência / divergência avaliado pelo maior expoente de Lyapunov. À medida que o indivíduo se aproxima da crise, o nível de complexidade e a divergência do sinal diminuem (Iasemidis et al. 2001).

LeVan Quyen e cols. usaram uma técnica denominada similaridade dinâmica para antecipar as crises (Van Quyen et al. 1999). Calculando os atrasos entre bordas de subidas que cruzam a linha de média zero e utilizando n destes valores consecutivos, monta-se uma trajetória no espaço n -dimensional que carrega informações da dinâmica cerebral. Esta metodologia de reconstrução geométrica da neurodinâmica é denominada método dos atrasos. A trajetória de um segmento de referência do EEG é, então, comparada com trechos do EEG pré-ictal e a similaridade entre eles é calculada. Quando a similaridade se torna inferior a um valor mínimo (estatisticamente pré-determinado) e se mantém abaixo durante um determinado período de tempo, é dito que uma crise foi antecipada.

Utilizando registros corticais e profundos de pacientes em preparação para neurocirurgia, esta técnica de similaridade dinâmica foi capaz de antecipar crises com até vinte minutos de antecedência. O mesmo autor aplicou o processamento matemático a registros de EEG de escalpo com resultados semelhantes, no intuito de ampliar a utilização da técnica para ambulatórios médicos (Van Quyen et al. 2001b).

Um dos aspectos interessantes de se usar técnicas de análise não linear sobre o EEG é a capacidade de se fazer reconstruções geométricas da dinâmica cerebral, tratando o cérebro como um sistema caótico (Savit et al. 2001; Van Quyen et al. 2003; Van Quyen et al. 2001a). Ou seja, é possível fazer inferências de como o cérebro funciona, como se dá a atividade isolada ou acoplada de cada um de seus “osciladores”. Ainda que não seja possível fazer inferência diretamente da localização destes osciladores ou quais os circuitos neurais subjacentes a cada etapa do período interictal, pré-ictal ou ictal, pode-se concluir quanto a uma maior ou menor organização do sistema, ou a quantidade de graus de liberdade. Nesse sentido, Van Quyen e cols. (Van Quyen et al. 2001a) revisam seus trabalhos, enumerando as principais conclusões das alterações neurodinâmicas do EEG pré-ictal, traçando uma cartografia dos métodos de detecção / antecipação de crises. Ainda este mesmo autor, em um outro artigo (Van Quyen et al. 2003), revisa resultados de seus trabalhos para traçar conclusões e perspectivas a respeito dos mecanismos da ictogênese.

Sistemas inteligentes (p.e. redes neurais artificiais ou lógica nebulosa) também têm mostrado, ainda que de forma limitada, certa capacidade de reconhecer padrões relativos ao período pré-ictal (Chiu et al. 2006; Iasemidis 2003; Osorio et al. 1998). No entanto, essas técnicas, por funcionarem como uma “caixa preta”, em que as regras de reconhecimento de padrões não podem ser repassadas ao criador do sistema, trazem pouca luz sobre o fenômeno biológico em estudo.

A figura 1, extraída de Van Quyen, 2001a, mostra uma cartografia das diversas metodologias usadas para predição de crises, localizadas no tempo segundo sua capacidade preditiva.

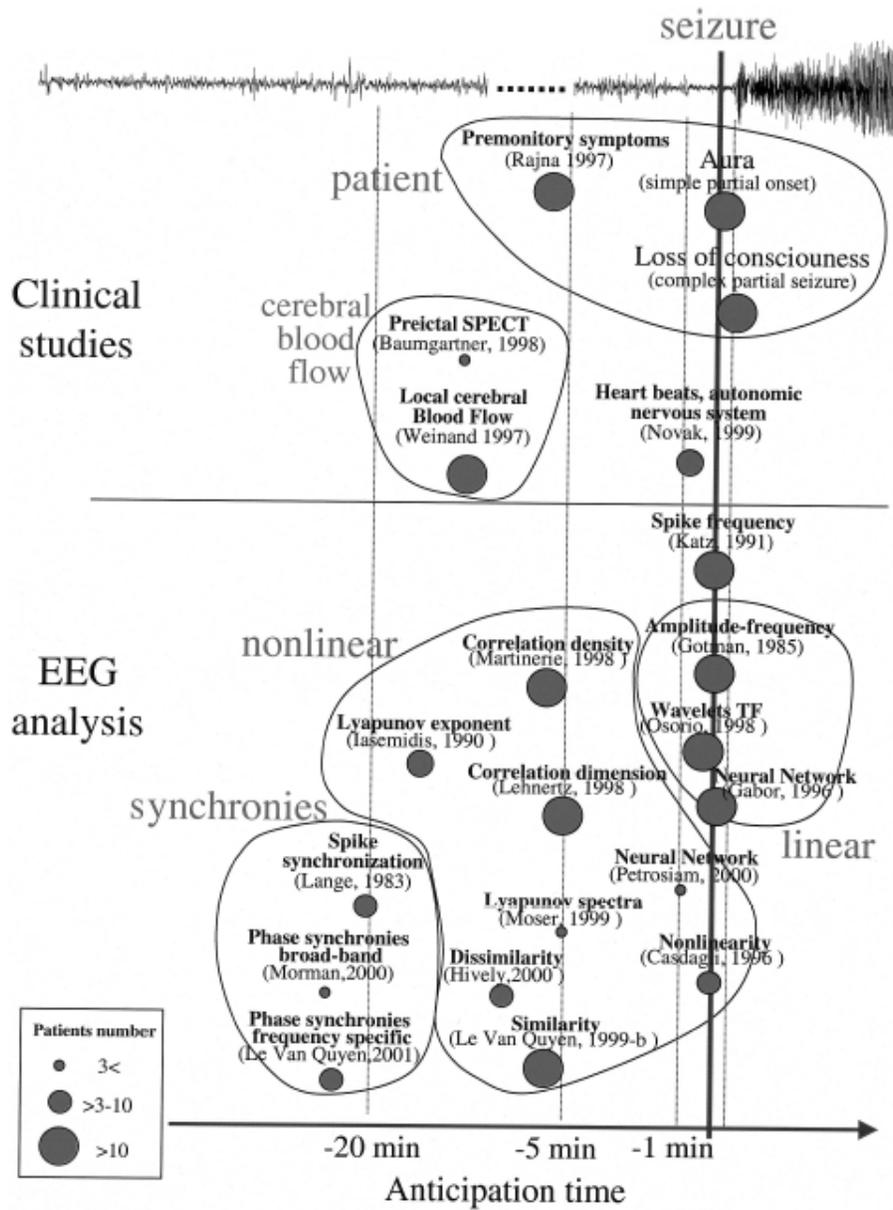


Figura 1 - Cartografia das metodologias de predição de crises segundo a capacidade de predição.

Extraído de Van Quyen, 2001a.

I.1.6 – Caracterização e modulação da neurodinâmica da ictogênese

Para fazer a caracterização da neurodinâmica da ictogênese, a principal técnica usada tem sido a eletroencefalografia (EEG). Nada mais é que o registro contínuo da atividade elétrica integrada dos neurônios do encéfalo. As alterações dos valores de potencial elétrico, observadas no EEG, representam variações dos potenciais eletroquímicos percebidos pelos eletrodos, potenciais estes oriundos de correntes iônicas em células nervosas, que se propagam até a superfície cortical (Lopes da Silva & Van Rotterdam 1993).

Como o EEG clássico, realizado com eletrodos de escalpo, integra toda a atividade encefálica, não é possível localizar o gerador de determinado potencial observado. Essa questão é denominada Problema Inverso do EEG, uma variação para neurofisiologia do problema originalmente proposto por Helmholtz (Helmholtz 1853). Basicamente, propõe que, dado uma ou mais observações na superfície de um volume condutor (registros de EEG de escalpo), existem infinitas soluções para o problema dos geradores responsáveis por estes sinais (substratos neurais ativados).

Uma solução para o problema de se localizar substratos neurais com maior precisão espacial são as técnicas de imagem não invasivas, como a ressonância magnética funcional (fMRI) ou a tomografia por emissão de pósitrons (PET). A maior limitação destas técnicas, entretanto, é sua inerente má resolução temporal que deixa escapar uma série de eventos fisiológicos, com duração na ordem de mili-segundos.

A forma de contornar o problema, usada no contexto desta tese, é posicionar os eletrodos dentro do volume condutor da cabeça, no registro denominado EEG intracefálico, ou IC-EEG, considerado o padrão-ouro da eletroencefalografia. Quando se utilizam eletrodos bipolares, pode-se provar que atividade neural de substratos a uma

distância poucas vezes maior que a separação dos eletrodos têm influência desprezível na morfologia do registro intracefálico (Moraes et al. 2005b).

Há diversas formas para se interferir na neurodinâmica de um determinado processo neurofisiológico, sendo o mais comum, através da intervenção farmacológica. No entanto, exatamente devido a aspectos farmacocinéticos, drogas agem de maneira prolongada no contexto de uma crise epiléptica, inviabilizando uma ação temporal localizada. Por outro lado, a estimulação elétrica tem alta resolução temporal e pode modular de forma mais específica e com maior flexibilidade a neurodinâmica em estudo. De fato, a técnica tem sido largamente usada, tanto no contexto da investigação científica, como no da prática clínica.

I.1.7 – Modelos animais em epileptologia

Por motivos éticos óbvios, a pesquisa em epileptologia é, em sua maior parte, realizada em modelos animais. Ao longo do tempo, foi aparecendo na bibliografia uma série de manobras farmacológicas, genéticas, cirúrgicas e elétricas, desenvolvidas para gerar modelos que mimetizam aspectos específicos das diversas crises epilépticas e das Epilepsias (Sanabria & Cavalheiro 2000). Revisões completas dos modelos animais de crise e Epilepsias podem ser encontradas em (Buchhalter 1993; Fisher 1989; Loscher 1997; Loscher 2002). Descrevemos adiante dois destes modelos que são de particular importância para este trabalho.

O Pentilenotetrazol (PTZ), antagonista GABA-érgico central, quando injetado intra-peritônio (i.p.) em ratos, em doses que variam de 40 a 120 mg/kg, configura um dos modelos mais comuns de crise usada para o teste de novas drogas anti-convulsivas (Velisek et al. 1992). O rato pode desenvolver dois tipos de crise: mínima e máxima, conforme a dose administrada. As crises mínimas, induzidas por doses até 40 mg/kg,

têm manifestações mais sutis, como espasmos, automatismos faciais, mastigação e clonias 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 60 mg/kg, têm manifestação motora completa na forma de convulsões tônico-clônicas generalizadas (Velisek et al. 1992). São sempre precedidas por crises mínimas e envolvem estruturas do prosencéfalo e do tronco encefálico simultaneamente (Eells et al. 2004), caracterizando, portanto, o PTZ como um modelo de crise generalizada.

O PTZ pode ser injetado, também de forma sub-cutânea (s.c.), diminuindo a taxa de absorção da droga. Isso é particularmente interessante quando é importante envolver gradualmente os diversos substratos da crise na geração dos comportamentos convulsivos, desde a crise mínima até a crise máxima. A forma mais controlada de o fazer é a infusão lenta e gradual intravenosa (i.v.), usando bombas de infusão. Caso a infusão persista por tempo suficiente, o rato desenvolve crises máximas sempre precedidas de crises mínimas.

A pilocarpina (PILO) é um agonista colinérgico que age em receptor muscarínico, aumentando a neurotransmissão excitatória colinérgica que, quando injetada i.p. em doses de 320 mg/kg, desenvolve um quadro de crises límbicas (Persinger et al. 1988). Em doses altas (280 - 360 mg/kg) ocorrem crises límbicas ininterruptas (Clifford et al. 1987), o que é denominado clinicamente de status epilepticus (SE). Durante esse período, o rato desenvolve um quadro repetitivo de automatismos faciais, mioclonia de membros anteriores, podendo culminar em elevação e queda (Turski et al. 1987; Turski et al. 1983). O SE é caso de emergência clínica e, tanto em seres humanos quanto no modelo animal, leva a extenso dano no tecido

cerebral, acarreta em grave déficit cognitivo e pode causar a morte do indivíduo caso nada seja feito (Garzon et al. 1998). Para retirar o animal do SE é feita uma aplicação de benzodiazepínico, p.ex. Diazepam (DZP). O animal injetado com PILO e mantido em SE por pelo menos 90 minutos, interrompendo o SE com DZP, desenvolve crises límbicas recorrentes e espontâneas que começam a ocorrer por volta do décimo quinto dia após o experimento (Lemos & Cavalheiro 1995). Lesões no hipocampo destes animais, decorrentes da hiper-estimulação colinérgica com PILO (Bernardo & Prince 1981), resultam em reorganização da rede neural hipocampal (Cavalheiro 1995), promovendo brotamento de fibras musgosas das células granulares (Mello et al. 1992; Mello et al. 1993; Parent et al. 1997) em torno de 15 dias após o SE.

O modelo de pilocarpina é particularmente interessante pelo fato de mimetizar a epilepsia de lobo temporal (ELT), com aparecimento recorrente e espontâneo de crises e não simplesmente um modelo de crise isolada induzida agudamente (Cavalheiro et al. 1991; Gloor 1991). Outro ponto a favor do modelo é a alteração morfológica e eletrofisiológica no circuito hipocampal, também observada na ELT humana (Bernardo & Prince 1981; Leite et al. 1990; Sanabria 1999).

1.2 – Objetivos

Esta tese teve como principal objetivo a avaliação da dinâmica neural de modelos animais de epilepsia e da influência da estimulação elétrica nesta dinâmica. Através de registros eletrofisiológicos e das correspondentes análises matemático-computacionais, objetivou-se traçar um panorama geral da neurodinâmica da ictogênese, avaliando os aspectos de hiperexcitabilidade, hipersincronismo e redes reverberantes em modelos animais de Epilepsia. A partir de um modelo proposto de mecanismo de ictogênese, buscou-se interferir nessa dinâmica via estimulação elétrica de modo a suprimir crises. Por fim, com vistas nesse modelo, foi elaborada uma metodologia, orientada fisiologicamente, para extração de parâmetros medidores da dinâmica neural que possam predizer o aparecimento das crises.

Mais especificamente, os objetivos desta tese foram:

- Projetar e implementar um sistema de registro de EEG para animais em livre movimento.
- Projetar e implementar, em conjunto com o sistema de registro, um aparato para estimulação elétrica de núcleos cerebrais, totalmente controlado por computador.
- Usar a eletrofisiologia para avaliar os aspectos temporais da hiperexcitabilidade, hipersincronismo e redes reverberantes na ictogênese e utilizar parâmetros de análise dessas características como preditores de crise.
- Baseado no conceito de redes reverberantes, usar estimulação elétrica reverberante para potenciar crises e anti-reverberante para suprimi-las.
- Usar potenciais evocados para avaliar a influência do processo de ictogênese no circuito amígdala-hipocampo e, assim, obter um parâmetro para predição de crises.

1.3 – Metodologia

1.3.1- Indução dos modelos animais de epilepsia

Para a indução do modelo de PTZ nos experimentos desta tese, foram usadas as vias de administração s.c. e i.v.. Foi importante induzir o modelo dessa forma para que fosse possível avaliar a eletrofisiologia da ictogênese e o impacto dos tratamentos utilizados, nos diversos momentos da crise. Assim, foi possível avaliar a participação de cada circuito ictogênico nos parâmetros eletrofisiológicos analisados e a influência dos tratamentos em cada circuito e em seus correlatos comportamentais separadamente.

Foi usada uma única dose s.c. de PTZ (Sigma, St. Louis, MO, EUA) de 60 mg/kg (10 mg/ml salina), por resultar, na maioria dos casos, na geração de crises máximas precedidas de crises mínimas. No caso de infusão i.v. de PTZ, esta foi realizada na taxa de 10 mg/min (10 mg/ml salina) através de uma cânula em uma das veias caudais. Para promover vasodilatação e facilitar a canulação, o animal foi previamente aquecido durante 5 minutos em uma câmara quente (~45 °C) feita de madeira, com uma lâmpada comum de 100 W / 127 V como aquecedor. Com as veias caudais facilmente visualizáveis, foi feita a assepsia da cauda com álcool 70% e o catéter (24GA x 0,75” – BD Angiocath™ - Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas LTDA., Juiz de Fora) foi introduzido e fixado com esparadrapo. Foi usada heparina para evitar entupimento por coagulação do catéter. No momento de iniciar a infusão, o catéter foi conectado, por meio de uma cânula, a uma seringa de 5 ml, posicionado em uma bomba de infusão desenvolvida em nosso laboratório.

Para a indução do modelo de pilocarpina, iniciou-se injetando o inibidor colinérgico periférico (não atravessa a barreira hemato-encefálica) butilescopolamina (Buscopan®) na dose de 1 mg/kg para a proteção contra efeitos periféricos da pilocarpina. Trinta minutos após, injetou-se pilocarpina i.p. na dose de 320 mg/kg para a

indução de status epilepticus (SE). Noventa minutos após entrada em SE, injetou-se Diazepam (20 mg/kg) para interrupção de SE. Ratos que não desenvolverem SE 30 minutos após injeção de pilocarpina receberam mais 40% da dose. Animais que não entraram em SE após dose adicional foram rejeitados do grupo. Foi necessário um cuidado intenso (até 48 h depois) para sobrevivência do grupo experimental, principalmente através de re-hidratação cuidadosa dos animais que passaram a sofrer de afagia e adipsia severas. Administraram-se 0,5 ml Pedyalite com leite condensado a cada duas horas e 2 ml de salina via i.p. logo após modelo, antes do fim do expediente e logo após início do expediente do dia seguinte. A confirmação da instalação do modelo foi feita através de monitoração dos ratos por vídeo, 15 dias após a indução do modelo, durante 6 h, no horário de 12:00 às 18:00 h. Só foram usados os animais que apresentaram crises nítidas durante esse período.

I.3.2- Registro e estimulação

Para a investigação da neurodinâmica da ictogênese e os possíveis preditores de crise, foi realizado o registro de EEG de ratos em livre movimento, através do sistema desenvolvido no escopo desta tese e descrito no próximo capítulo. Nos experimentos realizados aqui, foram usados registros monopolares corticais, com sensibilidade à atividade de córtex, e registros bipolares profundos, com abrangência mais restrita ao local de posicionamento dos eletrodos. Os parâmetros do registro variaram e, portanto, serão descritos no contexto de cada protocolo experimental.

Para a modulação dessa neurodinâmica, foi usada a estimulação elétrica de estruturas do SNC, principalmente a amígdala. Para a geração dos pulsos nos padrões temporais necessários para os objetivos dos experimentos, foi usado um estimulador

elétrico também desenvolvido no escopo deste trabalho. Os parâmetros usados em cada caso estão descritos nas seções de metodologia de cada protocolo experimental.

I.3.3- Cirurgia de implante de eletrodos crônicos

Para a obtenção de registros de EEG contínuos ou para estimulação elétrica de estruturas do SNC, todos os ratos usados nos experimentos desta tese foram submetidos a um procedimento para implante e fixação de eletrodos.

O procedimento começa com a anestesia do animal com Thiopental 40 mg/kg i.p. Administra-se, também, sulfato de atropina i.p. 4,0 mg/kg, para minimizar os efeitos anestésicos de hipotermia e secreção, e pentabiótico Baytril® na dose 5,0 mg/kg, como medida profilática contra infecções. Após tricotomia e as devidas medidas de assepsia, o animal é posicionado em aparelho estereotáxico modelo Stoelting e injetado com Lidocaína, anestésico local, vasoconstritor, que também serve de emulsificador do tecido subcutâneo. Após um corte oval na pele da cabeça (figura 2 painel A), este material é retirado até a exposição direta do crânio que deve ser cuidadosamente limpo (figura 2 painel B). Utilizando-se broca, perfura-se o crânio para o posicionamento de micro-parafusos cirúrgicos que servirão de eletrodos corticais, ou para que eletrodos profundos penetrem a massa encefálica. Os eletrodos são soldados a um conector RJ-11 de 6 pinos (figura 2 painel C) e este, por sua vez, é fixado ao crânio do rato utilizando acrílico autopolimerizante, comum em consultórios odontológicos (figura 3).



Figura 2 - Procedimento cirúrgico de implante de eletrodos crônicos.



Figura 3 - Aspecto final da cirurgia.

A maioria dos protocolos desta tese utilizou registros superficiais de EEG. Para tal, foram posicionados dois micro-parafusos cirúrgicos (comprimento 4,7 mm, diâmetro 1,17 mm, Fine Science Tools, Inc., North Vancouver, Canada) na porção medial das linhas medio-lateral e antero-posterior do córtex, para uma localização anatômica do lobo parietal. Outro parafuso é fixado no osso nasal esquerdo para servir de referência.

Para registros profundos, foram usados eletrodos bipolares de aço inoxidável recobertos de teflon (# 7914, A-M Systems, Califórnia, EUA), conformados mecanicamente em par trançado (figura 4). A posição precisa destes eletrodos é dada com o uso de um atlas neuroanatômico (Paxinos & Watson 1998) e alcançada com o

auxílio dos eixos de coordenadas do aparelho estereotáxico. Para melhor fixação dos eletrodos profundos, utilizou-se cimento de zinco, também comum em consultórios odontológicos.

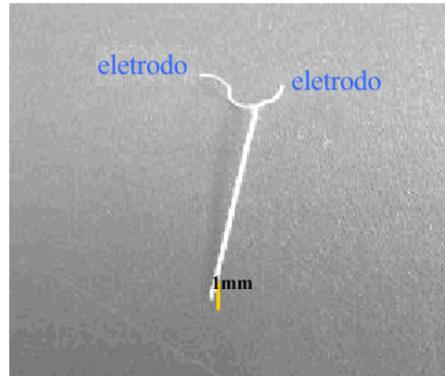


Figura 4 - Eletrodo para registros bipolares profundos.

I.3.4- Análise do EEG

Para caracterizar os aspectos de hiperexcitabilidade e hipersincronismo neuronal e de redes reverberantes nos modelos animais usados, visando detecção e predição de crises, foram usadas diversas ferramentas matemático-computacionais de análise de séries temporais, além da inspeção visual dos registros de EEG.

Todas as análises foram implementadas através de rotinas na forma de *scripts* do Matlab 7.1®. O grau de desenvolvimento variou em cada caso, desde o uso direto de *toolboxes* disponíveis no programa ou gratuitamente na Internet, até o desenvolvimento completo dos algoritmos. Em todos os casos, foi necessário desenvolver a rotina para extração de janelas temporais do sinal, com possibilidade de ajuste de duração da janela (em segundos) e o tamanho da sobreposição (em segundos). Os fundamentos matemáticos inerentes de cada análise, usados para o desenvolvimento dos algoritmos, foram transferidas para apêndice A ao final desta tese, visando clareza e fluidez do

texto. As rotinas estão comentadas e documentadas em um manual disponível no nosso laboratório.

Energia do sinal e espectro de potência

O traçado do EEG privilegia atividade encefálica aumentada e hipersincrônica, este último devido à somação espaço-temporal de atividades isoladas. Estes aspectos são refletidos pelo aumento da amplitude no registro. Para caracterizar esse aumento, foram usados cálculos de energia (energia média, energia acumulada ao longo do tempo e incrementos de energia acumulada) e o espectro de potência. O espectro de potência foi feito com o sentido de separar em bandas de frequência as contribuições individuais para a energia total do sinal.

O algoritmo para o cálculo dos parâmetros de energia foi todo implementado no escopo desta tese, resultando em três *scripts*: energia média, energia acumulada e incrementos de energia acumulada. Utilizaram-se janelas temporais de 3 s no cálculo da energia média, sem sobreposição e 30 s para os outros parâmetros, devido a características do algoritmo usado na bibliografia corrente (vide apêndice). Para validação estatística, calcularam-se média e desvio padrão dos níveis basais (referência) de energia, com o rato em vigília de repouso. Mudanças significativas dos valores de energia foram definidas como aquelas que extrapolam o limite de três desvios padrões da referência, para mais ou para menos, de maneira sustentada no tempo.

O espectro de potência do sinal foi calculado através da rotina “spectrogram.m” do Matlab®, que calcula a potência do sinal em cada banda de energia ao longo do tempo através de um algoritmo de FFT. Os parâmetros de entrada foram 1024 amostras para o tamanho da janela de FFT, algoritmo de *hamming* para janelamento do sinal, sem sobreposição e a frequência de amostragem do sinal foi sempre informada. A saída gráfica da rotina foi usada para ilustração dos resultados e a numérica para validação

estatística. Nesse caso, foram calculados média e desvio padrão da potência de cada banda do espectro do trecho de referência, para então serem comparadas com os valores de teste (trechos de EEG dos períodos pré-ictal e ictal). Foram considerados valores de potência estatisticamente significativos aqueles maiores ou menores do que três desvios padrão para mais ou para menos da média de referência.

Auto-correlação e correlação cruzada

A curva de correlação entre sinais reflete o quanto que o formato de um sinal é similar ao de outro quando comprados em todas justaposições temporais possíveis. A auto-correlação compara um sinal com ele mesmo, tendo, portanto, o potencial de indicar padrões que se repetem dentro de um período considerado. A correlação-cruzada compara dois sinais distintos, e pode sugerir possíveis causadores comuns entre sinais. Um aspecto importante no cálculo das correlações é a localização temporal do pico da correlação. Sua posição indica qual justaposição temporal resulta em um maior valor de semelhança entre os sinais, tendo o potencial de revelar aspectos importantes da dinâmica de geração dos sinais. Por exemplo, um pico de correlação-cruzada entre registros de diferentes substratos, que não esteja em zero pode indicar a seqüência temporal de transmissão de um determinado evento eletrofisiológico.

Para o cálculo das correlações, foi usada a rotina “xcorr.m” do Matlab®; usando a mesma variável referente ao trecho de EEG a ser testado como os dois parâmetros de entrada da rotina para o cálculo da auto-correlação e; variáveis referentes a trechos de EEG oriundo de diferentes eletrodos no caso da correlação cruzada. A curva resultante foi integrada para a obtenção de apenas um valor por janela temporal. A duração escolhida para a janela foi de 3 s, sem sobreposição, de forma a se obter trechos de EEG estacionários (Lopes da Silva 1993b). O atraso da correlação foi determinado

como o índice do ponto da curva de correlação com o maior valor absoluto, corrigido para tempo através da frequência de amostragem (vide apêndice para mais detalhes).

Novamente, valores estatisticamente significativos de correlação são aqueles que se desviaram da faixa delimitada por três desvios padrões acima ou abaixo da média de referência.

Dimensão fractal

Para caracterizar a complexidade do sinal, supostamente reflexo do sistema que a gera, utilizou-se a dimensão fractal. O racional por detrás dessa idéia é o de que o cérebro, do ponto de vista de um sistema dinâmico, perde graus de liberdade durante as crises em relação ao seu funcionamento basal, devido a um acoplamento exacerbado entre circuitos e substratos neurais. Essa diminuição da independência do funcionamento de estruturas no encéfalo poderia afetar os valores de dimensão fractal.

Para isso, foi usada a rotina “boxcount.m”, disponível gratuitamente na Internet (Frederic Moisy, Universität Stuttgart, Alemanha), que implementa o algoritmo *boxcount* para estimação da dimensão fractal de sinais (denominada também de “dimensão boxcount”). Foram usadas janelas temporais de 3 s, sem sobreposição, e a validação estatística segue os mesmos princípios descritos nas análises anteriores.

Similaridade dinâmica

A similaridade dinâmica foi usada principalmente no contexto de candidata a parâmetro preditor de crises. As inferências neurofisiológicas dos resultados obtidos a partir dessa metodologia devem ser feitas com mais cuidado, uma vez que o raciocínio não é direto. Basicamente, a similaridade dinâmica compara o quanto um determinado trecho de EEG se parece com outro, segundo uma representação geométrica do sinal dada por um processo de imersão, considerada representativa da dinâmica do sistema, segundo teorias de caos (vide apêndice para mais detalhes).

Todo o algoritmo de similaridade dinâmica foi implementado no escopo desta tese. Apenas a função “svd.m” do Matlab®, para o cálculo da decomposição por valor singular, foi usada na implementação da rotina. Todos os passos seguiram rigorosamente a descrição da bibliografia, conforme consta em Van Quyen, 1999.

Em linhas gerais, foi feita uma imersão em um espaço 16 dimensional de um trecho de 250 s referente a um estado de vigília de repouso do animal, para reconstrução geométrica da dinâmica de referência. Para o cálculo da similaridade, esta dinâmica de referência foi comparada com as reconstruções geométricas de trechos de 25 s EEG de teste, sem sobreposição. Índices de similaridade do EEG de teste menores que três desvios padrões abaixo da média de referência foram considerados significativos.

Definição do início eletrográfico

O início das crises foi considerado a partir do seu medidor eletrofisiológico, denominado início eletrográfico, que define o instante de tempo no registro de EEG que separa atividade pré-ictal de ictal. O critério usado representa um padrão universalmente adotado entre eletroencefalografistas. Segundo a definição, o padrão de atividade ictal corresponde à prolongação e sustentação da atividade ictal, com espículas sucessivas e agrupadas (Niedermeyer 1998). Uma espícula é um padrão transiente, de forma pontiaguda, claramente distinguível da atividade de fundo, com duração menor do que 70 ms e de amplitude variável (IFSENC 1974).

A definição objetiva do início eletrográfico foi importante para fazer a avaliação quantitativa das metodologias mencionadas, em termos de suas capacidades de detecção / antecipação de crises. O padrão ictal está fortemente correlacionado ao envolvimento disfuncional do encéfalo que culmina em crises epiléticas (Niedermeyer 1998), sendo detectável pela inspeção do EEG. Portanto, metodologias eficientes de detecção /

predição de crises devem, respectivamente, antecipar ou coincidir com este instante de tempo, para que façam sentido neurofisiológico e tenham aplicabilidade clínica.

II – Sistema de registro e estimulação

“Le rêve, bordel!”

Para realizar a investigação proposta nos objetivos desta tese, a principal técnica usada foi a eletrofisiologia. Para o estudo da neurodinâmica da ictogênese é necessário se obter registros da atividade elétrica encefálica de forma robusta e confiável. A forma escolhida para interferir nessa dinâmica necessita de um estimulador elétrico de tecido cerebral cujos parâmetros possam ser facilmente programados, preferencialmente via software.

A opção natural seria a aquisição e uso de equipamentos comerciais “padrão ouro” em pesquisa científica. Entretanto, optou-se por projetar, desenvolver e construir tanto o sistema de registro quanto o estimulador elétrico, hardware e software, partindo apenas de componentes eletro-eletrônicos comuns e plataformas de programação com suas bibliotecas. Tal empreitada é bastante laboriosa, tomando valiosos recursos de tempo em um doutorado. Portanto, as razões da iniciativa devem ser mencionadas.

A primeira delas foi o aspecto do custo. A aquisição e manutenção dos equipamentos comerciais, vendidos por empresas situadas principalmente na Europa e na América do Norte, são bastante onerosos. Isso se deve não só ao seu alto custo intrínseco e aos custos de transporte e desembaraços legais inerentes ao processo de importação, mas também (e talvez principalmente) por se tratar de um mercado de baixa competitividade. Soluções tecnológicas nacionais têm, portanto, o potencial de facilitar o aparelhamento de laboratórios em território brasileiro. De fato, por ser montado quase inteiramente em território nacional e com um mínimo de peças importadas, por contar com uma estrutura simplificada e subsidiada e, por fim, dispensar lucro e todos os gastos administrativos e mercadológicos, o custo final do equipamento ficou substancialmente reduzido. Assim sendo, foi possível equipar o laboratório com múltiplos “*set-ups*” da tecnologia a um custo bem baixo.

Outro aspecto foi o da adequabilidade. Todo o sistema foi desenvolvido visando especificamente os experimentos pertinentes a esta tese de doutorado, portanto desenhado sob medida. De fato, os experimentos demandavam equipamentos com características técnicas específicas, que serão comentadas mais adiante, nem sempre disponíveis nos sistemas comerciais.

Por outro lado, cuidados especiais foram tomados de forma a ser possível privilegiar adequabilidade sem detrimento da aplicabilidade. Ou seja, os mesmos equipamentos puderam ser usados em uma série de experimentos diversos em nosso laboratório e no de parceiros científicos. A base da aplicabilidade do sistema é uma arquitetura escalonável e não proprietária. Esse último aspecto permite que toda e cada parte do sistema se interconecte a componentes da indústria de instrumentação médica estabelecida, tais como transdutores e conversores analógico-digitais.

Por fim, mas não menos importante, o profundo conhecimento do sistema permitiu uma manipulação mais adequada às necessidades experimentais, compreendendo mais profundamente os resultados, inclusive dispensando ajuda externa para manutenção e desenvolvimento.

Diversos experimentos foram conduzidos com essa tecnologia, resultando em dados científicos de qualidade. Prova disso são as dissertações de mestrado e teses de doutorado defendidas que usaram partes do sistema. Além das publicações de cunho metodológico em fase final de revisão (até a data de fechamento deste texto) oriundas do desenvolvimento do sistema, há outras que já renderam co-autorias em periódicos de alto impacto, devido a parcerias tecnológico-científicas com colaboradores do laboratório. Em particular, cita-se o desenvolvimento, a partir dessa tecnologia, de um aparato para medição de força de agarre em camundongos *knock-down* para o

transportados vesicular de acetilcolina, publicado na renomada revista *Neuron* (Prado et al. 2006).

Está disponível em nosso laboratório, um documento com a descrição detalhada de cada uma das placas projetadas e um manual de instruções para a construção de qualquer parte do sistema.

II.1 – Sistema de registro

II.1.1 – Considerações iniciais

O sistema de registro desenvolvido precisou atender a uma série de pré-requisitos. Para facilitar leitura e compreensão, eles estão situados no contexto de suas respectivas soluções. Em linhas gerais, era necessário implementar um sistema de registro de alto desempenho para medição de múltiplas e simultâneas variáveis fisiológicas em animais acordados e em livre movimento, que fosse de fácil instalação e configuração por leigos e que permitisse uma ampla gama de análises matemático-computacionais.

O projeto pode ser sintetizado no diagrama de blocos da figura 5. As cinco partes principais estão demonstradas: 1) pré-amplificador (*headstage*) posicionado na cabeça do animal; 2) módulos condicionadores de sinal para diversas medições fisiológicas; 3) interfaces para integração e roteamento dos sinais e gerenciamento de energia; 4) conversor analógico-digital para digitalização dos sinais analógicos e; 5) software para registro e análise das séries temporais adquiridas.

Ainda nessa figura estão indicados os blocos para implementar a estimulação elétrica: 1) software de controle do estimulador; 2) sistema de interface PC-estimulador e; 3) estimulador per si. Devido a sua maior complexidade, a implementação do sistema de estimulação será discutida em detalhes na seção II.2.

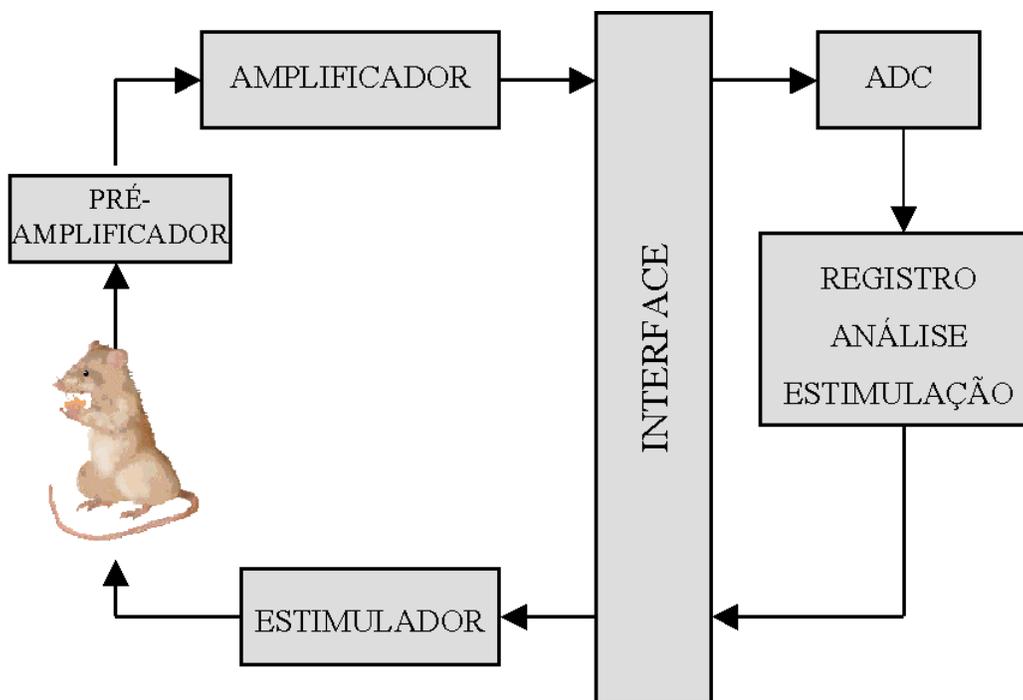


Figura 5 - Diagrama de blocos do sistema de registro e do estimulador elétrico.

II.1.2 – Pré-amplificador ou *headstage*

Para o estudo da neurodinâmica da ictogênese da forma mais natural possível, é necessário usar ratos acordados e em livre movimento, mesmo durante as crises convulsivas. Se nenhum cuidado especial for tomado, a livre movimentação do animal acarreta artefatos devido à deformação do cabo que conecta os implantes ao resto do sistema, com potencial de inviabilizar a análise do EEG.

A forma padrão para se resolver este problema é o uso de um estágio de condicionamento de sinais posicionado na cabeça do animal, denominado *head-stage* ou pré-amplificador (Brakel et al. 1971; Moraes et al. 2000; Sia et al. 1971). Basicamente, a idéia é construir amplificadores ou *source followers*, constituídos de transistores do tipo FET para aumento da impedância de entrada em um circuito miniaturizado que o animal possa transportar.

Ainda que resultassem em registros livres de artefato de movimento, todas as soluções descritas até então tratam de amplificadores de sinais monopulares apenas. O *headstage* desenvolvido para esse sistema expande o conceito de pré-amplificador e, portanto, além de realizar a amplificação inicial dos sinais e de aumentar a impedância de entrada, é capaz de realizar amplificação diferencial para sinais bipolares, tais como o proveniente de eletrodos profundos de EEG (IC-EEG), de eletrocardiografia ou de eletromiografia.

Para tal, foi usado o chip INA2321 (Texas Instruments, Texas, EUA) com dois amplificadores de instrumentação, cujo encapsulamento TSSOP-14 é um dos menores do mercado, resolvendo o problema de miniaturização deste tipo de circuito. Este circuito integrado tem transistores JFET logo no primeiro estágio que impõem um altíssima impedância de entrada, da ordem de dezenas de TOhms (10^{13} Ohms). A taxa de rejeição de modo comum (CMRR) é de 94 dB, permitindo uma amplificação diferencial robusta.

Para atender aos diversos desenhos experimentais dessa tese e de outros trabalhos do laboratório, foram implementados dois circuitos diferentes em duas placas de circuito impresso, batizados de EECMG-CAA e EEG-CAA (figura 6, painéis A e B, respectivamente). Ambos os circuitos contêm dois chips INA2321 e, portanto, quatro amplificadores de instrumentação cada.

O modelo EEG-CAA tem todas as quatro entradas positivas dos amplificadores de instrumentação ligadas a pinos independentes do conector de entrada e todas as quatro entradas negativas, à referência. Logo, sua função é a amplificação monopolar (ou amplificação diferencial em relação à referência - terra) de quatro sinais bioelétricos. Esta versão conta, ainda, com uma linha para estimulação elétrica. Ela conecta, diretamente, pinos específicos dos conectores de entrada e saída, através de

uma trilha impressa de espessura 50 mils (milésimos de polegada), capaz de suportar uma maior potência elétrica, própria para estimulação.

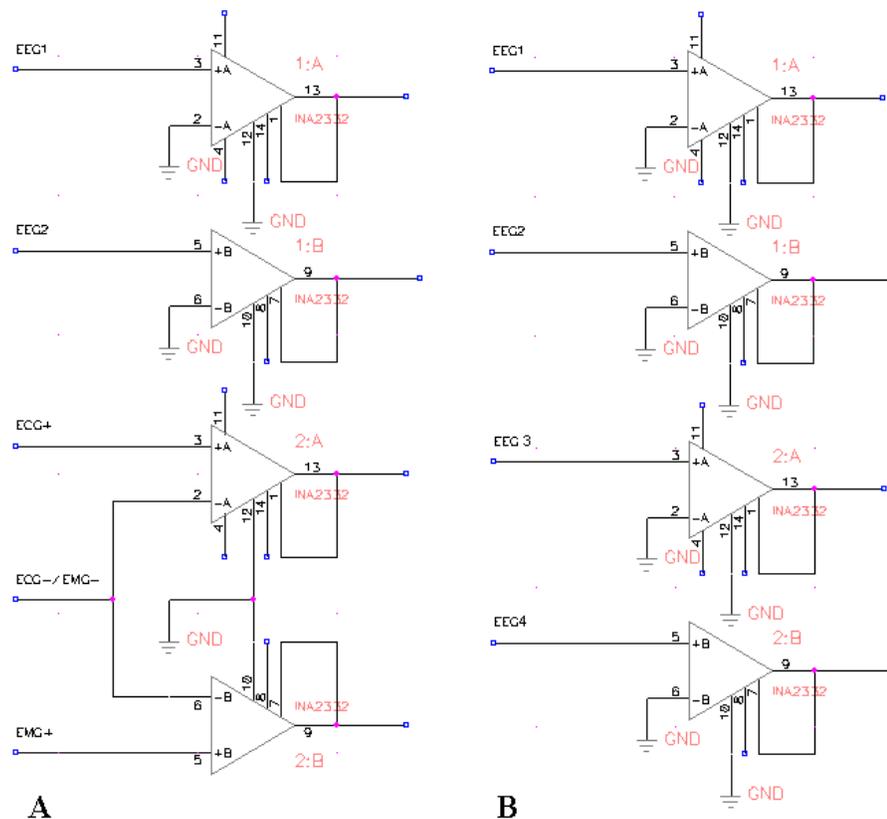


Figura 6 - Circuitos das duas versões do *headstage*: EECMG-CAA (A) e EEG-CAA (B).

O modelo EECMG-CA tem um dos amplificadores de instrumentação ligado no modo monopolar: entradas positivas ligadas ao conector de entrada e entradas negativas conectadas à referência; e dois amplificadores ligados como diferenciais (bipolares) com a entrada negativa comum: as duas entradas positivas são ligadas a dois pinos do conector de entrada e as duas entradas negativas estão curto-circuitadas e ligadas a um terceiro pino do conector de entrada. A idéia original era usar esta versão para a amplificação de dois canais monopolares de EEG, um canal diferencial de ECG e um diferencial de EMG, estes dois últimos com um eletrodo em comum (daí o nome EECMG-CA). No entanto, o canal de EMG tem sido substituído por um segundo canal de ECG com sucesso, resultando, inclusive, em vetocardiogramas nítidos. A aplicação

mais comum nesta tese foi usar uma das entradas bipolares para amplificação de sinais de IC-EEG com eletrodos bipolares.

Em ambas as versões, os pinos do chip foram devidamente ligados para configurar uma amplificação de 5 V/V. Naturalmente, o circuito impresso conecta linhas de alimentação a uma fonte de energia, no caso, externa. O circuito provê, ainda, espaço para a solda de capacitores de 1 μ F que auxiliam na qualidade da fonte distante de energia, prejudicada por indutância dos fios de alimentação.

O dispositivo completo, com conectores de entrada e de saída, pesa aproximadamente 5 g e mede 35x17x15 mm (figura 7).

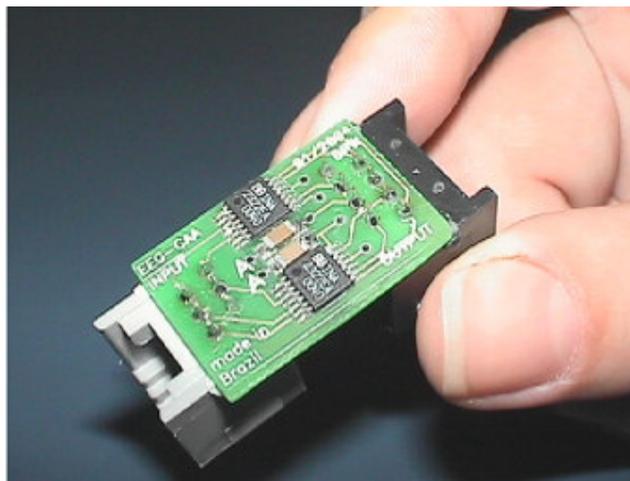


Figura 7 – Placa do *Headstage*.

II.1.3 – Módulos condicionadores

A amplificação final e a filtragem dos sinais nas bandas de interesse foram implementadas nos módulos condicionadores. Basicamente se constituem em um primeiro estágio de amplificação diferencial feito com o chip INA118 (Texas Instruments, Texas, EUA) seguido de filtros passa-altas e passa-baixas com ganhos internos em série. O INA118 tem CMRR de 110 dB e impedância de entrada de 10

GOhms. Os filtros são de topologia Sallen-key e resposta tipo Butterworth de quarta ordem (80 dB/déc.), implementados utilizando amplificadores operacionais comuns (OP AMPs) duais (e.g. OPA2227, Texas Instruments, Texas, EUA). O ganho da amplificação diferencial e as frequências de corte e ganhos dos filtros são dados pelos valores de resistores e capacitores externos. Isso possibilita a seleção de, virtualmente, quaisquer parâmetros de condicionamento dos sinais.

Para atender aos diferentes tipos de sinais, dois modelos de circuitos foram implementados: módulo condicionador de sinais de ponte e módulo condicionador de biopotenciais.

O diagrama de blocos do módulo condicionador de sinais de ponte está demonstrado na figura 8, com um amplificador de instrumentação seguido de um filtro passa-baixas. A referência do amplificador de instrumentação é ligada ao pino central de um potenciômetro para a polarização do nível basal segundo a tensão dada por um divisor de tensões. Isso permite o tratamento de sinais oriundo de transdutores de pressão, força e outros que utilizam pontes de Wheatstone ou que geram sinais de tensão diferenciais. A figura 9 mostra uma placa construída de um módulo condicionadores de sinais de pressão.

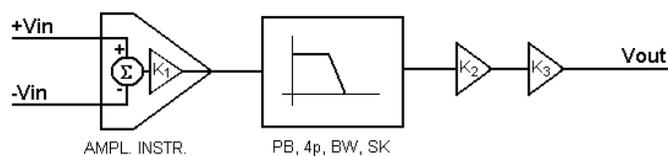


Figura 8 - Diagrama de blocos do amplificador de ponte.



Figura 9 - Placa do amplificador de ponte.

O módulo amplificador de biopotenciais tem arquitetura análoga ao de ponte, adicionados dois filtros passa-altas de segunda ordem (resultando em quarta ordem) antes e depois do passa-baixas, conforme demonstrado no diagrama de blocos da figura 10.

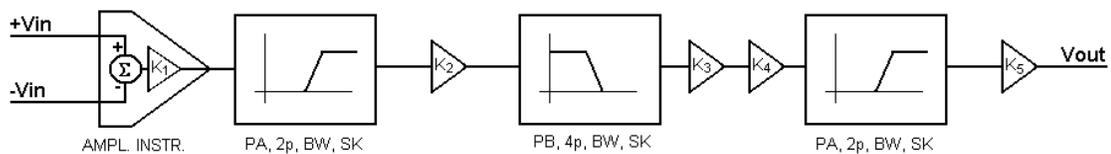


Figura 10 - Diagrama de blocos do amplificador de biopotenciais.

Para trazer maior versatilidade ao condicionamento de sinais bioelétricos, foi implementada uma versão desse módulo que usa um amplificador de instrumentação com ganho programável: PGA205BP (Texas Instruments, Texas, EUA), conforme demonstrado no diagrama de blocos da figura 11. A seleção do ganho (quatro possibilidades: 1x, 2x, 4x ou 8x) é feita através de um código binário de dois dígitos configurado por meio de “DIP-SWITCH” conectado a resistores “*pull-up*”. Com estes módulos, foi possível o condicionamento de sinais de EEG, ECG, EMG, entre outros.

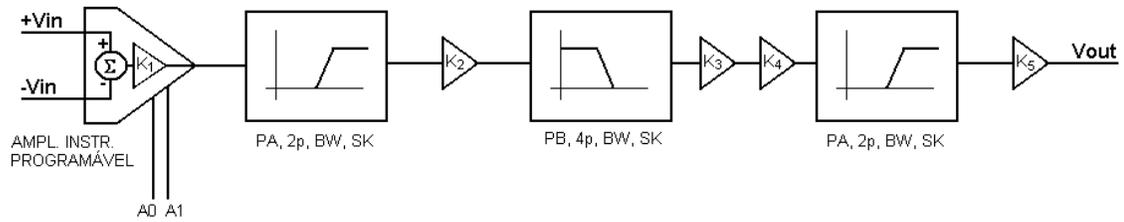


Figura 11 - Diagrama de blocos do amplificador de biopotenciais com ganho programável.

A aparência final dos condicionadores de biopotenciais ganho fixo e ganho programável está demonstrada nas figuras 12 e 13, respectivamente.

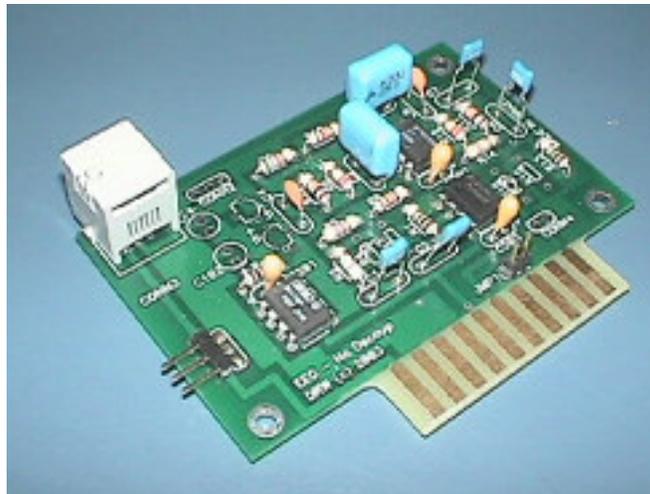


Figura 12 - Placa do amplificador de biopotenciais.



Figura 13 - Placa do amplificador de biopotenciais com ganho programável.

II.1.4 - Interface

Cada experimento que usou esse sistema consistiu de um conjunto específico e diferente de sinais a serem condicionados e adquiridos simultaneamente. O mesmo sistema deve ser usado por diversas pessoas ao longo do tempo. Mais do que isso, cada módulo condicionador deve receber energia e direcionar o seu sinal para o dispositivo conversor analógico-digital (conversor A/D; discutido mais adiante). Portanto, é necessário que o sistema seja flexível, configurável, de fácil manuseio e escalonável. Estes aspectos são implementados pela interface do sistema, que consiste basicamente do circuito impresso de um barramento completo de sinais e linhas de energia.

Foram elaboradas e implementadas duas versões deste barramento, uma para a integração de 16 canais e outra para a integração de 64 canais simultâneos, segundo as capacidades dos conversores A/D usados na próxima etapa do sistema. A lógica é a mesma nos dois casos e está demonstrada nas figuras 14 e 15. Ambos os barramentos mapeiam as saídas analógicas de cada um dos módulos para as entradas analógicas do conversor A/D via conector próprio. Além disso, mapeiam as linhas de entrada e saída digitais (e analógicas no caso do conversor A/D para 64 canais) e linhas de funções programáveis para conectores auxiliares. Por fim, provê um simples sistema de regulação e distribuição de energia, fonte dupla simétrica, utilizando reguladores de tensão (TL7805 e TL7809, Texas Instruments, Texas, EUA) e capacitores adequados.

Os amplificadores se encaixam nesta interface via conectores lineares, no estilo dos *video-games*, implementando uma interface amigável e de uso simplificado para leigos (figura 16).

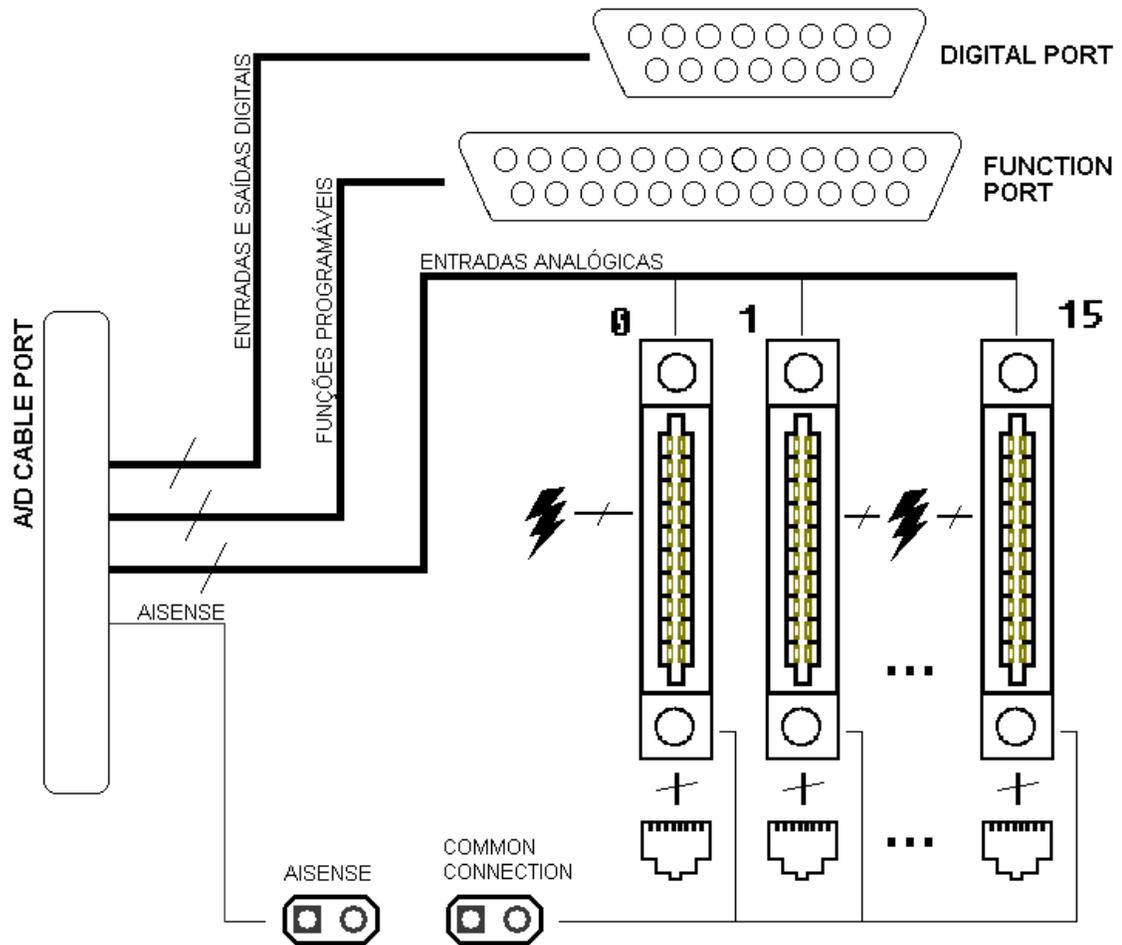


Figura 14 - Diagrama funcional da interface de 16 canais.

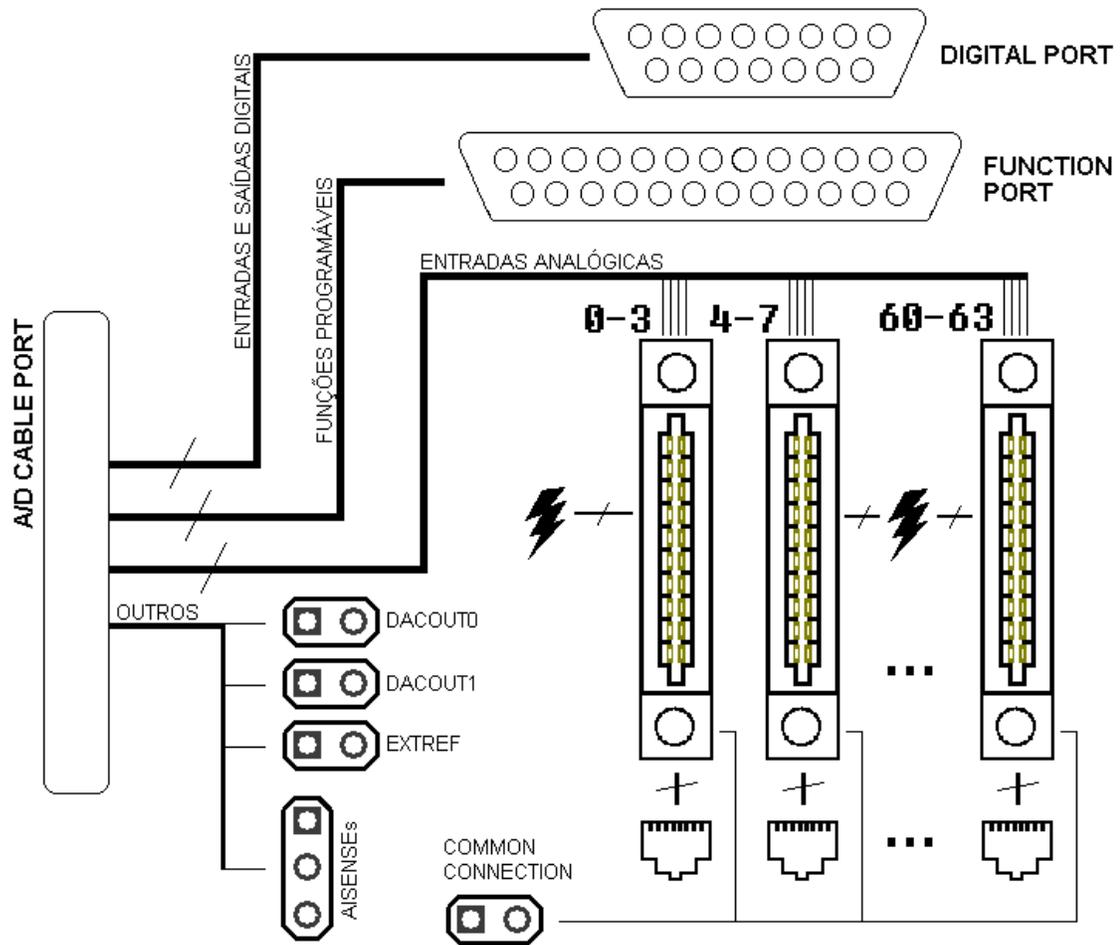


Figura 15 - Diagrama funcional da interface de 64 canais.

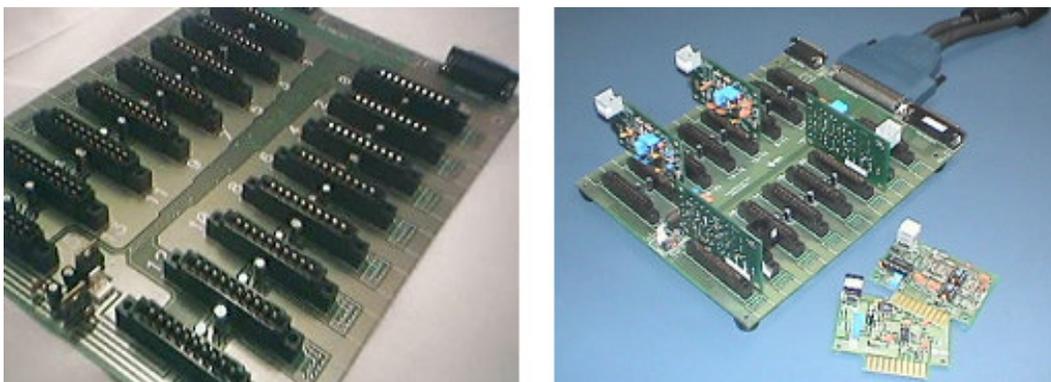


Figura 16 - Placa da interface de 16 canais sem e com módulos conectados.

II.1.5 – Conversor A/D

Sendo este um sistema computadorizado, baseado em plataforma PC, é necessário converter o sinal analógico da saída dos amplificadores para o formato digital tratado pelo computador. Isto é feito pelo conversor A/D.

Neste caso, para atingir os níveis de qualidade desejados, optamos por adquirir conversores de um fabricante internacional de tecnologia de instrumentação.

Os modelos escolhidos foram o NI-DAQ 6023E e o NI-DAQ 6071E (National Instruments Inc., Texas, EUA), ambos com interface via barramento PCI. O modelo 6023 é um conversor analógico digital de baixo custo, de 16 canais simultâneos, resolução de 12 bits e frequência de amostragem máxima de 200 KS/s e foi o equipamento usado em todos os experimentos desta tese. Para protocolos mais exigentes, não realizados nestes estudos, a escolha foi o modelo 6071 que adquire até 64 canais simultaneamente a uma taxa de amostragem máxima de 1,25 MS/s e 12 bits de resolução.

II.1.6 - Gabinetes

Visando a proteção mecânica e elétrica das placas de circuito impresso deste sistema, gabinetes metálicos para acondicionamento das placas foram projetados e construídos (figura 17). Além de constituírem uma gaiola de Faraday para blindar os circuitos de interferências eletromagnéticas externas, os gabinetes formam armação robusta para o posicionamento de conectores e de placas, juntamente com encaixes mecânicos que polarizam a direção de conexão das partes, evitando mau posicionamento e possíveis danos decorrentes disso.

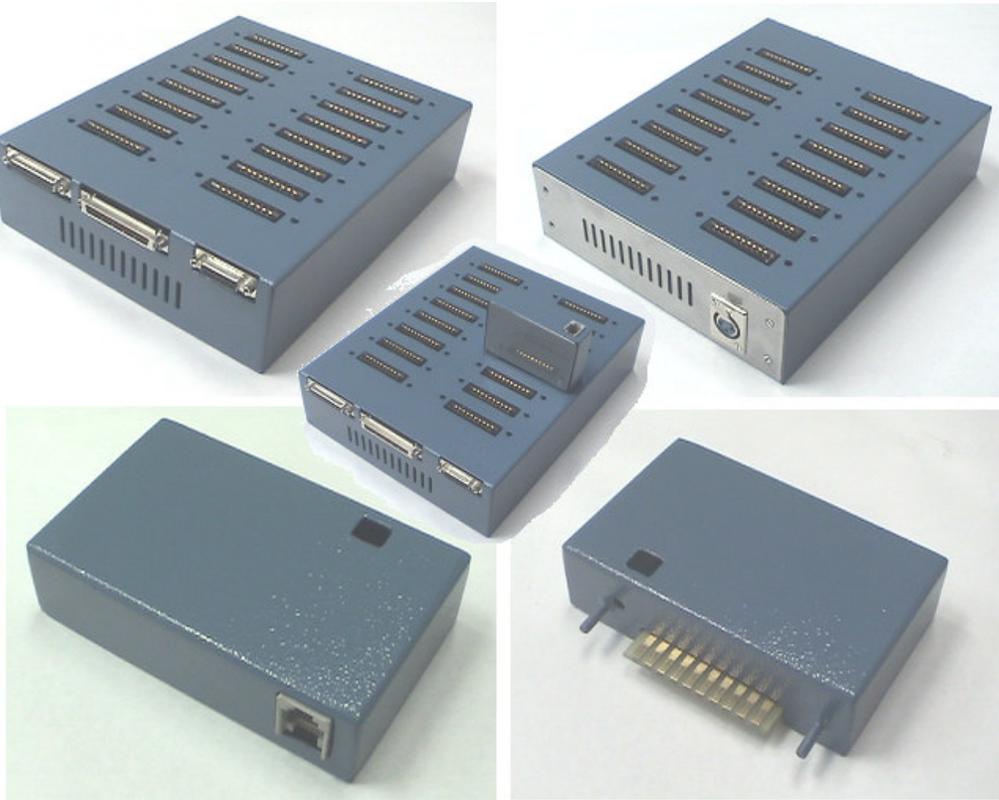


Figura 17 - Gabinetes para a interface e os módulos, mostrando detalhes mecânicos para polarização do encaixe.

II.1.7 – Software de registro e análise

O programa desenvolvido para o registro dos sinais, denominado NNC-DAQ, configura e controla o conversor A/D, permitindo visualização e armazenamento em disco em tempo real dos sinais adquiridos. Este software foi construído utilizando-se a linguagem de programação orientada a objetos C++, sob a plataforma Borland Builder C++ 6.0 e com auxílio da biblioteca da National Instruments que faz interface com o *driver* do conversor. Este software é de autoria do orientador desta tese, Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes.

Para a análise dos registros, conforme já foi mencionado, uma série de ferramentas matemáticas implementadas em rotinas de software, na plataforma de

computação matemática Matlab 7.1 ©, foram usadas. As rotinas são de autoria deste aluno e utilizam *toolboxes* da plataforma esporadicamente. Nestes casos, os créditos devidos foram mencionados.

II.1.8 – Testes e *benchmarking*

O *headstage* e os módulos condicionadores foram testados segundo protocolos simples de averiguação de função de transferência. A interface e o conversor A/D não foram testados devido à sua simplicidade ou às garantias dadas pelo fabricante, respectivamente.

Para testar o *headstage*, utilizou-se um sinal de entrada conhecido, constituído de um tom puro a 1 KHz com 200 mV de pico a pico, medindo-se amplitude e frequência da saída, através de um osciloscópio digital (modelo TDS1012B, Textronix Inc., Oregon, EUA). Ambos os parâmetros de saída se desviaram menos de 1% dos valores esperados (1000 mV a 1 KHz). Outros parâmetros como CMRR e impedância de entrada não foram testados por se tratarem de características inerentes ao circuito integrado, fornecidas pelo fabricante.

Para avaliar o desempenho do circuito de módulo condicionador, foram feitos dois testes: ruído do circuito com entradas em curto e banda de passagem com sinal conhecido. Para o teste de ruído, as entradas do primeiro estágio de um amplificador de biopotenciais foram conectadas entre e si e se mediu a amplitude do sinal de saída. Para avaliar a banda de passagem, utilizou-se como entrada no amplificador, um sinal senoidal de frequência variável (0 a 20 KHz) e de amplitude conhecida (1 mV pico-a-pico), medindo-se as frequências de corte da banda (~70% da amplitude na banda de passagem) e a amplitude do sinal de saída na banda de passagem. O ruído do sistema foi menor do que 10 μ V. Os valores de frequência de corte se desviaram em menos de 10%

do calculado (em escala logarítmica) e o valor do ganho se desviou em menos de 5% do esperado. Ambos os resultados são compatíveis com a precisão dos componentes usados.

Para a realização do *benchmarking*, o desempenho do sistema foi comparado a um padrão ouro da indústria de instrumentação científica, o pré-amplificador AI-401 SmartProbe® e condicionador de sinais programável CyberAmp® 380, ambos da Axon Instruments (Califórnia, EUA), acoplados ao conversor A/D modelo MP100 da BIOPAC Systems, Inc. (Califórnia, EUA). A montagem experimental consistiu simplesmente da derivação paralela para ambos os sistemas de um sinal de ECG captado por eletrodos feitos de agulhas posicionadas sob a pele de um rato anestesiado com Uretana (140 mg/kg).

A figura 18 abaixo mostra o sinal de ECG captado pelo sistema comercial (painel A) e pelo sistema desenvolvido nesta tese (painel B). O ruído da linha de base é cerca de 20 dB menor no sistema caseiro.

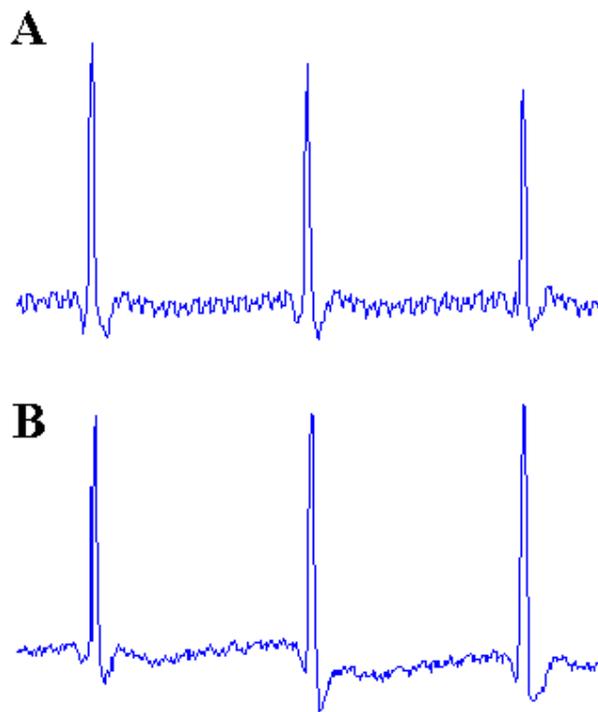


Figura 18 - Sinais de ECG captados durante *benchmarking* a partir do sistema comercial (A) e do sistema desenvolvido (B).

II.1.9 - Uso do sistema

O equipamento de registro desenvolvido aqui foi usado em todos os experimentos desta tese e também no escopo de diversos outros trabalhos em nosso laboratório e no de parceiros científicos. A título de ilustração, os resultados de ECG em ratos Wistar submetidos à injeção intra-cerebroventricular (ICV) de toxina escorpionica (Tityustoxina - TsTX) foram incluídos neste texto. Os créditos da cirurgia, registro e manobra experimental são da aluna Patrícia Maia Guidine, do programa de doutorado do curso de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia da UFMG.

Em seu experimento, a referida aluna implantou eletrodos subcutâneos crônicos de ECG de forma a configurar um triângulo de Einthoven no tórax dos ratos Wistar.

Após a recuperação pós-cirúrgica dos animais, foram feitos os registros das derivações DI e DII e o cálculo do vetocardiograma durante microinjeção de salina e da toxina. Foram usados o *headstage* modelo EECMG-CA (ganho 5V/V), dois módulos condicionadores para ECG (ganho de 529 V/V e filtragem de 1-200 Hz), a interface de 16 canais e o conversor A/D NI-DAQ 6023E (frequência de amostragem de 1 KS/s). A figura 14, extraída do texto de qualificação da referida autora (com permissão devida), mostra os resultados do traçado de ECG e os respectivos vetocardiogramas obtidos logo após a microinjeção de salina (painéis A, B, C e D) e 527 s após microinjeção de toxina (painel E).

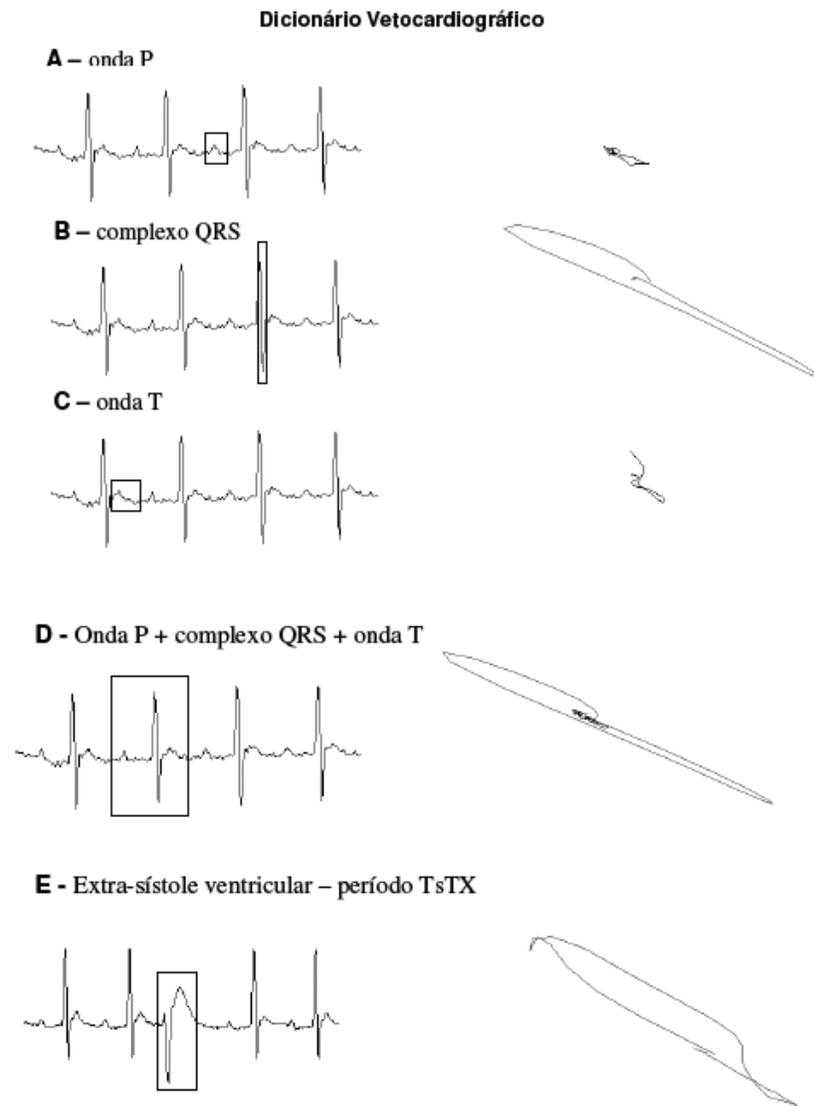


Figura 19 – Dicionário vetocardiográfico. Alças vetocardiográficas correspondentes às despolarizações atrial (A) e ventricular (B) e à repolarização ventricular (C) de um registro obtido de um animal após a microinjeção de salina. A letra D corresponde ao vetocardiograma (VCG) equivalente a um ciclo cardíaco completo no mesmo período de tempo. A letra E mostra uma extra-sístole ventricular apresentada por esse mesmo rato 527s após a administração da TsTX. Extraído do texto de qualificação da aluna Patrícia Maia Guidine, com autorização.

II.2 – Estimulador elétrico

II.2.1 – Considerações iniciais

A estimulação elétrica é uma poderosa ferramenta usada em uma série de protocolos experimentais de neurobiologia, desde preparações de junção neuromuscular, potenciais evocados eletricamente, estudos em fatias de cérebro e modulação comportamental (Tehovnik 1996) até, especificamente em epileptologia, abrasamento de substratos neurais (Racine 1972b) e atenuação / supressão de crises (Theodore & Fisher 2004). Cada caso requer um conjunto específico de parâmetros, ajustados em faixas próprias de valores, de maneira fixa ou com variação lentas ou súbitas ao longo do experimento.

Para atender às necessidades tecnológicas específicas da investigação desta tese sem, no entanto, prejudicar a aplicabilidade em outros estudos conforme mencionado anteriormente, foi projetado e implementado um estimulador elétrico de trem de pulsos de corrente completamente controlado por computador (PC).

O projeto elaborado contém características que implementam avanços em relação a diversos estimuladores descritos até então (Jaw et al. 1995; Mavoori et al. 2005; Winter et al. 1998; Xu et al. 2004). Citam-se 1) pulsos podem ser disparados de forma automática e independente a partir de um relógio interno ou diretamente do PC, permitindo virtualmente quaisquer padrões temporais; 2) controle digital e em tempo real da amplitude de corrente, nunca antes descrito na bibliografia, além de polaridade do pulso, número de fases (monofásico ou bifásico) e demais parâmetros; 3) inédito estágio de saída construído com amplificador operacional de alta tensão que permite conjugar alta tensão de saída (90 V) com alto desempenho de temporização; 4) alimentação simples a partir de uma fonte de 5 V e completo isolamento do circuito.

Para testar o estimulador, foi usada uma carga puramente resistiva, viabilizando a medição de parâmetros elétricos importantes. Além disso, o dispositivo foi testado em uma situação experimental real, usando uma preparação *in vitro* para a indução de potenciação de longo prazo (LTP – Long Term Potentiation) – importante mecanismo para consolidação de memórias – na amígdala, através de estimulação de alta frequência (Jones et al. 1999).

II.2.2 - Visão geral do estimulador

O estimulador consiste de 7 partes principais conforme está demonstrado na figura 20: 1) interface com PC; 2) gerência de energia; 3) isolamento óptico; 4) controlador de frequência de disparo; 5) gerador de pulsos (primeiro e segundo pulsos); 6) gerência de opções e; 7) estágio de saída.

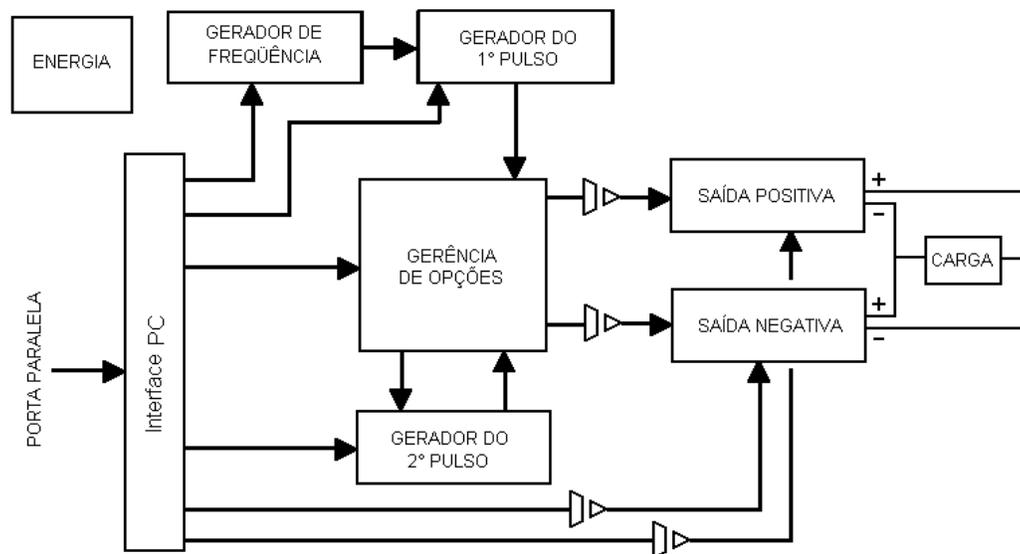


Figura 20 - Diagrama de blocos do estimulador elétrico.

Em linhas gerais, o controlador de frequência gera um sinal quadrado com frequência determinada que dispara, a cada borda de descida, o gerador do primeiro pulso. Este, por sua vez, gera um pulso com duração determinada que entra no sistema

de gerência de opções. Este sistema direciona o pulso para um dos estágios de saída, positivo ou negativo, dependendo do estado do bit de polaridade proveniente do PC via interface. Se o bit referente ao número de fases estiver em nível alto, implicando pulso bifásico, o sistema de gerência de opções gera um sinal de gatilho na borda de descida do primeiro pulso para disparar o gerador do segundo pulso, que por sua vez gera um pulso com duração também determinada. Este segundo pulso entra novamente no sistema de gerência de opções que o redireciona para o estágio oposto ao do primeiro pulso. Antes de acionarem os estágios de saída, os pulsos provenientes do sistema de gerência de opções são desacoplados através do circuito de isolamento óptico. O estágio de saída gera, então, um pulso de corrente constante com duração determinada pelo gerador de pulsos a uma taxa de repetição dada pelo controlador de frequência de disparo. A amplitude do pulso de corrente é controlada segundo o estado interno dos componentes do próprio estágio de saída. Polaridade e número de fases depende da seqüência de acionamento dos estágios de saída positivo e negativo realizada pelo sistema de gerência de opções. A interface provê um meio para o trânsito e o armazenamento dos bits entre a porta paralela do PC e os circuitos do estimulador, possibilitando a configuração dos diversos parâmetros mencionados. O sistema de gerência de energia gera o alto nível de tensão DC usado pelo OP AMP de alta tensão, além de outros níveis ordinários para uso em outros CIs. Por fim, o controlador de frequência pode ser desativado para permitir o controle direto do PC na temporização dos disparos do pulso, através de uma linha dedicada na interface. A figura 21 é uma foto com a aparência final de uma placa do estimulador construída.

As seções a seguir detalham cada estágio do estimulador.

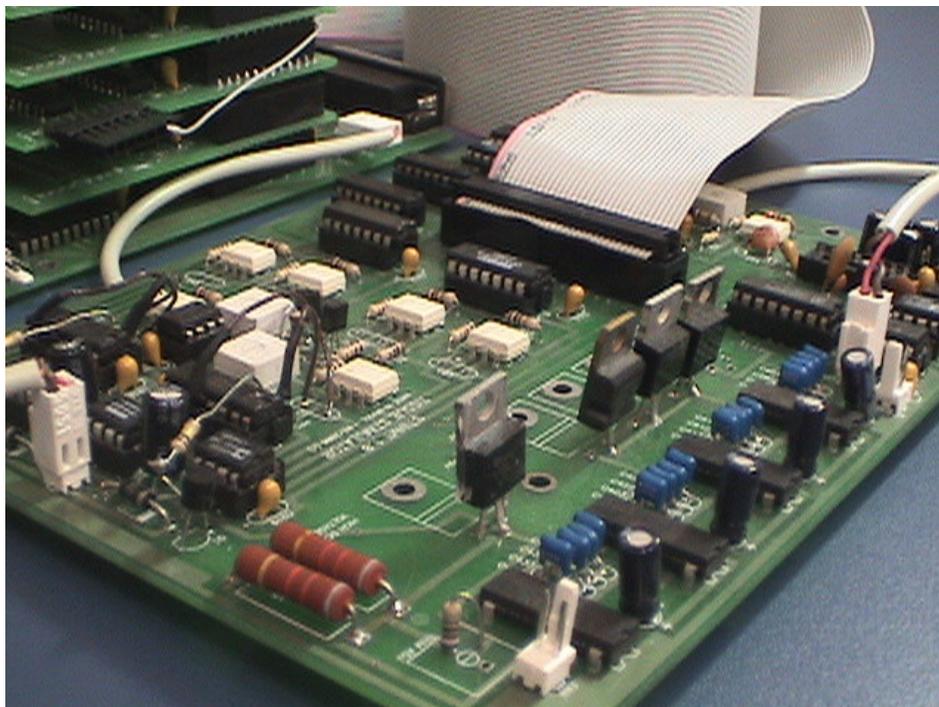


Figura 21 - Aparência final da placa do estimulador elétrico

II.2.3 – Interface com o PC e software de configuração de parâmetros

São necessários 32 bits para configurar todos os parâmetros do estimulador. Para realizar a comunicação em 32 bits através das 8 linhas digitais disponíveis na porta paralela do PC, foi usado um sistema de multiplexação da porta paralela disponível em nosso laboratório. Este desenvolvimento, em particular, foi realizado no escopo do projeto de conclusão de curso do aluno Daniel Scotti Penido, da graduação de engenharia de controle e automação, a quem os créditos desse *hardware* devem ser dados. Basicamente, essa interface de comunicação usa *latches* e um sistema de endereçamento para realizar o roteamento de dados entre PC e até 256 dispositivos de 8 bits simultâneos, construída a partir de placas de circuito impresso facilmente interconectáveis sendo, portanto, escalonável. A interface foi usada para multiplexar a

porta paralela do PC em 4 dispositivos de 8 bits que nada mais são, do que agrupamentos convenientes de bits correlacionados de controle do estimulador.

O controle do estimulador é feito através de um programa desenvolvido usando a linguagem de programação orientada a objetos C++ e a plataforma de programação C++ Borland Builder 6.0 ©. Para isso, foram criadas três camadas de software sobrepostas, implementadas como classes distintas: 1) camada visual para entrada dos parâmetros pelo usuário; 2) camada para gerência dos parâmetros e estado do dispositivo e; 3) controle do fluxo de bits através da porta paralela. Sistemas operacionais modernos como o Windows 2000 © bloqueiam o acesso direto à porta paralela, visando a segurança e estabilidade do sistema. Para contornar esse impedimento utilizamos um *driver* gratuito, denominado “PortTalk” e disponível na Internet no sítio <http://www.beyondlogic.org/porttalk/porttalk.htm>. Os autores foram contatados para a devida menção de créditos, mas não responderam no tempo hábil de 18 meses até o fechamento deste texto. Além da funcionalidade já mencionada, o programa desenvolvido permite salvar e carregar arquivos com configurações pré-definidas. Implementa, também, uma interface para protocolos de LTP em amígdala e hipocampo que, consiste, basicamente, em um algoritmo para a geração de pulsos pareados, separados temporalmente de 50 ms e interrompidos por salvas de pulsos em alta frequência (33 ou 100 Hz) quando comandado pelo usuário. Outras funcionalidades foram adicionadas para experimentos específicos e serão descritas no contexto de suas aplicações.

A título de ilustração, a figura 22 contém um “*screenshot*” da tela principal do programa.

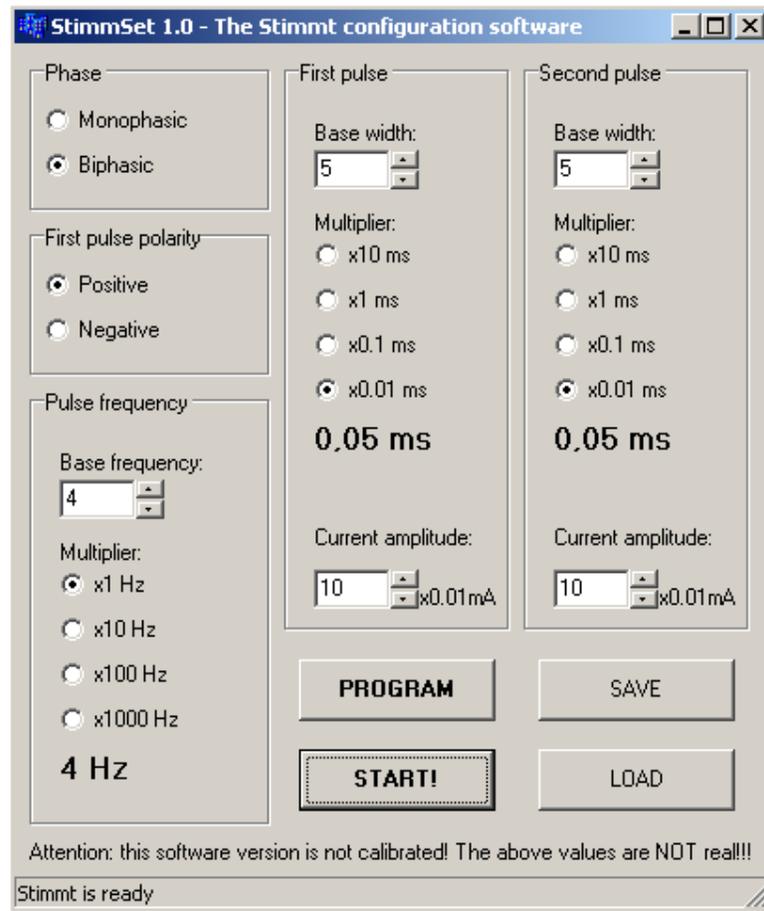


Figura 22 - Screenshot da tela do programa de configuração e controle do estimulador elétrico.

II.2.4 – Gerência de energia

Para se obter uma alta tensão DC a partir de uma fonte comum de 5 V (V_{cc}), quatro (4) conversores DC/DC do tipo *boost* (DCP010515DB, Texas Instruments, Texas, EUA) foram eletronicamente empilhados. Este CI gera saídas simétricas de ± 15 V e uma referência (0 V) desacoplados através do chaveamento a 400 KHz sobre indutância de uma entrada de 5 V. Conforme sugerido pelo fabricante, conectando-se o pino de +15 V de um conversor ao pino de -15 V do próximo conversor na pilha e assim em diante até completar 4 conversores, é possível obter 120 V DC de ponta a ponta (“*rail-to-rail*”). Capacitores com resistência de série equivalente (ESR –

Equivalent Series Resistance) baixa foram posicionados nos pinos de saída e entrada do CI de maneira a eliminar o *ripple* oriundo do processo de chaveamento.

Um regulador para altas tensões ajustável (TL783KC, Texas Instruments, Texas, EUA), associado a um resistor comum de 68Ω e a dois resistores de potência de $8,2 \text{ K}\Omega / 5 \text{ W}$ em paralelo, foi usado para fornecer 85 V DC regulados para o OP AMP de alta tensão. Reguladores de tensão comuns (TL7805, TL7905, TL7809 e TL 7909, Texas Instruments, Texas, EUA) foram usados para fornecer $\pm 5 \text{ V}$ e $\pm 9 \text{ V}$ (Vdd e Vee, respectivamente) para a parte desacoplada do circuito.

O projeto da placa de circuito impresso desta porção do circuito deve ser feito com bastante cuidado, implementando trilhas grossas e curtas, de maneira a evitar indutâncias parasitárias que podem causar falha de funcionamento dos CIs (para mais detalhes, vide manual técnico fornecido pelo fabricante).

II.2.5 – Isolamento óptico

Para minimizar os efeitos dos artefatos de estimulação no equipamento de registro, os estágios de saída foram completamente isolados do resto do circuito. As linhas de energia foram desacoplados através do uso de conversores DC/DC conforme descrito mais acima. Sinais internos (pulsos) e sinais de controle foram isolados através de um circuito simples que usa um acoplador óptico integrado no chip 4n25 (Fairchild Semiconductor, Maine, EUA). Este circuito é bastante simples e por isso não é mostrado. Basicamente, o CI é conectado a um resistor de 100Ω que limita a corrente através do fotodiodo de entrada e a um outro resistor de $1 \text{ K}\Omega$ para polarizar o fototransistor de saída. OP AMPs configurados como BUFFER foram sempre posicionados antes de cada acoplador óptico para fornecer a corrente de entrada necessária (TL062 ou OPA4227, Texas Instruments, Texas, EUA). No diagrama de

blocos da figura 20, cada unidade de isolamento é simbolizada por um triângulo interrompido.

II.2.6 – Controlador de frequência de disparo

A onda quadrada de frequência fixa programável que dispara cada pulsos é gerada por um circuito temporizador clássico: o CI LM555CN (National Semiconductor, Califórnia, EUA), montado na configuração astável (figura 23). Para realizar o controle digital da frequência, o resistor de descarga comum foi substituído por um potenciômetro digitalmente controlado: AD5220B100 (Analog Devices, Inc., Massachusetts, EUA). Este integrado contém 3 pinos que funcionam como os taps de um potenciômetro comum. O tap central tem 128 posições possíveis, selecionadas através de dois outros pinos: “UD” para a seleção da direção de movimento do tap e “CLK” para comandar o movimento do tap. Cada pulso neste último pino faz com que o tap central se movimente para a próxima posição possível, segundo a direção de movimento dada pelo estado do outro pino. Para aumentar o número de valores de frequência programáveis, o capacitor de carga foi substituído por um banco de capacitores de diferentes valores multiplexados por um CI de chaveamento analógico: CD4052BE (Texas Instruments, Texas, EUA), controlado por um código binário de dois dígitos. Essas duas substituições permitem a programação digital de $4 \times 128 = 512$ valores de constantes RC diferentes que controlam a temporização do 555, implicando um número igual de valores de frequência, usando apenas 4 linhas digitais para isso. Usando a versão AD5220B100 do potenciômetro digital, cuja resistência total é de $100 \text{ K}\Omega$ (há versões com $50 \text{ K}\Omega$ e $10 \text{ K}\Omega$) e um banco de capacitores com valores de $47 \mu\text{F}$, $10 \mu\text{F}$, $4,7 \mu\text{F}$ e $1,0 \mu\text{F}$, obtém-se uma frequência máxima de 1,43 KHz e mínima

de 0,03 Hz. A figura 24 mostra os valores de frequência possíveis para essa configuração (alguns valores intermediários foram omitidos para clareza da figura).

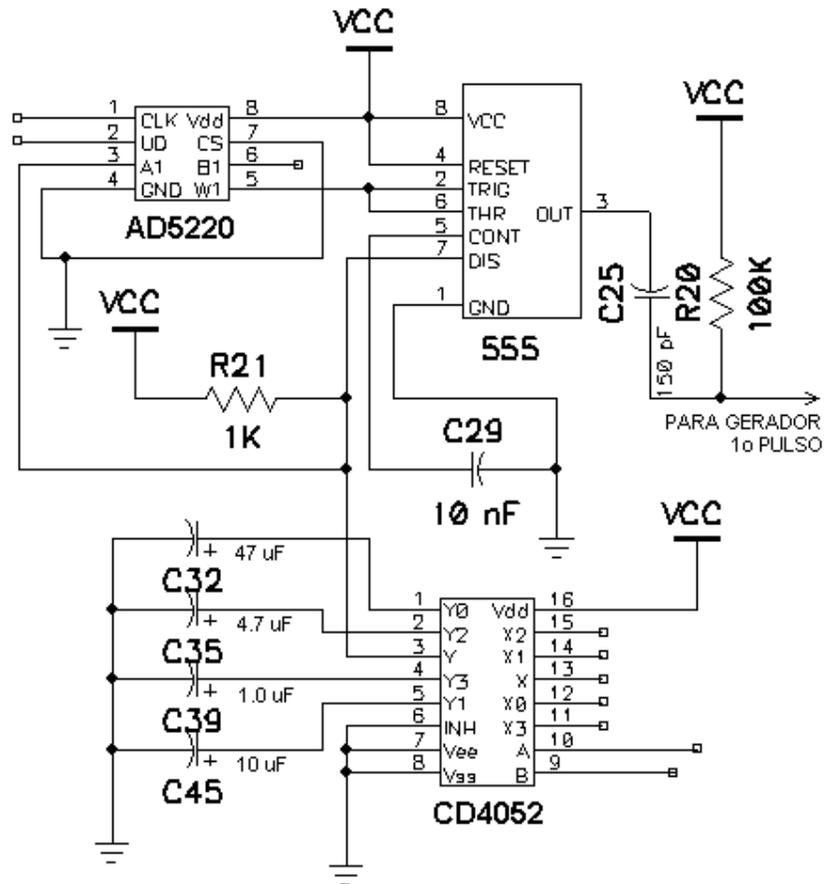


Figura 23 - Circuito do gerador de frequências.

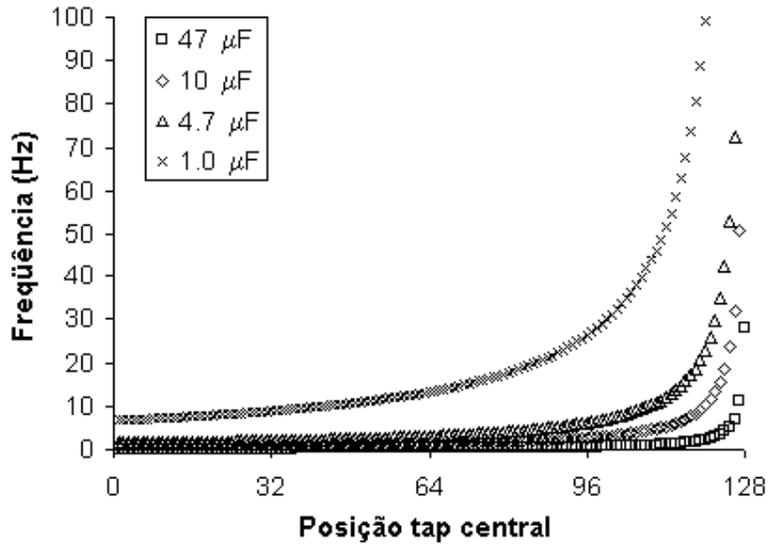


Figura 24 - Frequência de disparo dos pulsos segundo capacitor selecionado e posição do tap central.

II.2.7 – Gerador de pulsos

Tanto o primeiro quanto o segundo pulso são gerados neste circuito, que é constituído de um 555 montado na configuração monostável (figura 25). Assim como no caso anterior, o resistor de descarga é substituído por um potenciômetro digital (AD5220) e o capacitor de carga por um banco de 4 capacitores multiplexados por uma chave analógica digitalmente controlada (CD4052). Dessa forma, é possível configurar 512 valores possíveis de duração de cada pulso independentemente. Usando a versão de 100 K Ω do potenciômetro digital (AD5220BE100) e um banco de capacitores com valores de 1.0 μ F, 220 nF, 100 nF e 47 nF, obtém-se uma duração máxima de pulso de 120 ms e mínima de 50 μ s. A figura 26 mostra os valores de duração de pulso possíveis de se obter nessa configuração (omitindo-se valores intermediários).

O disparo de cada pulso desse circuito é controlado pelo estágio anterior de controle de frequência de disparos. Um circuito RC simples, com constante de tempo bem pequena, conecta os estágios.

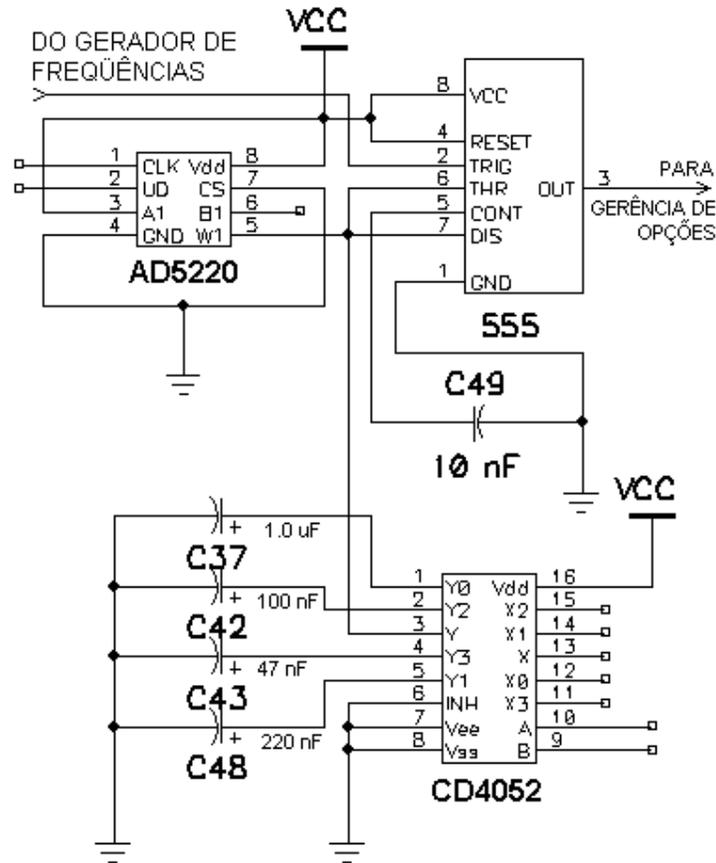


Figura 25 - Circuito do gerador de pulsos.

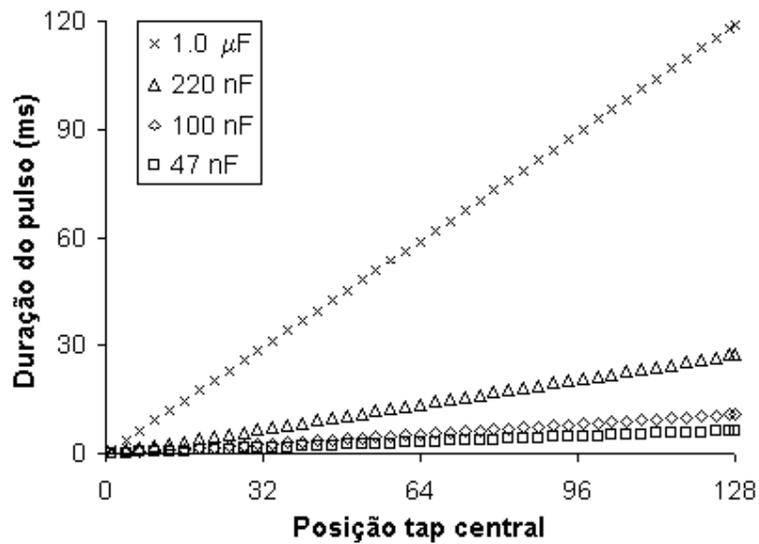


Figura 26 - Duração do pulso segundo capacitor selecionado e posição do tap central.

II.2.8 – Gerência de opções

Esta parte do circuito é responsável por gerenciar as opções de morfologia do estímulo (polaridade e número de fases), transformando os bits de entrada na seqüência correta de acionamento dos estágios de saída. Constitui-se em duas porções distintas: uma digital contendo um conjunto de portas lógicas interconectadas, tais como ANDs, NANDs, X-ORs e NOTs encapsulados em chips com quatro (QUAD) ou seis portas (HEX) e uma parte analógica para a geração do sinal de gatilho no fim do primeiro pulso para disparo do segundo pulso no caso de morfologia bifásica (figura 26).

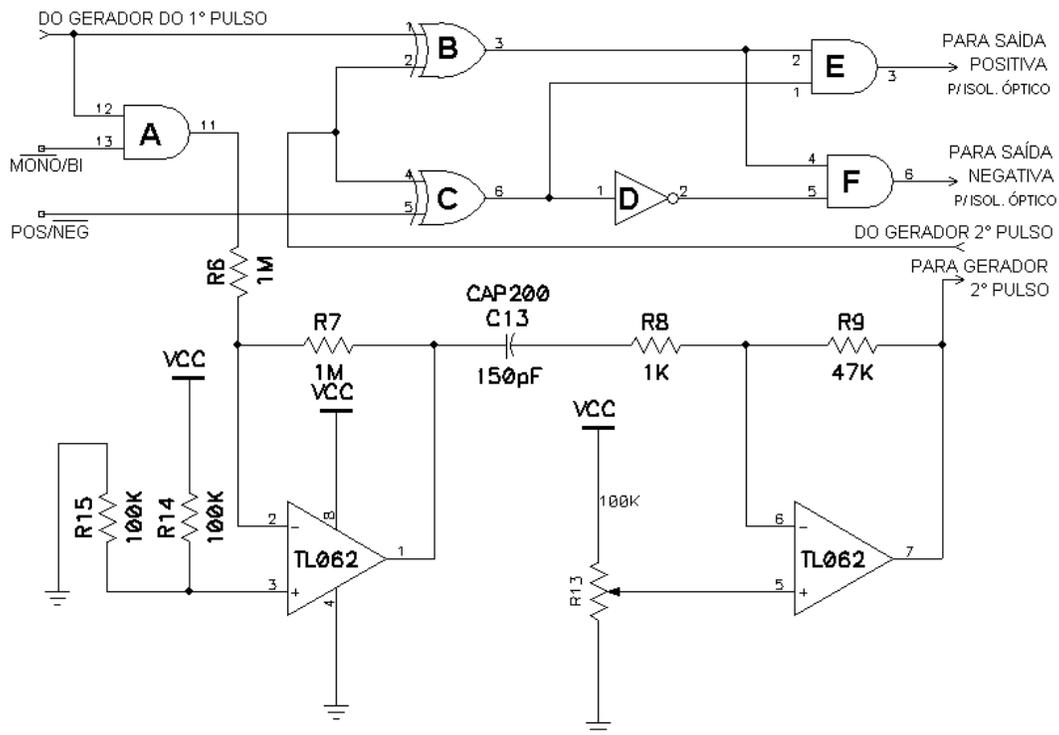


Figura 27 - Circuito do sistema de gerência de opções.

Cinco portas NOT conjugadas com uma porta NAND de 8 entradas implementam um primeiro circuito (não mostrado) para o reconhecimento de um código de início de operação. Seu objetivo é evitar que flutuações espúrias das tensões da porta paralela inicie o funcionamento ou interrupção indesejados do circuito. A palavra de 8

bits correta “01001101” deve ser fornecida para levar a saída desse circuito ao nível digital alto, comandando uma porta AND que funciona como um portão controlado para o fluxo de pulsos provenientes do sistema gerador do primeiro pulso.

Todas as outras portas são dedicadas à geração correta da seqüência de comandos para os estágios de saída ou para o sistema de geração do segundo pulso, conforme o estado dos bits de entrada com a informação de polaridade e número de fases. A tabela 3 resume a seqüência de acionamento dos estágios de saída segundo as quatro possíveis combinações dos bits de entrada.

Tabela 3 - Seqüência de acionamento dos estágios de saída segundo estados dos bits de polaridade e de número de fases.

Bit de polaridade	Bit do número de fases	Primeiro pulso	Segundo pulso
Positivo (H)	Monofásico (L)	Positivo	-
Negativo (L)	Monofásico (L)	Negativo	-
Positivo (H)	Bifásico (H)	Positivo	Negativo
Negativo (N)	Bifásico (H)	Negativo	Positivo

Visando clareza do texto, a lógica desse sistema foi omitida aqui. Para maiores detalhes, vide apêndice B.

II.2.9 – Estágio de saída

O estágio de saída do estimulador gera pulsos de corrente constante de amplitude programável, disparados pelos pulsos de entrada oriundos dos estágios anteriores. Para isso, foi usado um amplificador operacional de alta tensão OPA445P

(Texas Instruments, Texas, EUA), configurado como um conversor tensão-corrente (figura 28). Optou-se por usar um OP AMP ao invés de simples transistores, basicamente, para possibilitar o controle digital da amplitude de corrente e para viabilizar a inversão de polaridade e configuração do número de fases utilizando dois estágios de saída inversamente conectados.

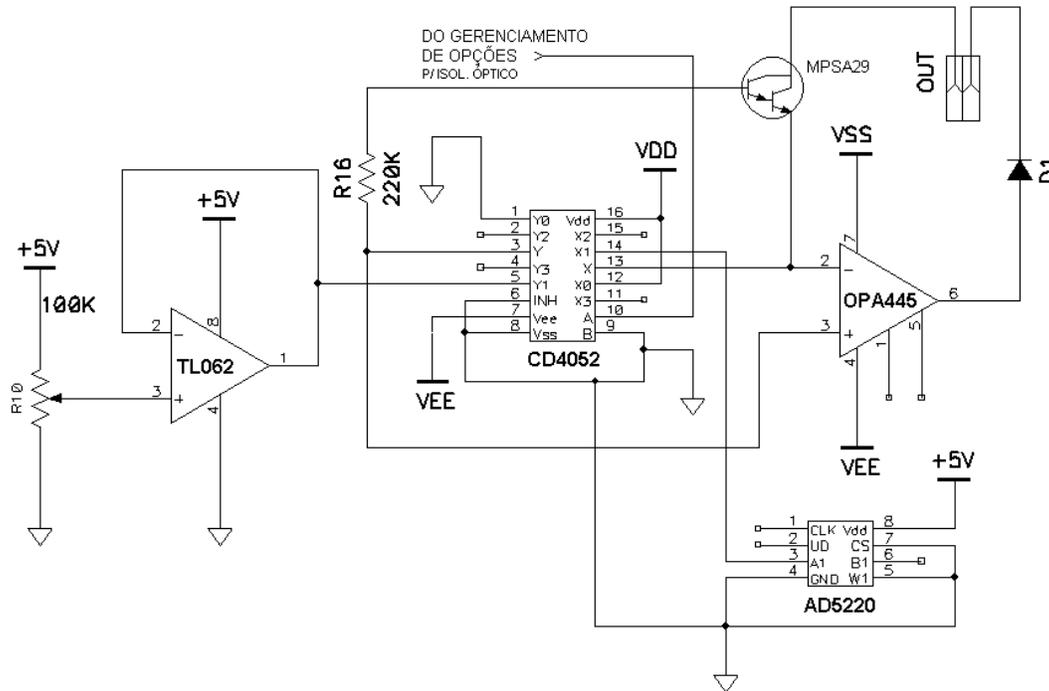


Figura 28 - Circuito do estágio de saída.

O pulso de entrada dispara uma chave analógica (CD4052) que conecta a saída do OP AMP comum (TL062) à entrada positiva do OPA445. A tensão de saída do TL062 (v_0) é ajustável através do potenciômetro, cujo tap central está ligado à entrada positiva deste OP AMP. A entrada do pulso no OPA445 foi feita dessa forma para permitir valores de tempo de subida pequenos, já que o CD4052 é capaz de multiplexar sinais a cada poucas unidades de nano segundo. Devido ao curto virtual do OP AMP, a tensão na entrada negativa assume o valor da entrada positiva, no caso v_0 , originando uma corrente i através da resistência R do potenciômetro digital, dada por $i = v_0 / R$. O

valor de R pode ser controlado digitalmente e, portanto, também o da corrente i . Esta mesma corrente tem que fluir através da alça de retroalimentação do circuito no OPA445, onde está conectada a carga alvo. Dessa forma, obtém-se um pulso de corrente constante cuja amplitude pode ser digitalmente configurada. Um par Darlington encapsulado no CI MPSA29 (On Semiconductors Corp., Arizona, EUA) e um diodo comum (1N4007) foram usados para proteger os circuitos integrados durante o acionamento do estágio oposto. O MPSA29 é colocado em saturação simultaneamente com o pulso e fica desligado o resto do tempo, uma vez que o sinal de tensão de base provém da mesma chave analógica que comanda o OPA445. A especificação de um par Darlington foi feita de forma a se obter uma alta relação de corrente h_{fe} (~ 4000) e uma alta tensão de reversão emissor-coletor (~ 100 V).

A figura 29 mostra os valores de corrente possíveis quando a tensão de saída do TL062 (v_o) está configurada em $\sim 4,2$ V.

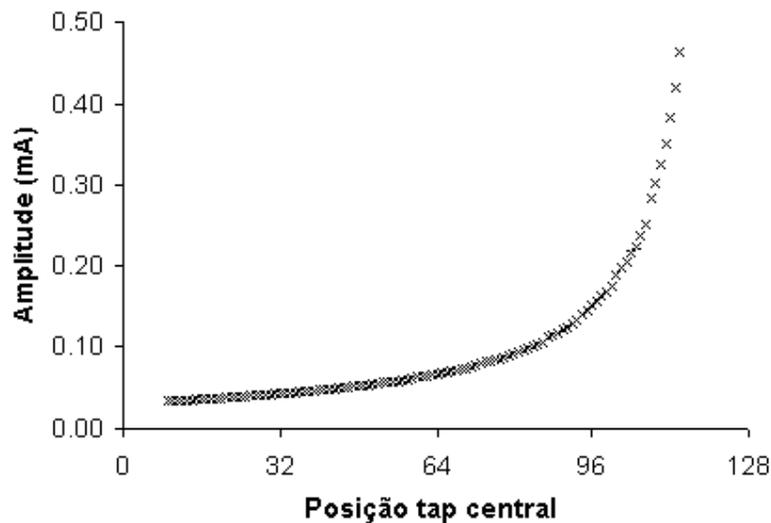


Figura 29 - Amplitude de corrente de saída segundo posição do tap central.

II.2.10 – Medição dos parâmetros elétricos

Para avaliar o desempenho do circuito implementado, alguns parâmetros elétricos de interesse foram medidos através de um osciloscópio digital (modelo TDS1012B, Tektronix Inc., Oregon, EUA) conectado a uma carga resistiva de 8,2 K Ω , posicionada na saída do sistema e submetida a repetidas passagens de corrente. Os resultados podem ser resumidos na tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros elétricos do estimulador medidos com uma carga puramente resistiva de 8,2 KW.

Parâmetro	Valor	Unidade
Tempo de subida	100	ns/V
Tempo de descida	100	ns/V
Tempo entre pulsos no modo bifásico	4	μ s
Corrente quando desligado	42	nA

II.2.11 – Avaliação do sistema em um protocolo de LTP

O desempenho do estimulador também foi avaliado no contexto prático de um protocolo de LTP na amígdala em uma preparação *in vitro* de fatia cerebral. Os créditos da preparação, registro e estimulação são dados para aluna de doutorado Luciana Estefani Drumond, integrante do nosso laboratório. Para o experimento foi usado um rato Wistar macho, pesando 350 g, proveniente do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O rato foi rapidamente decapitado e o cérebro imediatamente removido e colocado em líquido céfalo-raquidiano artificial (aCSF – artificial CerebroSpinal Fluid) resfriado a 4 °C de baixo teor de cálcio, contendo (em mM): NaCl (125), KCl (2,5), MgCl₂ (3,0), CaCl₂ (0.1), glucose (25),

NaCO₃ (25), NaH₂PO₄ (1.25). O pH da solução foi mantido em 7,4 quando perfundida por carbogênio (95% O₂ and 5% CO₂). Neste meio, o cérebro foi posicionado em um vibrátomo (Series 1000, Technical Products International Inc., Missouri, EUA) e fatiado transversalmente a 400 µm. As fatias obtidas foram transferidas para uma câmara de incubação para recuperação durante 120 minutos. Após esse período, as fatias foram posicionadas individualmente na câmara de registro continuamente perfundida por aCSF (corrigido para 1.0 mM de MgCl₂ e 2.0 mM CaCl₂), onde os registros extracelulares de potenciais excitatórios pós-sinápticos (fEPSP – field Excitatory Post-Synaptic Potentials) foram feitos usando microeletrodos de vidro preenchidos com aCSF e posicionados na amígdala lateral. O sinal foi filtrado na banda de 0,1 a 600 Hz com 2000 V/V de ganho através do amplificador programável CyberAmp 380 e o *probe* AI401 (Axon Instruments, Califórnia, EUA) e digitalizado a 20 KS/s com o conversor A/D NI-DAQ 6023E (National Instruments Inc., Texas, EUA). O software usado para aquisição foi o WinCP 5.5 (Strathclyde Electrophysiology software, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland) e para análise o pClamp 9.2 (Axon Instrument, Califórnia, EUA). O módulo de indução de LTP do software de controle do estimulador foi usado para entregar estímulos a um eletrodo bipolar de platina-iridium posicionado na via tálamo-amígdala (acústico-límbica). O posicionamento correto do eletrodo foi verificado através de um microscópio de fluorescência Axoskope (Axoskope, Carl Zeiss Inc., EUA).

A figura 30 mostra ondas de fEPSP evocadas pelo estímulo de pulso pareado antes (painel A) e após (painel B) a estimulação de alta frequência (seta HFS). O painel C mostra a evolução da amplitude das ondas de fEPSP durante o experimento. Como pode ser visto, há um significativo aumento sustentado aproximadamente 45 minutos após a estimulação de alta frequência, mostrando claramente a indução do LTP.

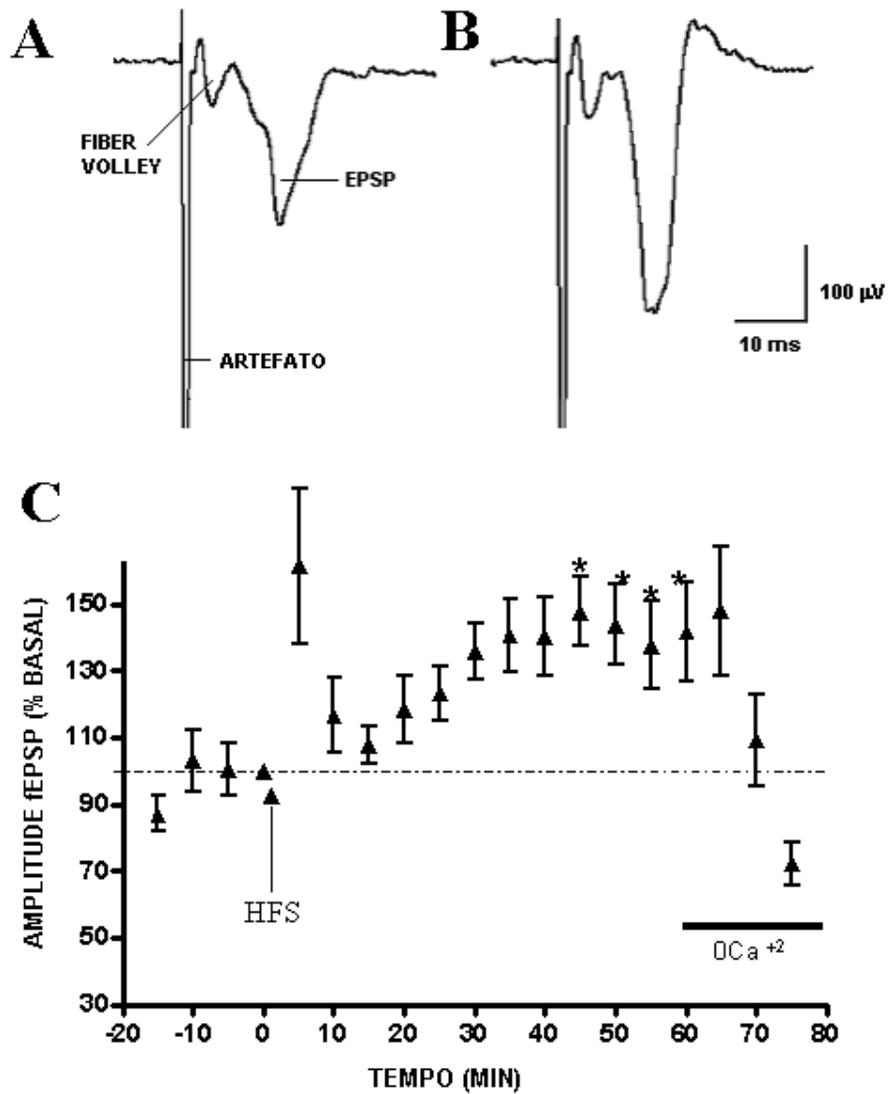


Figura 30 – Resultados do experimento de LTP usando o estimulador elétrico desenvolvido. Morfologia do fEPSP antes (A) e depois (B) do estímulo de alta frequência (HFS). Evolução da amplitude do fEPSP ao longo de todo o experimento. Extraído e adaptado da dissertação de mestrado da aluna Luciana Estefani Drumond, com autorização.

II.3 – Discussão

Neste capítulo foram discutidos os diversos detalhes de projeto e desenvolvimento de dois equipamentos importantes para estudos em eletrofisiologia: um sistema robusto de aquisição eletrônica de múltiplas variáveis fisiológicas, incluindo biopotenciais elétricos, em animais em livre movimento, e um estimulador elétrico de tecido cerebral totalmente controlado por computador.

Os resultados obtidos através dos testes realizados, tanto de medição dos parâmetros elétricos pertinentes, quanto da avaliação do desempenho em experimentos reais, demonstram claramente que os equipamentos desenvolvidos atendem aos mais rigorosos requisitos da pesquisa para qual foram projetados.

A máxima amplitude do ruído inerente ao circuito do amplificador de biopotenciais implementado ($\sim 10 \mu\text{V}$) é pequena o suficiente para não perturbar significativamente o sinal registrado. A menor amplitude de sinal de interesse é de cerca de $100 \mu\text{V}$ (EEG cortical), mas considerada antes da amplificação, que eleva o sinal, na maioria das placas implementadas, ao nível de centenas de mV ou unidades de V. Portanto, o nível de ruído é bastante adequado e representa, via de regra, menos de um milésimo da amplitude do sinal.

O erro medido no ganho e frequências de corte quando comparado ao calculado ($< 10\%$) não é superior ao erro dos valores dos componentes utilizados. Nesse caso, o simples uso de resistores e capacitores de maior precisão diminuiria ainda mais a discrepância desses valores. Entretanto, não só essa diferença não representa impedimento na execução dos protocolos experimentais e na interpretação dos resultados, na maioria das vezes semiquantitativos, como um simples procedimento de calibração é capaz de obter os valores exatos dos parâmetros.

Os sistemas de registro descritos na bibliografia corrente são restritos a apenas um tipo de medida biológica (Coppola & Morgan 1987; Larsby et al. 2000; Perelman & Ginosar 2006; Rieger et al. 2006) ou se concentram em resolver um problema pontual por telemetria (Iwamoto et al. 2006; Zweizig et al. 1967) ou por memória portátil (Hoodless et al. 1980). Ainda que esses trabalhos representem significativas contribuições tecnológicas, não há menções acerca de um sistema computadorizado completo de registro de medidas eletrofisiológicas, de uso leigo, flexível e de baixo custo. O sistema descrito aqui provê esses benefícios, sendo corroborado pelos resultados mencionados, que foram obtidos por pessoal leigo em eletrônica.

Naturalmente, há dispositivos comerciais que também resolvem o problema, mas, na grande maioria das vezes, envolvem custos praticamente proibitivos para a pesquisa nacional. Mais ainda, sistemas como o CyberAmp 380® requerem a entrada de parâmetros do usuário, como frequências de corte para filtragem e ganho, o que pode ser pouco amigável para pessoal leigo e resultar em erros de configuração. Por outro lado, os módulos pré-configurados para cada medida, desenvolvidos aqui, evitam esse problema e a fácil conectividade dos módulos na interface permite flexibilidade para a montagem de diversos protocolos experimentais com diferentes conjuntos de medidas biológicas. A qualidade do sinal não ficou prejudicada por nenhum aspecto do projeto, como pode ser observado na comparação dos sinais entre sistemas desenvolvido e comercial (figura 18).

A não ser no caso de falhas graves na cirurgia de implante de eletrodos, o artefato de movimento foi totalmente eliminado, mesmo durante crises convulsivas, como poderá ser visto nos registros de EEG dos experimentos dos próximos capítulos. Em particular, o projeto atual do *headstage* representa um avanço em relação às versões anteriores (Brakel et al. 1971; Moraes et al. 2000; Sia et al. 1971). A inclusão de um

estágio de amplificação diferencial já na cabeça do animal permitiu a obtenção de sinais bipolares de ECG ou EEG de alta qualidade, permitindo inclusive a geração de vetocardiogramas livres de ruído, conforme mostrado na figura 19.

Os parâmetros elétricos do estimulador, medidos sobre uma carga resistiva pura, mostraram-se bastante adequados, comparando-se a resultados encontrados em desenvolvimentos anteriores (Jaw et al. 1995), ou os superando (Brasil & Leal-Cardoso 1999). A corrente de fuga quando desligado é bem abaixo daquela necessária para recrutar qualquer resposta fisiológica, mesmo nos casos mais sensíveis (Jaw et al. 1993). A possibilidade de usar estímulos bifásicos elimina o problema de polarização dos eletrodos, gerado por uma corrente de fuga constante diferente de zero. O estimulador desenvolvido gera pulsos de corrente constante, com alta tensão de saída e é totalmente isolado. Essas características são essenciais para aplicações em neurociências (Millar 94). A solução do desacoplamento da energia, através do uso de baterias (Jaw et al. 1995; Mavoori et al. 2005; Xu et al. 2004), só é robusta quando conta com um sistema de gerenciamento de carga das baterias. O uso de conversores DC/DC elimina esse problema.

Similarmente ao caso do sistema de registro, as soluções desenvolvidas anteriormente na bibliografia são para aplicações específicas de estimulação elétrica (Hart et al. 2006; Jalilian et al. 2007; Lanmüller et al. 2005). Como mostrado nas figuras 24, 26 e 29, o estimulador elétrico desenvolvido é capaz de entregar pulsos em uma ampla faixa de parâmetros de frequência, duração e amplitude, ainda mais quando considerada a possibilidade de substituição dos componentes em uso (banco de capacitores e potenciômetro digital) por outros de diferente valor. A possibilidade de estímulo bifásico e de inversão de polaridades adiciona flexibilidade para a configuração do estímulo. Dessa forma, o mesmo projeto poderia ser utilizado para

uma grande variedade de protocolos experimentais de neurofisiologia, conforme sugerido no início da seção. Outros estimuladores buscam resolver o problema da microestimulação cerebral por telemetria (Mavoori et al. 2005; Winter et al. 1998; Xu et al. 2004). Ainda que esses dispositivos autônomos configurem uma boa solução para a mobilidade do animal em experimento, em nenhum caso foi implementado controle digital da amplitude de corrente. Essa característica poderia ser interessante no caso de um sistema de *neurofeedback* com controle automático da intensidade de estimulação para, por exemplo, supressão de crises segundo um envolvimento maior ou menor do encéfalo no processo icogênico.

Os resultados obtidos no LTP da amígdala demonstram a aplicabilidade direta do estimulador em um contexto experimental real, sem nenhuma diferença de desempenho em relação a equipamentos comerciais.

Todo o processo para a produção desta tecnologia consumiu uma considerável parcela de tempo deste doutorado. No entanto, tendo em vista os resultados de desempenho bastante satisfatórios e o sucesso na concretização dos objetivos propostos ao se começar o trabalho e mencionados no início deste capítulo, os autores consideram este um tempo bem usado e frutífero.

A idéia de se fazer tecnologia em território nacional obviamente não é nova e todo o crédito deve ser dado aos diversos pesquisadores e inventores brasileiros que transpuseram e transpõem as diversas barreiras impostas para concretizar desenvolvimento tecnológico no país. Por outro lado, principalmente no campo da ciência biomédica, este ímpeto parece ter sido esquecido.

Apesar de todas as possíveis falhas e limitações dos dispositivos aqui descritos, os autores acreditam ter realizado uma contribuição significativa, ainda que humilde, no

sentido de reverter esse quadro, talvez muito mais no contexto da iniciativa, do que no do próprio produto final.

III – Aspectos temporais do EEG durante a ictogênese

“Nada resiste ao trabalho.”

Sabedoria popular proferida em momento propício pelo amigo de pós Marco Túlio.

Os mecanismos neurofisiológicos subjacentes ao início e desenvolvimento das crises epiléticas permanecem por serem completamente elucidados (Avoli et al. 2002; McCormick & Contreras 2001). Em particular, permanece controversa a noção de existência de um período pré-ictal nítido e detectável via análise de EEG, de maneira a permitir a predição de crises (Mormann et al. 2007). Compreender melhor os aspectos temporais do recrutamento de substratos neurais na ictogênese e seus reflexos no EEG pode auxiliar tanto na busca de parâmetros objetivos para detecção e predição de crises, bem como no desenvolvimento de contra-medidas alternativas eficazes para supressão das mesmas.

Os experimentos contidos nesta seção foram desenhados para avaliar a capacidade de metodologias correntes de detecção e predição de crises e traçar, segundo os parâmetros de análise do EEG, aspectos eletrofisiológicos da ictogênese em modelos animais de crise e Epilepsia. Resumidamente os objetivos foram: revisar, de forma objetiva, técnicas lineares e não lineares de análise dos registros para detecção ou predição de crises e; correlacionar a evolução temporal do traçado eletrográfico com os aspectos ictogênicos de hiperexcitabilidade, hipsincronismo e redes reverberantes.

Para isso, ratos foram submetidos ao modelo agudo de crise por PTZ ou ao modelo crônico de crises por pilocarpina, observando a atividade eletrográfica em níveis prosencefálicos. Foram usados eletrodos superficiais (córtex) ou profundos (amígdala e hipocampo), para avaliar distintamente a contribuição de cada estrutura no processo ictogênico e no potencial de detecção / predição da sua atividade eletrográfica. Em ambos os modelos, são recrutadas estruturas de prosencéfalo no início e durante as crises, principalmente sistema límbico (amígdala, hipocampo e tálamo) e córtex (Avoli et al. 2002; Eells et al. 2004). Portanto, a dinâmica ictogênica do período pré-ictal pode

ser captada a partir do EEG profundo (Van Quyen et al. 1999) e mesmo superficial (Van Quyen et al. 2001b), possibilitando, a priori, a predição de crises.

O modelo de PTZ foi usado para iniciar esta investigação, usando eletrodos corticais, por possibilitar a indução de crises convulsivas de forma aguda e, portanto, previsíveis (Velisek et al. 1992). O padrão seqüencial de crises mínimas precedendo crises máximas, miméticas respectivamente, de crises parciais e de crises tônico-clônicas generalizadas, permitiu um estudo mais geral dos aspectos dinâmicos da ictogênese. Este primeiro experimento serviu, também, a função prática de implementação computacional e teste das rotinas. Entretanto, o modelo distancia-se da realidade da doença por se tratar de um cérebro não epilético e por gerar crises isoladas. O modelo de Epilepsia por pilocarpina, no qual a ocorrência de crises é recorrente e espontânea, portanto imprevisível (Leite et al. 1990), contorna estes problemas, possibilitando avaliar as metodologias em um contexto que se aproxima mais do quadro clínico. Como mencionado anteriormente, o modelo tem sido descrito como um bom mimético da ELT (Cavalheiro et al. 1991; Gloor 1991), freqüentemente intratável e se deve a processo plástico epileptogênico (Mello et al. 1992; Mello et al. 1993; Parent et al. 1997) em estruturas do sistema límbico, principalmente hipocampo semelhante ao observado em pacientes (Bernardo & Prince 1981; Cavalheiro 1995). Esses aspectos reforçam, portanto, a importância da investigação de parâmetros preditores / detectores no modelo.

Paralelamente, buscou-se investigar até que ponto o comportamento dos parâmetros de análise estudados concorda ou corrobora os aspectos de hiperexcitabilidade, hipsincronismo e redes reverberantes no processo ictogênico. Isso foi feito analisando os resultados segundo os seus correlatos neurofisiológicos, conjugados aos substratos neurais e aos comportamentos convulsivos, já descritos para

cada modelo. Ao fim do capítulo, foi feita uma proposta de modelo neurodinâmico, que busca integrar os resultados obtidos ao conhecimento corrente acerca do processo ictogênico.

Em linhas gerais, a metodologia consistiu em submeter os animais à cirurgia de implante crônico de eletrodos corticais ou profundos e a indução de um dos modelos mencionados, dependendo do protocolo em questão, não necessariamente nessa ordem. Utilizando o sistema de registro desenvolvido no escopo dessa tese (vide capítulo anterior), a atividade elétrica cortical e dos substratos durante as crises nos modelos foi registrada. Para correlacionar comportamento com atividade elétrica encefálica, a imagem do rato concomitante ao registro foi gravada em VHS através do sistema de Vídeo-EEG. A partir das séries temporais capturadas, buscou-se extrair uma série de parâmetros através de rotinas matemático-computacionais para quantificar aspectos da atividade elétrica encefálica, de forma a se obter indicadores objetivos para detecção e predição das crises. Paralelamente, buscou-se inferir a respeito dos aspectos neurodinâmicos subjacentes a cada momento do desenvolvimento das crises, buscando a elaboração de um modelo que integrasse resultados eletrofisiológicos e comportamentais.

III.1 – Aspectos temporais do EEG e predição de crises por PTZ em eletrodos corticais

III.1.1 – Considerações iniciais

Além dos motivos mencionados anteriormente, uma das principais razões de se iniciar essa investigação no modelo de crises agudas por PTZ, foi o fato de que o modelo é bem descrito na literatura, é rápido e fácil de implementar e resulta em crises eletrográficas nítidas, resultado de um acometimento bastante abrangente de estruturas pelo prosencéfalo e tronco encefálico. O procedimento cirúrgico de implante de eletrodos corticais também é relativamente simples. Dessa forma, pôde-se obter, rapidamente, séries temporais da atividade elétrica encefálica dos períodos pré-ictal e ictal, concomitante a uma ampla gama de comportamentos convulsivos clássicos. Isso facilitou a execução do protocolo e permitiu uma primeira avaliação rápida das metodologias de detecção e predição de crises.

III.1.2 – Metodologia

Usaram-se 8 ratos Wistar machos, entre 200 e 300g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, o CeBIO/ICB-UFMG, sendo cada animal controle de si mesmo.

Os ratos foram submetidos à cirurgia de implante crônico de eletrodos corticais, conforme procedimento descrito mais acima.

Inicialmente, foi feito o registro de vídeo-EEG durante 10 minutos para obtenção de um trecho de EEG basal, com 1000 V/V de ganho, banda de passagem de 0,2 a 100 Hz e frequência de amostragem de 200 S/s. Após registro inicial, os animais receberam uma dose s.c. de 60 mg/kg de PTZ, conforme descrito na metodologia geral.

Imediatamente após a injeção, o registro foi reiniciado e interrompido apenas após uma hora ou a morte do animal, o que ocorresse antes.

O início da crise foi identificado eletrograficamente, por inspeção visual do registro, conforme descrito na seção de metodologia geral. Por fim, a seguinte série de análises matemático-computacionais foi realizada: energia média, energia acumulada, incrementos de energia acumulada, energia das bandas, autocorrelação, correlação-cruzada entre córtices, dimensão fractal e similaridade dinâmica. Foram consideradas significativas as deflexões das curvas além de três desvios padrão para mais ou para menos em relação à média do sinal basal.

A capacidade de detecção e predição das metodologias acima foi avaliada comparando-se os tempos das deflexões significativas em relação ao início eletrográfico.

III.1.3 - Resultados

Para todos os ratos do grupo, as duas fases comportamentais referentes a crises mínimas e máximas puderam ser distinguidas claramente, ainda que as latências para o início de cada comportamento tenham variado bastante. A primeira fase se inicia geralmente logo após o início eletrográfico, estando presentes os seguintes comportamentos em ordem: automatismos faciais (AF), abalos (MJ – mioclonic jerk) e mioclonia de membros anteriores. Para a maioria dos animais, mais tardiamente se inicia uma seqüência rápida de mioclonia de membros anteriores (MP), seguida de mioclonia generalizada (MG) e a crise tônico-clônica generalizada (CTCG). Nos outros casos, há vários episódios sucessivos de MP seguida de MG antes da CTCG. Antes de qualquer expressão motora classicamente convulsiva, estão necessariamente presentes também outros comportamentos estereotipados: exploração exacerbada e recuo em fuga.

A tabela 5 demonstra os valores médios das latências (média \pm epm) medidas para o início eletrográfico e para o início de cada fase, com relação ao momento de administração do PTZ.

Tabela 5 - Latência média para início das crises máximas e mínimas

	Início eletrográfico	Crise mínima	Crise máxima
Latência (s)	114 \pm 20	288 \pm 53	630 \pm 170

Para ilustração dos próximos resultados, tomou-se como exemplo um rato representativo (R09), cujos padrões comportamental e eletrográfico se repetem para os demais animais do grupo. Nesse caso, o início eletrográfico se deu as 106,5 s, o início da crise mínima aos 262 s e o da máxima aos 340 s (respectivamente 156 s e 234 s após o início eletrográfico). A figura 31 mostra o EEG desse rato durante o período de referência (A) e após a injeção de PTZ (B). O início eletrográfico está indicado pela seta.

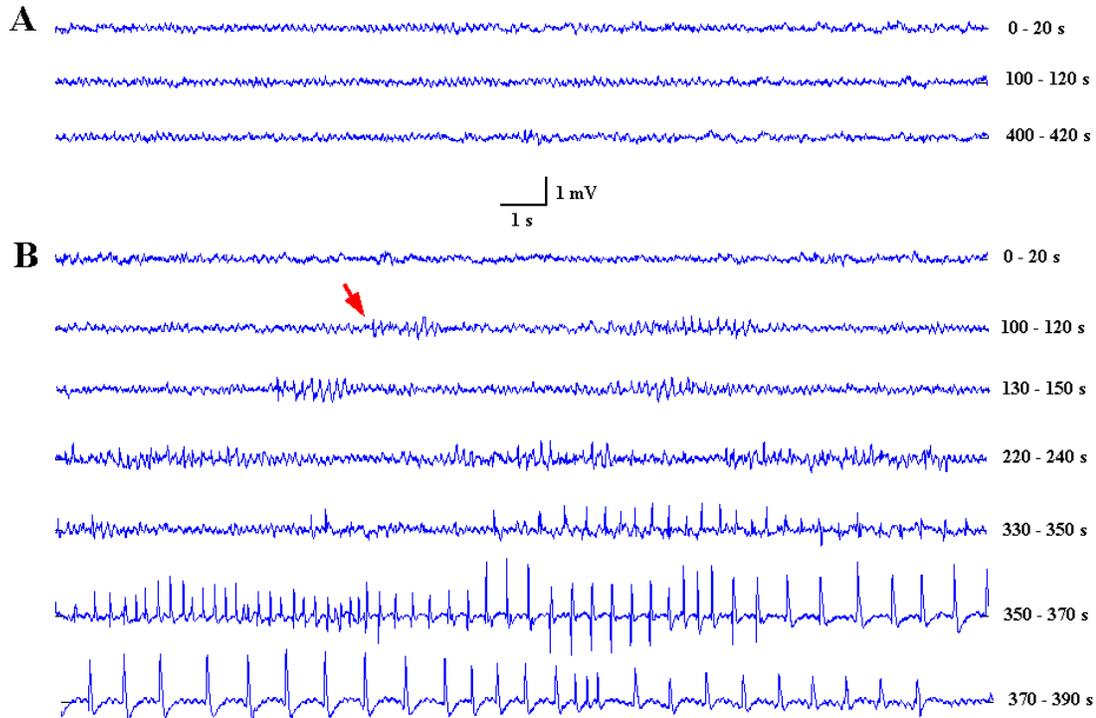


Figura 31 - EEG do CxE do rato 09 durante o período de referência (A) e após a injeção de PTZ (B). A seta indica o início eletrográfico.

A figura 32 mostra os resultados da análise linear no domínio do tempo desse rato (R09) para apenas o córtex esquerdo (resultados similares para o direito, vide tabela 6), com o EEG dos períodos pré-ictal e ictal (A) e os valores correspondentes de energia média (B), energia acumulada (C) e autocorrelação (D). A linha horizontal cheia nos painéis B e D é a média dos parâmetros em níveis basais (EEG de referência) e as linhas horizontais tracejadas indicam três desvios padrões (d.p.) para cima e para baixo. A reta inclinada do painel C mostra a extrapolação temporal da curva de energia acumulada do EEG basal, calculada a partir da inclinação média do trecho de referência. A linha tracejada vertical indica o início eletrográfico da crise, separando período pré-ictal de ictal. Esse padrão de estilo gráfico se repete, quando adequado, para as demais figuras do capítulo. Nos demais casos, as diferenças serão explicitadas.

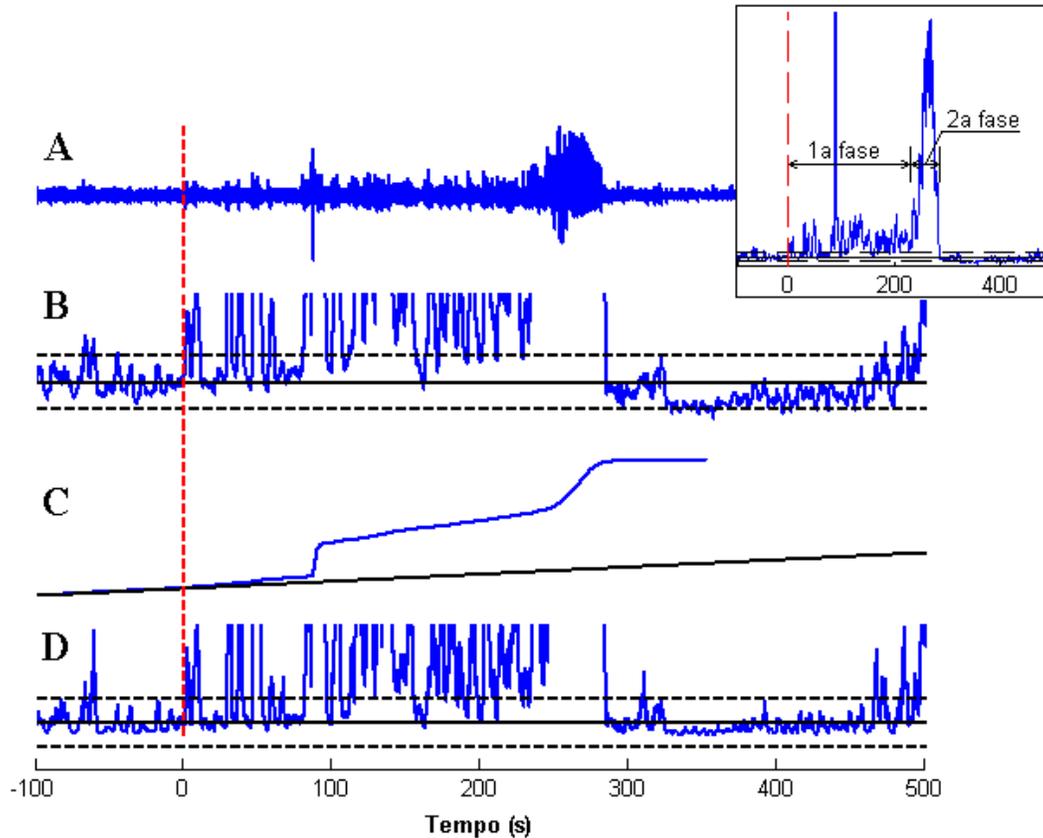


Figura 32 – EEG do CxE de um rato representativo (09) durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (separados pela linha vertical tracejada) (A) e a respectiva análise linear no domínio do tempo: energia média (B), energia acumulada (C) e auto-correlação (D).

Os três parâmetros mostram deflexões significativas, acima de três desvios padrões, imediatamente após o início da crise, mas não antes, observadas pelo cruzamento positivo das curvas para cima do nível delimitado pela linha tracejada superior e pelo desvio da curva de energia acumulada.

As duas fases comportamentais detectadas por vídeo estão claramente representadas nesses parâmetros. Na primeira fase, logo após o início eletrográfico, ainda que os parâmetros comecem a mudar desde o primeiro instante, as deflexões são de magnitude mediana (~ 8 d.p.) e intermitentes, com vários retornos aos níveis basais. Já a segunda fase, que se inicia, no caso do comportamento de R09, aos 234 s após o

início eletrográfico, reflete-se em níveis consideravelmente mais altos (> 20 d.p.) e de forma sustentada, sem retorno aos níveis basais. De fato, conforme pode ser visto no detalhe panorâmico da curva de energia na figura 32 (canto superior direito), a diferença dos níveis de deflexão é grande o suficiente para que se omita a estatística.

A figura 33 contém os resultados da análise linear no domínio da frequência para o mesmo rato, com o EEG (A) e a comparação estatística das magnitudes do espectro de potência (B). No painel inferior, a cor branca indica amplitudes de bandas de frequência acima de três desvios padrões, a cor preta amplitudes abaixo de três desvios padrão e cor cinza são todos os outros valores entre os limites estatísticos.

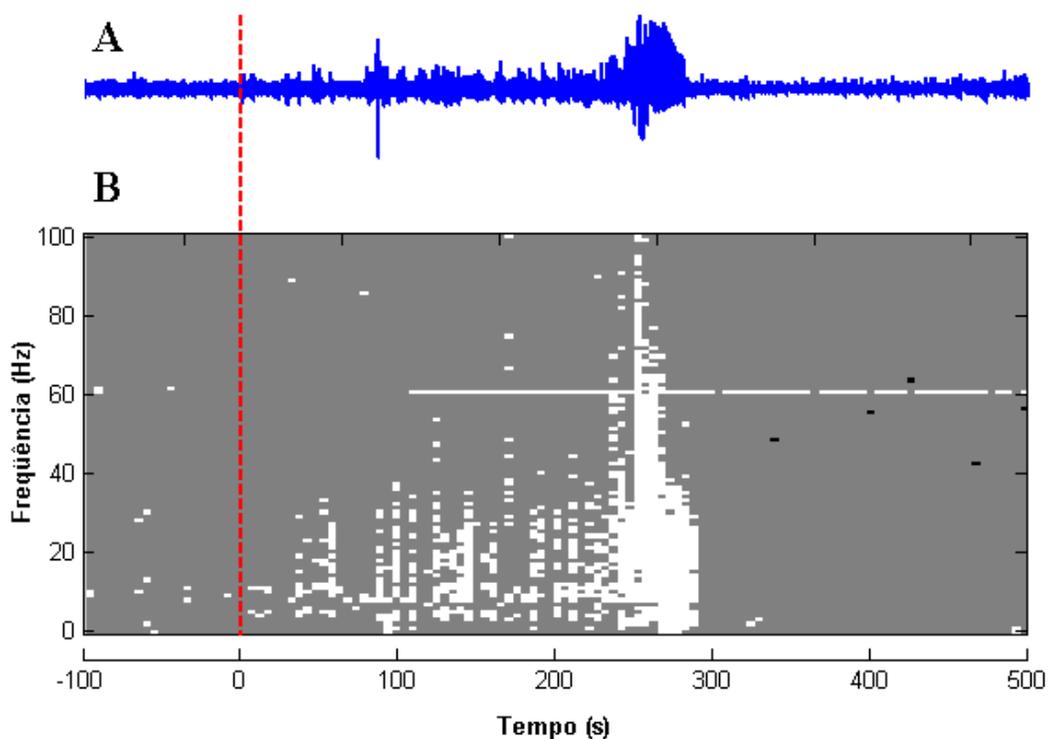


Figura 33 - Análise linear no domínio da frequência do rato 09 durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (B). O registro de EEG do CxE é mostrado (A) para comparação.

Novamente, só há uma modificação nítida do padrão após o início da crise. Em particular, o aumento da energia nas bandas alfa (7 – 14 Hz), beta (14 – 20 Hz) e teta

(4 – 7 Hz) (Steriade 1993) se dá, de forma significativa, imediatamente após o início eletrográfico e, posteriormente, alastra-se para todo o espectro, incluindo as bandas delta (0,5 – 4 Hz) e gama (> 20 Hz) (Steriade 1993) simultaneamente ao desenvolvimento completo da crise. Esses dois padrões do espectro de potência estão sincronizados com os padrões da análise no domínio do tempo e com as fases comportamentais. De fato, o aumento muito acima do limite de 3 d.p. da energia média certamente se deve, em grande em parte, à contribuição de componentes de mais alta frequência (gama) na atividade epileptiforme.

A figura 34 mostra os resultados da análise não linear ainda do rato 09, com EEG (A), a dimensão fractal do sinal (B) e a similaridade dinâmica (C). No painel mais inferior, está indicado apenas o nível 3 d.p. inferior à média da similaridade do EEG basal, através da linha horizontal cheia.

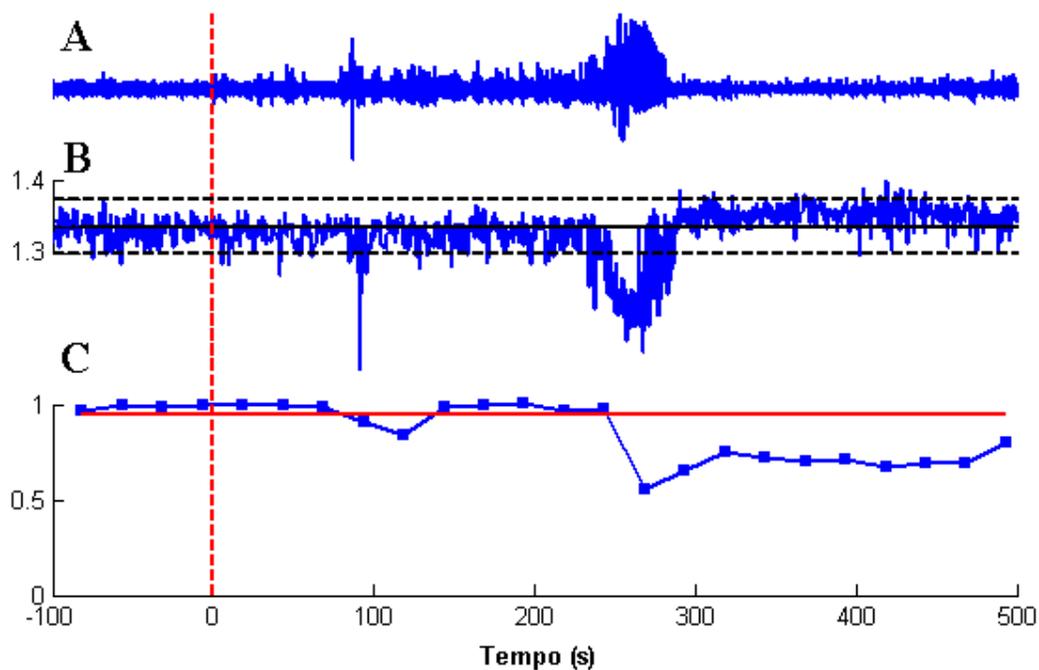


Figura 34 - Análise não linear do rato 09, com o EEG do CxE durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (A), a curva de dimensão fractal (B) e a similaridade dinâmica (C).

Ambos os parâmetros não lineares demonstram deflexão significativa para baixo apenas após o início eletrográfico, não imediatamente, e sim de uma forma tardia. De fato, a primeira deflexão significativa aparece, em ambos os valores, apenas por volta dos 100 s depois do início eletrográfico, pouco antes dos primeiros sinais comportamentais de crise. A segunda deflexão, bem mais pronunciada, aparece por volta de 250 s e se correlaciona com a segunda fase de comportamentos (crises máximas).

A figura 35 corresponde ao último grupo de parâmetros avaliados neste grupos de experimentos: a correlação cruzada entre estruturas registradas (A), nesse caso córtices esquerdo e direito, e o atraso do pico da correlação (B).

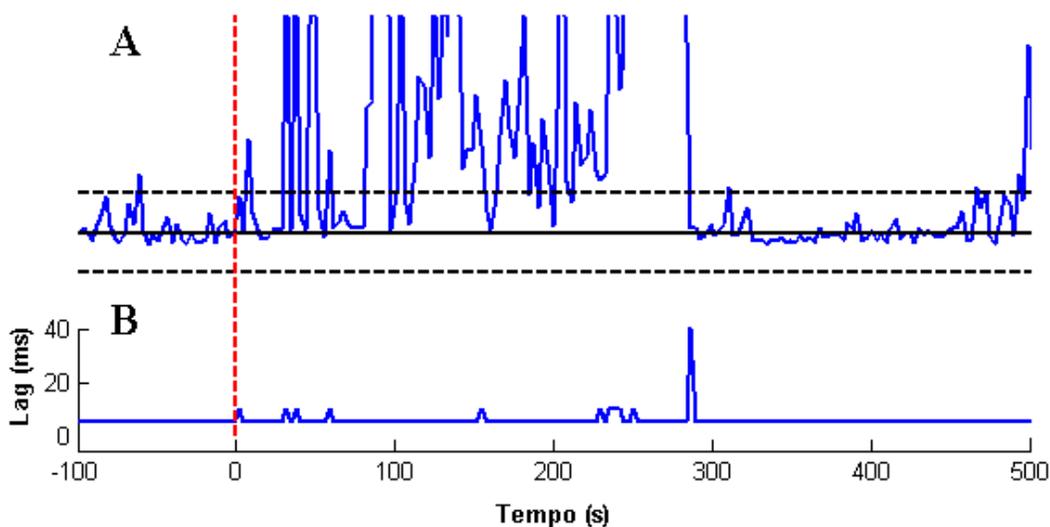


Figura 35 - Correlação cruzada entre córtices esquerdo e direito do rato 09 (A) e o atraso do pico de correlação (B).

A correlação cruzada mostra grande semelhança com os resultados da análise linear, com deflexão significativa logo após início eletrográfico e a presença de dois padrões, deflexão moderada e robusta, correspondentes, respectivamente, às duas fases comportamentais. Por outro lado, o pico da correlação cruzada não demonstra ter

qualquer sensibilidade em relação aos períodos pré-ictal e ictal, mantendo-se em 0 ms ao longo de todo registro, à exceção de pequenas e transitórias variações.

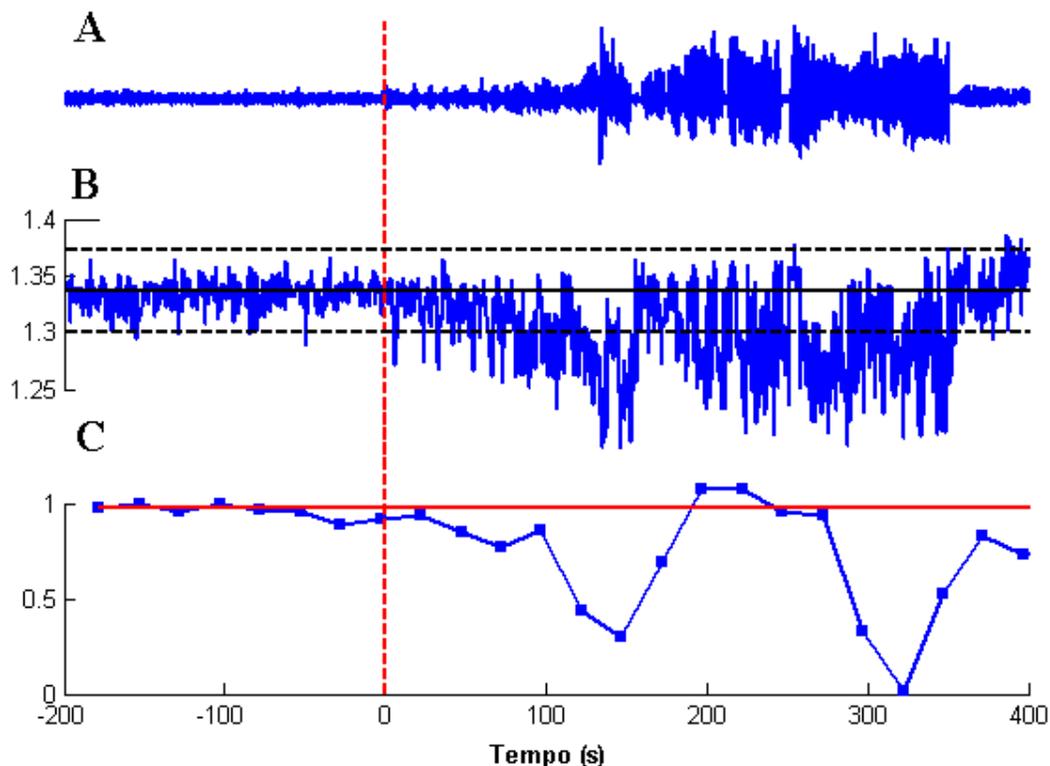


Figura 36 - Análise não linear do rato 07, com o EEG do CxE durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (A), a curva de dimensão fractal (B) e a similaridade dinâmica (C).

Esse padrão de resultado se repete para todos os ratos incluídos no grupo. Há uma única exceção digna de nota. A análise não linear do rato 07 mostra uma deflexão sutil, mas significativa e sustentada da similaridade dinâmica aproximadamente 50 s antes do início eletrográfico da crise, demonstrada na figura 36, painel C. Essa modificação não é acompanhada por nenhum dos outros parâmetros analisados, como pode ser visto observando-se o painel B dessa figura e os painéis das figuras 37 e 38, referentes às análises lineares no domínio do tempo e no domínio da frequência, respectivamente. Por outro lado, a correlação cruzada entre córtices do rato 07 mostra

níveis robustamente aumentados ainda anteriores à deflexão da similaridade dinâmica, sem, no entanto, mudanças significativas no atraso do pico da correlação, conforme está demonstrado na figura 39, painéis A e B.

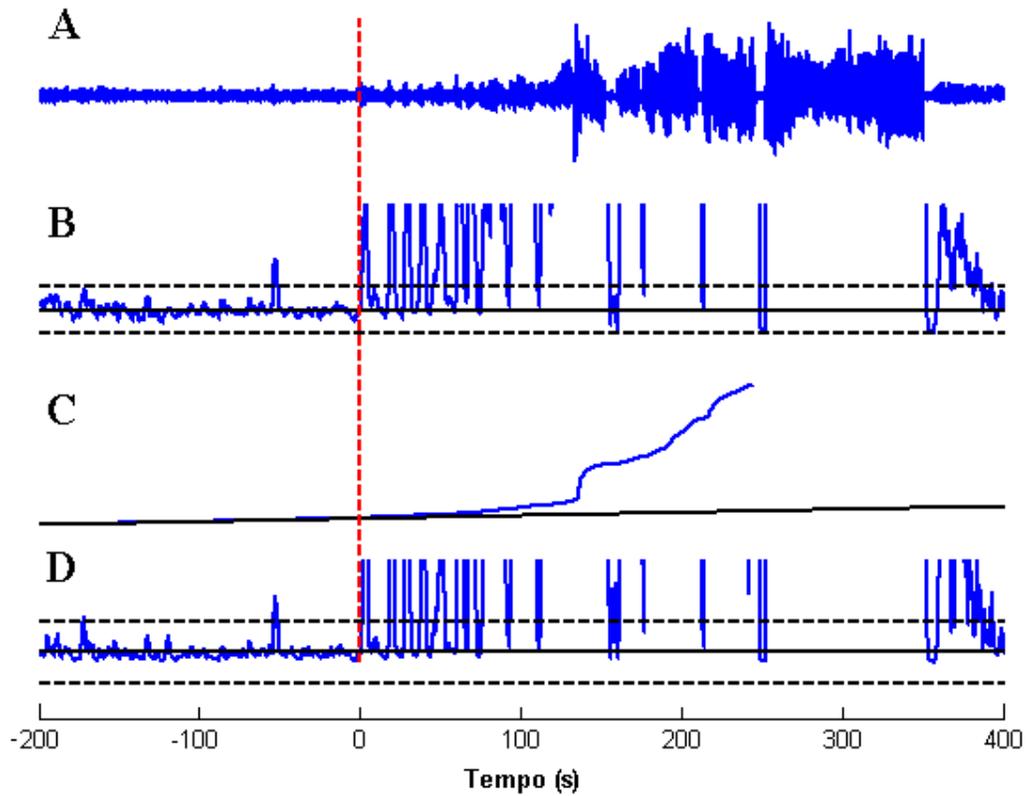


Figura 37 - EEG do CxE do rato 07 durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (separados pela linha vertical tracejada) (A) e a respectiva análise linear no domínio do tempo: energia média (B), energia acumulada (C) e auto-correlação (D).

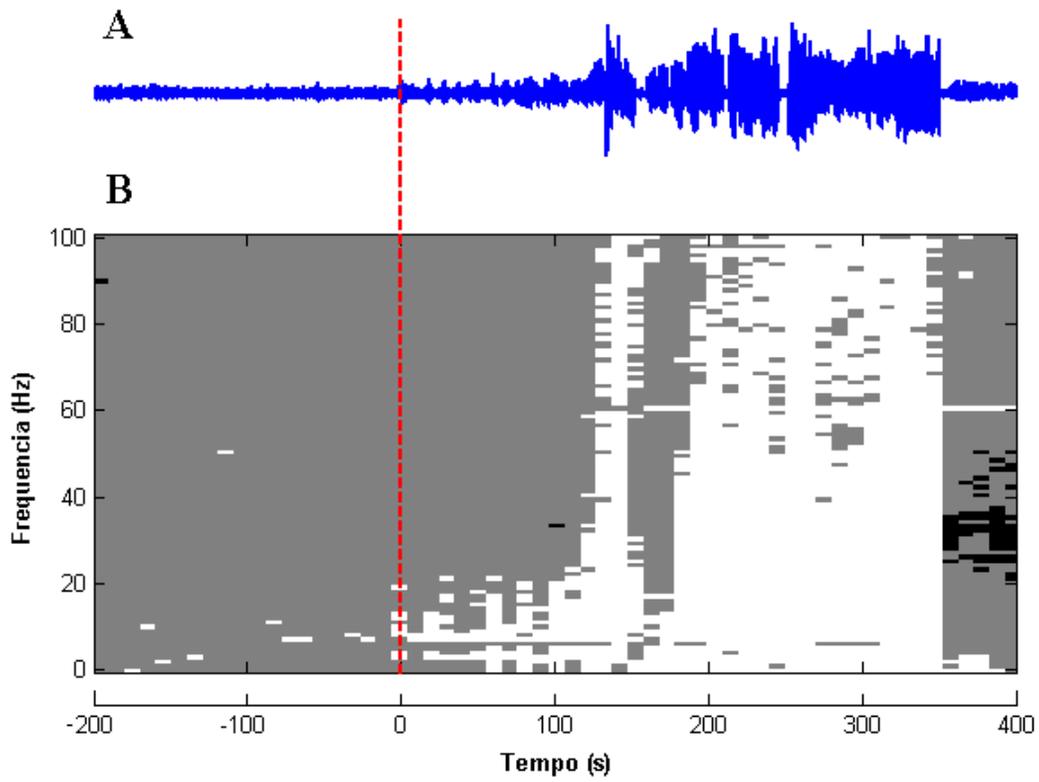


Figura 38 - Análise linear no domínio da frequência do rato 07 durante a transição do período pré-ictal para o período ictal (B). O registro de EEG do CxE é mostrado (A) para comparação.

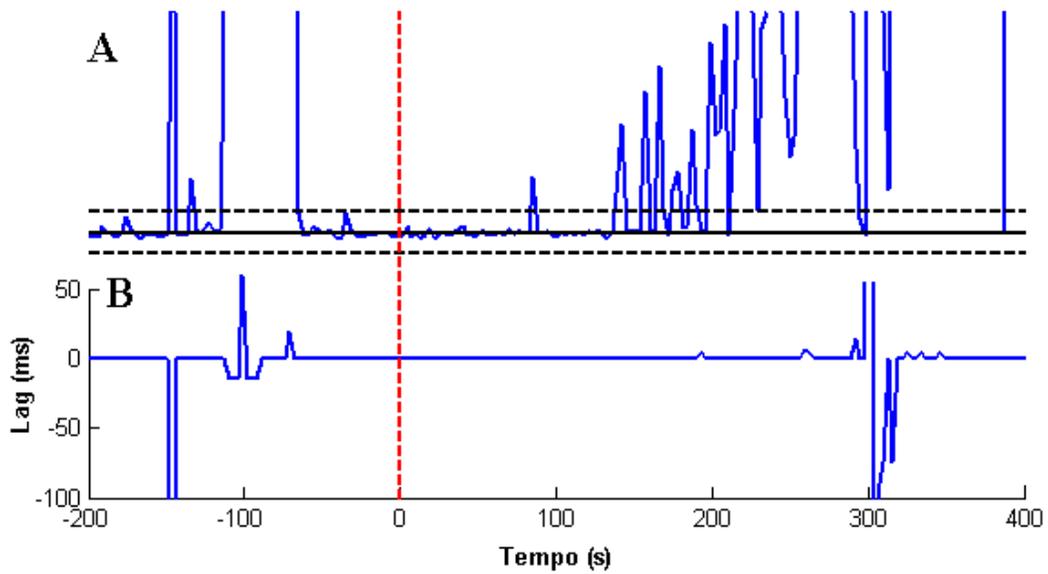


Figura 39 - Correlação cruzada entre córtices esquerdo e direito do rato 07 (A) e o atraso o pico de correlação (B).

A tabela 6 contém os valores médios dos intervalos (em segundos, média \pm epm) entre início eletrográfico e deflexões significativas de todos os parâmetros analisados, para córtex esquerdo (CxE) e córtex direito (CxD). Contém também, os intervalos entre o início das crises máximas e a segunda fase observada no padrão das curvas de energia e auto-correlação.

Tabela 6 - Intervalos entre deflexões significativas e início eletrográfico

	CxE	CxD
Energia média	12 \pm 13	25 \pm 27
Espectro de potência	5 \pm 3	101 \pm 52
Auto-correlação	23 \pm 15	11 \pm 22
Correlação cruzada	21 \pm 9	
Dimensão fractal	250 \pm 50	58 \pm 31
Similaridade dinâmica	30 \pm 20	219 \pm 47
Energia média (2 ^a fase)	38 \pm 23	198 \pm 122
Auto-correlação (2 ^a fase)	-13 \pm 37	-105 \pm 89

III.1.4 – Discussão

Conforme esperado, as crises induzidas por PTZ apresentaram nitidamente duas expressões motoras distintas, crises máximas sempre precedidas de crises mínimas, cada qual com o seu conjunto de comportamentos estereotipados (Velisek et al. 1992). Como modelo de crises parciais secundariamente generalizadas, a atividade epileptiforme gerada pelo PTZ envolve gradualmente substratos neurais no encéfalo, iniciando-se em pequenos circuitos altamente conectados, tais como o sistema límbico, para então se

propagar e abranger todo o encéfalo (Eells et al. 2004; Keogh et al. 2005). Os resultados encontrados até aqui apresentam duas fases distintas, ligadas temporalmente aos instantes de início de crises mínimas e máximas, encontrando, portanto, correlatos com a noção de recrutamento progressivo de substratos neurais. A seguir, o resultado de cada parâmetro será descrito segundo essa noção.

A energia de um sinal está intimamente ligada ao nível de atividade dos seus geradores. Em particular, o aumento da amplitude do traçado EEGráfico se correlaciona, ainda que de forma indireta (somação espaço-temporal sináptica), com taxas mais elevadas de disparo dos neurônios, com um número de neurônios ativos aumentado e com um maior sincronismo da atividade de diferentes grupos de neurônios (Lopes da Silva & Van Rotterdam 1993). Os resultados para a energia nas crises de PTZ mostram um aumento significativo concomitante a comportamentos de crises parciais seguido de um aumento muito robusto durante comportamentos mais generalizados. Esse padrão sugere, portanto, um progressivo aumento da quantidade de populações neuronais recrutadas sincronicamente no processo, iniciando-se em circuitos locais e se propagando, no fim, por circuitos mais abrangentes.

A auto-correlação de um sinal indica o quanto ele se parece consigo em diferentes justaposições no tempo. Um sinal que se repete acarreta em picos periódicos de auto-correlação e, conseqüentemente, em altos níveis da integral de correlação. A deflexão positiva da auto-correlação do EEG epileptiforme no córtex (figura 31, painel D) sugere a existência, a partir deste momento, de padrões repetitivos detectáveis, provavelmente assinaturas eletrográficas dependentes da anatomia da crise. De fato, o EEG do período ictal (vide figura 30) contém padrões estereotipados, cujo surgimento é concomitante à elevação da integral de auto-correlação. Assinaturas eletrográficas do período ictal são extensivamente usadas no diagnóstico diferencial das Epilepsias

(Niedermeyer 1998; Sakamoto & Garzon 2000) e têm sido correlacionadas com circuitos reverberantes ictogênicos específicos (Lopes da Silva 1993a; Steriade 1974; Steriade 1990). O parâmetro também evolui por dois momentos distintos, um menos outro mais robusto na deflexão da curva, sendo concomitantes às fases comportamentais. Pode-se notar através do EEG da figura 30, que os padrões polipontas durante a primeira fase do período ictal, que certamente contribuem para o aumento da autocorrelação, surgem em um padrão classicamente cunhado como “*waxing and waning*”, ou seja, crescente e decrescente, principalmente quando aplicados a fusos de sono (Steriade & Deschênes 1984). A partir do início da segunda fase, o padrão periódico composto por espículas isoladas mantém-se constante sendo, provavelmente, o responsável pelo aumento robusto no valor deste parâmetro. Extrapolando os dados obtidos neste experimento, pode-se hipotetizar que o primeiro padrão intermitente seja reflexo de sistemas endógenos de retroalimentação negativa para contenção do fenômeno de hiperexcitabilidade (Pinto et al. 2005), esgotando-se por fim e dando início à segunda fase. Este resultado e sua noção são importantes, principalmente no escopo da discussão da capacidade das análises na detecção / predição de crises que segue. Portanto, serão lembrados em momento propício.

O resultado da análise no domínio da frequência divide as contribuições para a energia total do sinal em bandas distintas de frequência. Em se considerando o fenômeno de redes reverberantes na ictogênese, o espectro de potência pode sugerir as possíveis frequências de ressonância desses circuitos. Em particular, tanto durante as crises mínimas quanto as crises máximas, foram encontrados picos de energia no espectro em torno de 4 Hz, o mesmo valor sugerido por outros trabalhos anteriores, segundo formas de análise diferentes, como inerente à reverberação de circuitos ictogênicos (Moraes et al. 2005a). Assim como no caso da energia média e da auto-

correlação, há duas fases distintas no aumento da energia pelo espectro de potência, concomitantes às diferentes fases comportamentais. Em uma primeira, o aumento se dá entre os limites aproximados de 3 - 30 Hz, espalhando-se por todo o espectro durante a segunda fase. Apesar da viabilidade da correlação frequência de pico – frequência de ressonância do circuito neural, a racionalização dos resultados obtidos pelo espectro de potência deve ser feita com cuidado: valores significativamente aumentados não estão, necessariamente, correlacionados com outras redes reverberantes possivelmente recrutadas ressonando em frequências específicas. Devido à natureza da transformada de Fourier, não só a taxa de repetição de um padrão influencia o espectro de potência, mas também o seu formato é importante. A atividade ictal durante a primeira fase é mais suave, com espículas de menor amplitude e mais lentas e aproximam-se de senóides puras. Essa característica senoidal advém do processo biofísico inerente ao registro de potenciais de campo corticais, gerados por salvas intermitentes de disparos neuronais, em níveis mais profundos (Speckmann & Elger 1993). Portanto, abrange uma banda mais estreita e limitada do espectro de potência. Por outro lado, as espículas da atividade ictal da segunda fase, têm maior amplitude e são mais rápidas, assemelhando-se a impulsos. Logo, são bem mais abrangentes no espectro de potência.

De forma análoga e paralela à auto-correlação, a correlação cruzada estudada neste experimento quantifica a semelhança da atividade EEGráfica entre os córtices direito e esquerdo. O aumento significativo do valor deste parâmetro indica, portanto, que a semelhança entre os sinais é maior após o início eletrográfico. Isso sugere que a atividade cortical no período ictal tem um causador comum ou que os hemisférios se influenciam fortemente, transferindo atividade epileptiforme entre si. Na verdade, ambas as possibilidades são viáveis, inclusive simultaneamente. Substratos neurais centrais, como o tálamo, têm recebido grande atenção como possível sincronizador

geral da atividade epileptiforme (de Guzman et al. 2004; Dempsey & Morison 1942; Hamani et al. 2004), inclusive representando um dos principais alvos para DBS no tratamento de Epilepsias (Hamani et al. 2004; Krauss & Fisher 1993). Como estrutura de acoplamento entre circuitos, outros estudos têm mostrado os importantes papéis da amígdala e do núcleo ventro-medial do hipotálamo (Eells et al. 2004; Hirsch et al. 1997). Por outro lado, sincronismo cortical bilateral é possível através do acoplamento de suas oscilações via corpo caloso. O atraso constante em zero, mesmo durante o período ictal, corrobora a noção de sincronismo da atividade entre córtices. Outro dado importante é a presença de duas fases distintas neste parâmetro, sugerindo um acometimento mais global dos córtices durante crises máximas.

Os resultados da análise não-linear permitem apenas inferências mais abstratas. A dimensão fractal de um sinal reflete os graus de liberdade com que os geradores desse sinal funcionam (Janson et al. 1998; van der Heyden et al. 1999). Um valor alto de dimensão fractal indica um sistema com muitos graus de liberdade cujos osciladores funcionam com alto grau de independência. A diminuição significativa do valor deste parâmetro indica, portanto, um menor número de graus de liberdade dos osciladores neurais cuja atividade é representada pelo EEG cortical. Isso sugere um acoplamento exacerbado destes osciladores, sejam eles estruturas isoladas ou circuitos neurais envolvendo vários substratos. É interessante observar que essa deflexão negativa da curva é tardia, correspondendo temporalmente à CTCG. Pode-se hipotetizar, portanto, que a dimensão fractal é sensível quando há um acoplamento mais global dos osciladores decorrente da generalização da atividade epileptiforme.

A similaridade dinâmica indica o quanto que a neurodinâmica representada pela imersão geométrica de um dado trecho de EEG se assemelha com a mesma representação de um trecho de referência, obtido de um período EEGráfico basal.

Portanto, a deflexão significativa deste parâmetro abaixo de 3 d.p. mostra que a neurodinâmica naquele momento é diferente da basal sem, no entanto, particularizar quaisquer aspectos dessa dinâmica. Indica, simplesmente, que o cérebro funciona de maneira distinta nos dois momentos comparados.

A avaliação acerca da capacidade de detecção e ou predição de crises, através das análises usadas nesses experimentos, pode ser realizada pelas inferências acerca da tabela 6. Considerando o intervalo entre o início eletrográfico e a primeira deflexão significativa do parâmetro, em nenhum caso, seja qual for o tipo de análise, em quaisquer dos córtices, foi encontrado um valor de intervalo negativo, indicando deflexão prévia ao início eletrográfico. Ou seja, nenhuma das metodologias foi capaz de prever as crises, ao menos nesse modelo, usando séries temporais captadas por eletrodos corticais. Por outro lado, a grande maioria delas foi sensível ao período ictal, seja durante a primeira ou durante a segunda fase, conforme descrito anteriormente. Algumas, tais como a energia média, o espectro de potência e as correlações, demonstraram, simultaneamente, uma relação temporal mais estreita com o início eletrográfico (demonstrada por menores valores de epm) e, portanto, menores valores de latência para deflexões significativas. É natural que assim seja, afinal crises epiléticas são caracterizadas por um funcionamento hiperexcitável e hipsincrônico de substratos neurais, reverberando em ciclos fechados, que progressivamente se acoplam, e os parâmetros em questão são capazes de quantificar esses aspectos. Seriam, portanto, os mais indicados, neste conjunto de metodologias, no caso de um detector de crises por PTZ. De fato, a energia do sinal na banda de 0,5 - 30 Hz foi usada para detecção automática de crises induzidas por PTZ, visando supressão das mesmas por estimulação elétrica do nervo trigêmeo (Fanselow et al. 2000).

Ainda que trazendo em si uma informação de aspecto muito geral e vago (Van Quyen et al. 2003; Van Quyen et al. 2001a), era esperado que a similaridade dinâmica fosse sensível o suficiente para detectar possíveis modificações na neurodinâmica durante o período pré-ictal, por sutis que fossem (Van Quyen et al. 1999; Van Quyen et al. 2001b). Isso não foi observado, pelo menos não no modelo de PTZ, utilizando eletrodos de registro corticais. De fato, à exceção de um rato, cuja significância há de se considerar com mais cuidado, o valor da similaridade dinâmica só se altera após o início da crise.

Nesses estudos, a capacidade de predição foi avaliada comparando-se o instante da deflexão significativa dos parâmetros investigados com o início eletrográfico definido por inspeção visual do EEG. Foi feito dessa forma por duas razões: compatibilizar a investigação atual com a bibliografia corrente (Li et al. 2003; Litt et al. 2001; Van Quyen et al. 1999) e; contemplar a relação da atividade ictal eletrográfica com crises epiléticas. A segunda razão, entretanto, merece discussão. A atividade ictal não está bi-univocamente ligada a crises epiléticas (de Paola & Gates 1998). Portanto, ainda que se detecte atividade ictal através de exames clínicos de EEG, esta não precisa acarretar, necessariamente, em convulsões ou distúrbios cognitivos. Estes casos são denominados de crises subclínicas. Portanto, a inspeção visual do EEG e as metodologias descritas nessa seção podem estar detectando crises subclínicas. Isso é fato para o caso de comportamentos motores convulsivos, que aparecem somente após o início eletrográfico e as deflexões da maioria dos parâmetros (vide quadro 5). Aspectos de disfunção cognitiva nos ratos, durante este primeiro período pré-ictal, não foram estudados nesse experimento. Apesar de que esse fato implica que a hipótese de crises subclínicas não possa ser comprovada para esse caso, três dados reforçam essa possibilidade: a) a observada manutenção de um comportamento normal de exploração

dos animais do grupo durante boa parte da atividade ictal da primeira fase; b) experimentos anteriores de nosso laboratório (não publicados), mostrando a manutenção de funções cognitivas em GEPR-3s submetidos a estímulos audiogênicos capazes de gerar corridas e atividade ictal e; c) dados clínicos (Westmoreland 1990). No cenário de que esta primeira atividade ictal represente crises subclínicas, com manutenção de funções cognitivas, os parâmetros investigados ganhariam poder de predição, já que poderiam implicar em medidas de controle prévias ao surgimento de uma condição verdadeiramente disfuncional.

Uma última consideração pertinente é o por quê da incapacidade das metodologias em predizer as crises, contrariando resultados prévios da bibliografia, principalmente no caso da energia acumulada e da similaridade dinâmica. As diferenças entre os protocolos experimentais sugerem possíveis explicações. A primeira delas é que estudos anteriores foram feitos em seres humanos e, nesta investigação, em ratos, sendo as diferenças neurofisiológicas entre os SNC das duas espécies os responsáveis pela discrepância de resultados. Outra possibilidade é a de que o período pré-ictal, ao menos no modelo de PTZ, é sutil demais para ser detectado em nível cortical. Por fim, a incapacidade em predizer as crises pode ser oriunda do fato de que, simplesmente, o modelo de PTZ é abrupto, inexistindo um período pré-ictal definido.

Os desenhos experimentais seguintes foram desenhados para contemplar algumas dessas questões.

III.2 – Aspectos temporais do EEG e predição de crises por pilocarpina em eletrodos corticais

III.2.1 – Considerações iniciais

Este experimento foi desenhado para contemplar algumas das questões suscitadas no experimento anterior, em particular, a possibilidade de que modelo de PTZ consista de uma ictogênese abrupta, sem período pré-ictal bem definido. O modelo de pilocarpina mimetiza a doença (Epilepsia) e não simplesmente o seu quadro (crises), trazendo, portanto, algumas vantagens para o estudo de técnicas de predição de crises. Primeiramente, em se tratando de um cérebro epilético, cuja anatomia patológica é similar ao caso humano, o modelo tem maior potencial de ter um período pré-ictal bem definido e pode elucidar a questão supramencionada. Segundo, o modelo gera crises espontâneas e recorrentes, portanto imprevisíveis como na clínica médica, ao contrário do caso anterior. Dessa forma, as técnicas podem ser avaliadas em um contexto mais correlacionado à realidade da doença. Por fim, para que seja possível captar o EEG das crises espontâneas, é necessário fazer longos registros. Isso permite a avaliação, também, da influência de outros processos neurofisiológicos, tais como o sono, no comportamento dos parâmetros investigados.

Em paralelo, uma vez que a ação do modelo é mais localizada, principalmente no sistema límbico, foi possível observar como que a reverberação nesse circuito influencia os parâmetros analisados.

III.2.2 – Metodologia

Utilizamos 24 ratos Wistar machos, com 39 dias de idade, provenientes do CeBIO/ICB-UFMG. Cada animal é controle de si mesmo.

Todos os 24 animais foram inicialmente submetidos à indução do modelo de epilepsia por pilocarpina, conforme descrito na metodologia geral.

Após 15 dias, os animais foram submetidos a implante de eletrodos corticais (CxE e CXD), conforme descrito na metodologia geral, e permaneceram de cinco a sete dias no pós-cirúrgico para recuperação.

Registrou-se então, continuamente, seis horas de vídeo-EEG com 1000 V/V de ganho, banda de passagem de 0,2 a 100 Hz e frequência de amostragem de 200 S/s.

A definição de início eletrográfico obedeceu aos mesmos critérios do experimento anterior. Por se tratar de registros mais longos, a análise das séries temporais foi um pouco mais elaborada, feita conforme se segue. Primeiramente, revisando-se a fitas de vídeo, buscamos períodos de 300 s em que o animal permaneceu sem crises e em vigília de onde retiramos registros basais. O próximo passo foi estimar o início eletrográfico, confirmando o valor exato por inspeção visual do registro. Trechos de 250 s, com o início eletrográfico centralizado em 125 s, foram separados para cada crise. Em cima destes trechos e também nos registros completos, os mesmos procedimentos matemático-computacionais descritos anteriormente foram executados, avaliando paralelamente as respectivas capacidades de detecção e predição.

III.2.3 – Resultados

Dos 24 animais iniciais, restaram apenas 5 que superaram todas as etapas do experimento e seus critérios de exclusão, nessa ordem: sobrevivência à indução do modelo, efetividade da indução, sobrevivência no pós modelo e ocorrência de crises espontâneas durante o registro.

Para a descrição dos resultados, consideramos um rato (11) cujo padrão comportamental e eletrográfico representa o de todo o grupo.

A análise do vídeo mostra a ocorrência de um padrão de crises típico do modelo de pilocarpina com comportamentos convulsivos parciais aparecendo na seguinte ordem: episódios repetidos de mioclonia de membros anteriores seguida rapidamente de elevação (rearing) e queda (Racine 1972a). Em algumas crises de alguns poucos ratos, o comportamento foi bem mais sutil, consistindo apenas de mastigação ou recuo em fuga. Nesses casos, a categorização do episódio como crise se baseou inteiramente no registro de EEG com atividade epileptiforme nítida.

A latência a partir do início eletrográfico para o aparecimento do primeiro comportamento convulsivo foi de 7 ± 2 s.

O EEG do CxE do rato 11 está demonstrado na figura 40, que mostra um trecho inter-ictal (A) e os trechos pré-ictal e ictal (B) separados pela seta que marca o início eletrográfico. No fundo do painel B, detalhes da morfologia das ondas estão ressaltados (detA, detB e detC), mostrando as primeiras espículas do período ictal e morfologia típicas de polipontas e polipontas sobre descargas paroxísticas. A figura 41 mostra trechos e detalhes de EEG registrados nos outros animais do grupo, mostrando que os padrões de morfologia se repetem.

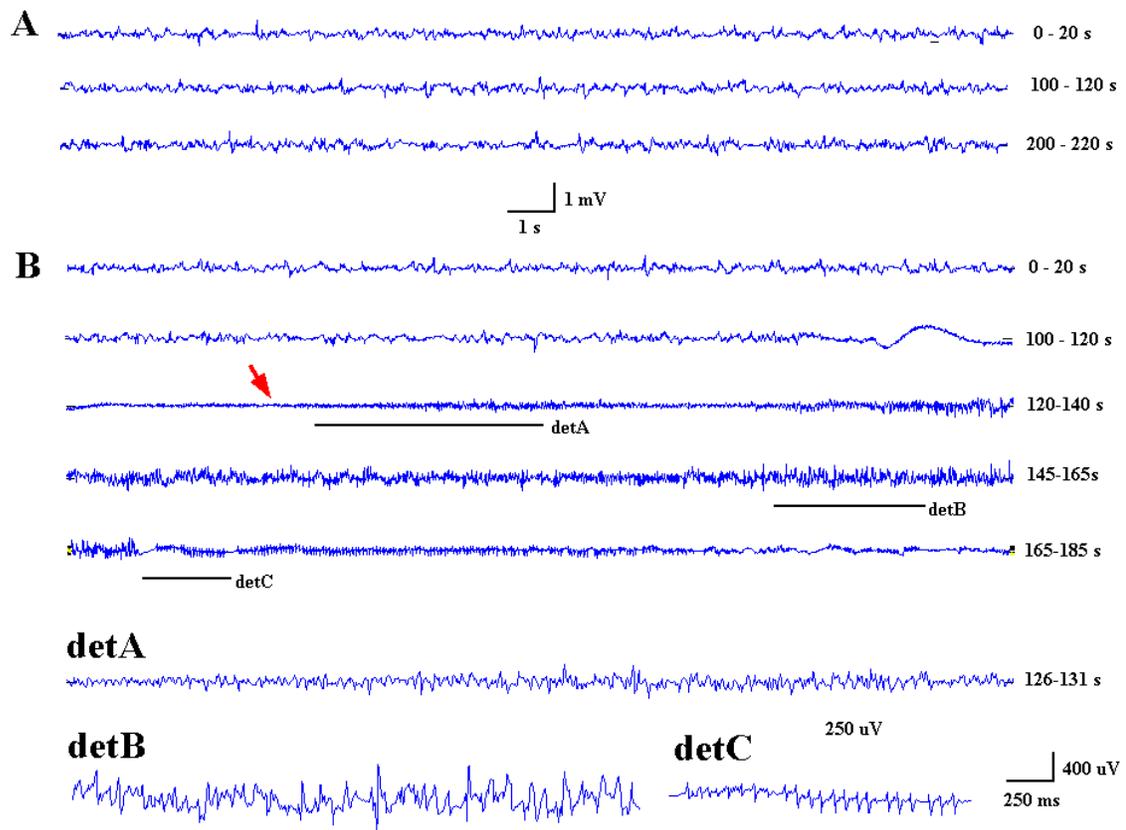


Figura 40 - Trechos de EEG do CxE de um rato representativo (R11) no período inter-ictal (A) e nos períodos pré-ictal e ictal (início eletrográfico indicado pela seta) (B), incluindo detalhes amplificados da morfologia (detA, detB, detC).

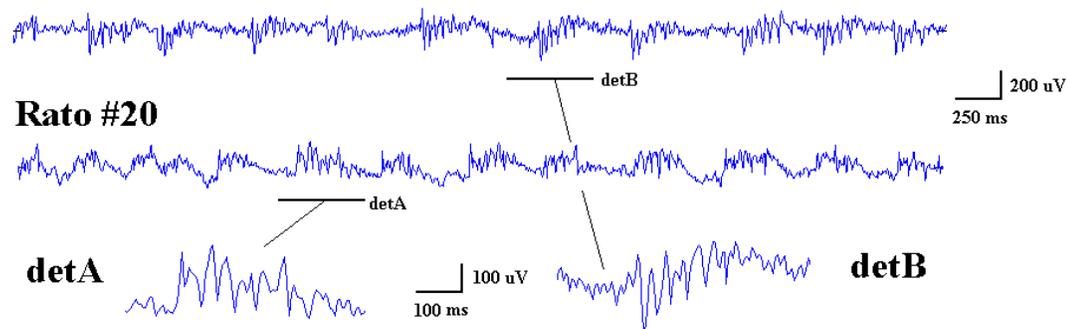
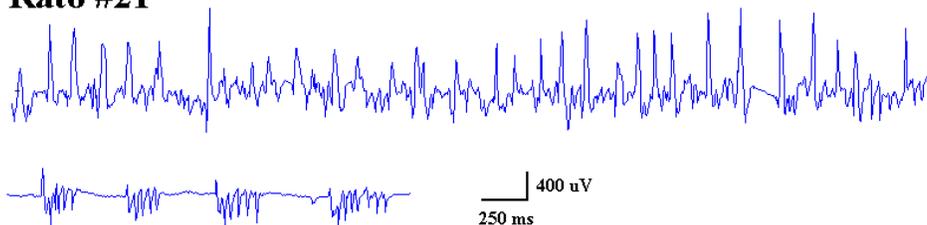
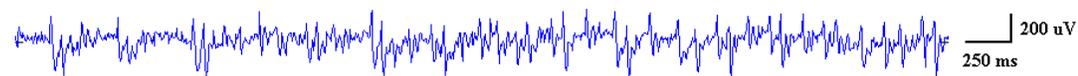
Rato #14**Rato #21****Rato #23**

Figura 41 - Trechos e detalhes do EEG ictal do CxE de outros ratos do experimento.

A análise linear no domínio do tempo, mostrada na figura 42, traz resultados similares aos obtidos no experimento anterior, contendo o resultado da energia média (A), energia acumulada (B), incrementos de energia acumulada (C) e autocorrelação (D) do EEG do córtex esquerdo durante uma única crise. Duas diferenças devem ser realçadas, entretanto. A primeira é a inexistência de duas fases distintas nos padrões de resposta, tanto das curvas de energia quanto da curva de autocorrelação. Há apenas uma deflexão positiva significativa e sustentada ocorrendo logo após o início eletrográfico. A segunda diferença é uma deflexão significativamente negativa anterior à positiva, aparecendo mesmo antes do início eletrográfico. Essa fase das curvas está diretamente ligada a um nítido período eletrodecremental do EEG que precede a atividade

epileptiforme. O padrão eletrodecremental é geral, apesar de ter tido significância estatística em apenas 2/5 dos ratos do grupo.

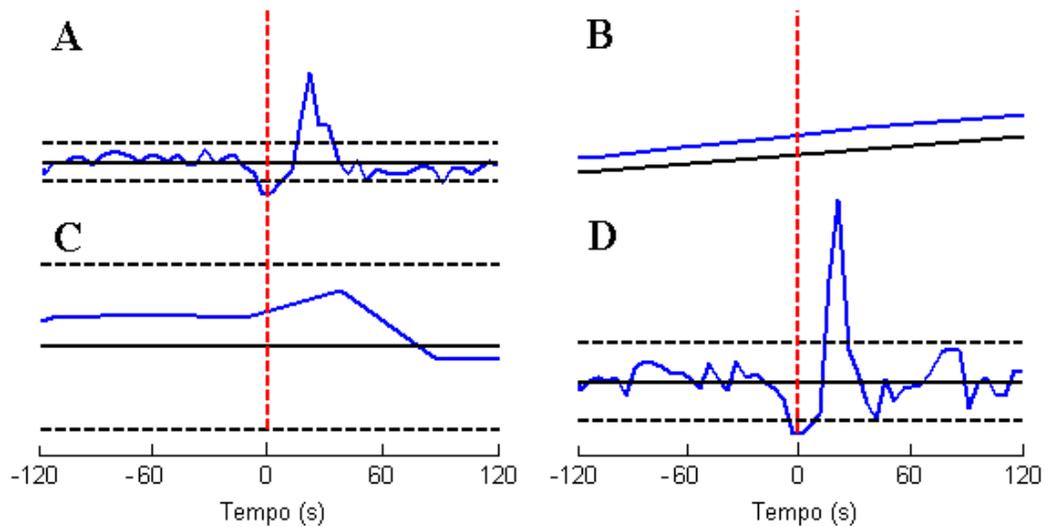


Figura 42 - Análise linear no domínio do tempo de uma única crise de um rato representativo (R11 - CxE), contendo a energia média (A), energia acumulada (B), incrementos de energia (C) e autocorrelação do sinal (D).

O período eletrodecremental é refletido também na análise linear no domínio da frequência, representada na figura 43, que contém, concatenados, 250 s de EEG no período inter-ictal, 125 s de pré-ictal e mais 125 s de período ictal (A), o correspondente espectro de potência dessa concatenação (B) e a comparação estatística das amplitudes do espectro (C). Há uma região de pontos pretos (amplitudes menores que 3 d.p.) nas bandas delta e teta que aparece antes do início eletrográfico. Após este ponto há um aumento significativo generalizado por todo o espectro de potência, à exceção daquelas bandas.

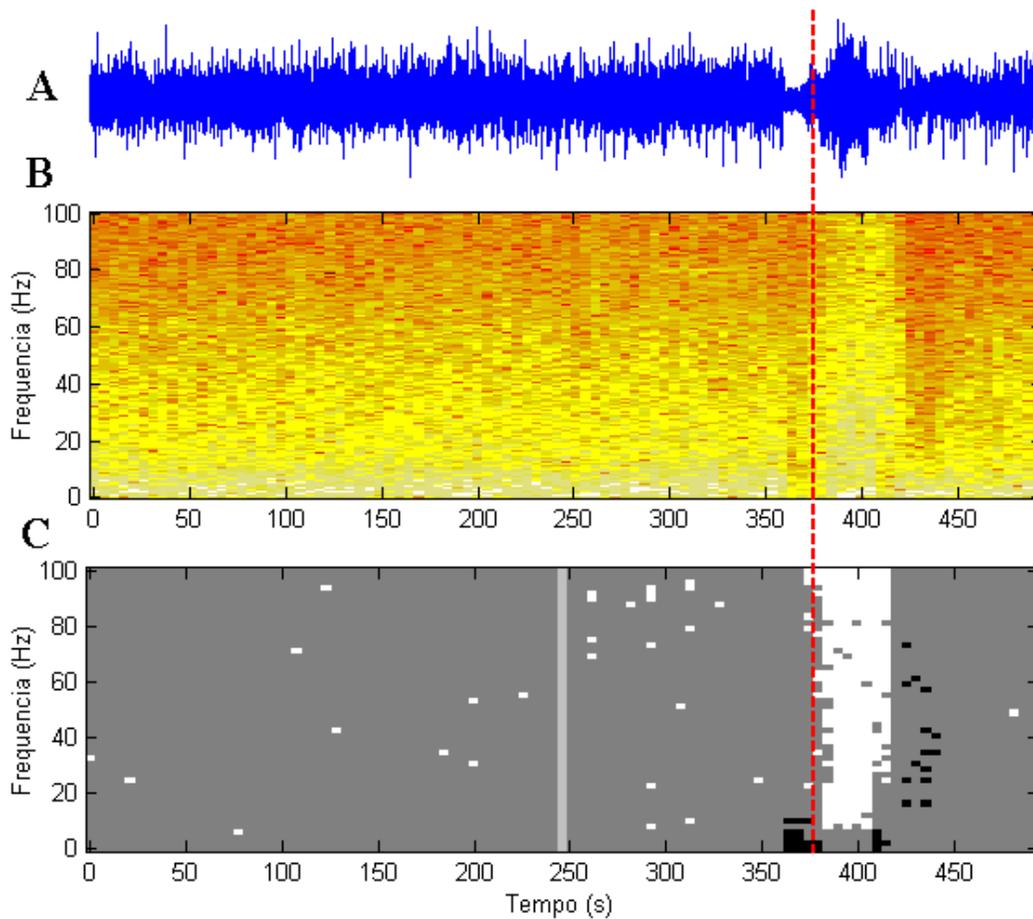


Figura 43 - Análise linear no domínio da frequência do rato 11, CxE. EEG inter-ictal de referência (até 250 s), pré-ictal (até 375 s) e ictal concatenados (A), espectro de potência (B) e comparação estatística do espectro de potência (C).

A correlação cruzada entre córtices esquerdo e direito, mostrada na figura 44, revela a manutenção do padrão de significância da correlação (A) após o início eletrográfico, apesar de tardio, com atraso do pico mantido rigorosamente em zero ms (B). Para esta figura, utilizamos os resultados oriundos de outro rato (14), por razões simplesmente de estética gráfica sem, no entanto, perda de generalidade da informação.

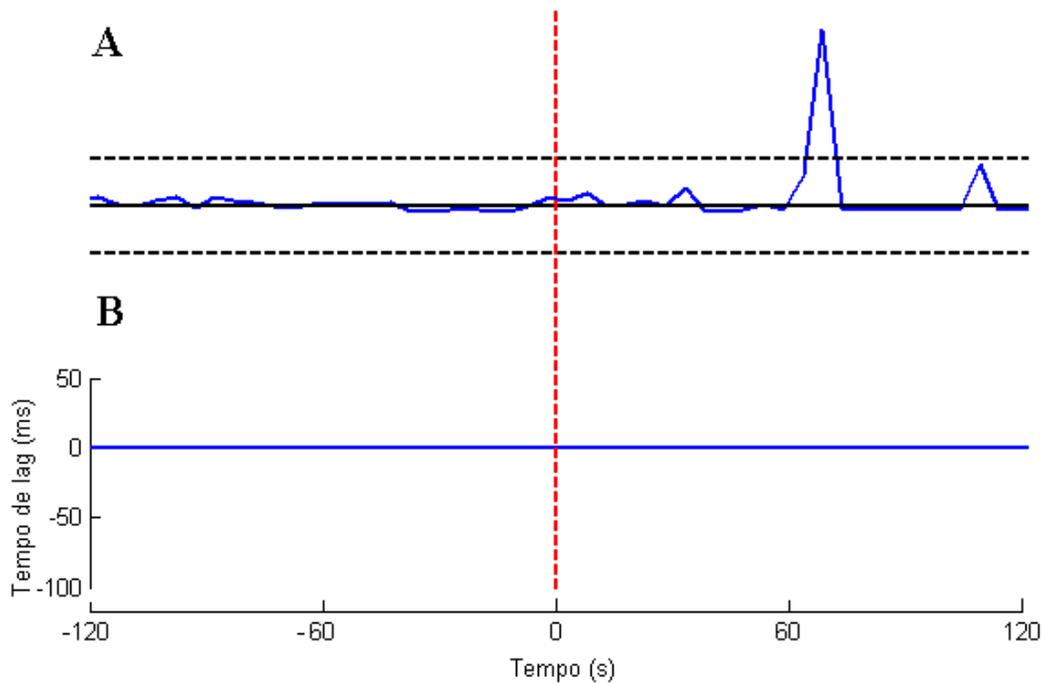


Figura 44 - Correlação cruzada entre córtices de um rato ilustrativo (14), durante uma única crise, com a magnitude da correlação (A) e o atraso do seu pico (B).

Os resultados da análise não linear do rato 11 são mostrados na figura 45, que mostra as curvas de dimensão fractal (A), referentes a um trecho basal (traço preto por cima) e a três trechos de crises (pré-ictal + ictal) e as curvas de similaridade dinâmica dos mesmos trechos (B). Não há qualquer significância estatística na dimensão fractal, mas o padrão da dimensão fractal revela dois aspectos interessantes. O primeiro é o aumento do valor do parâmetro, ao invés da esperada diminuição. O segundo é que, ainda que não significativo, o padrão é modificado anteriormente ao início eletrográfico, precedendo-o cerca de 20 s. A similaridade dinâmica fica significativamente diminuída em dois momentos da crise, imediatamente após o início eletrográfico, mas de forma não sustentada e tardiamente, cerca de 75 s após o início eletrográfico, com uma deflexão mais prolongada.

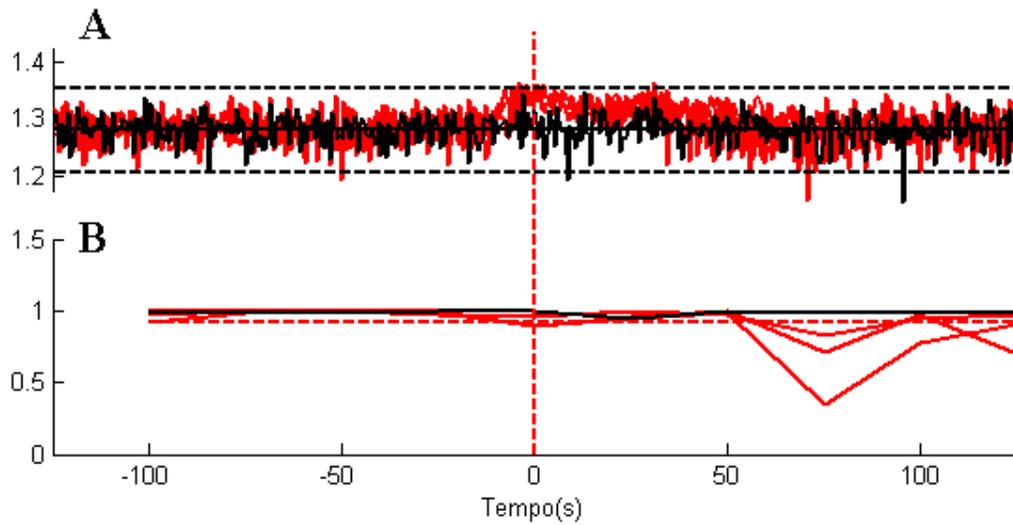


Figura 45 - Análise não linear de três crises do rato 11, CxE, com a dimensão fractal (A) e a similaridade dinâmica (B). As curvas referentes aos períodos basais estão em preto e as referentes à transição pré-ictal para ictal, estão em cinza.

A tabela 7 resume os valores dos intervalos entre o início eletrográfico e as deflexões significativas de cada parâmetro investigado.

Tabela 7 - Valores das latências a partir do início eletrográfico das deflexões positivas dos parâmetros

	CxE	CxD
Energia média	21 ± 14	39 ± 12
Espectro de potência	7 ± 7	15 ± 6
Auto-correlação	29 ± 13	29 ± 15
Correlação cruzada	33 ± 17	
Similaridade dinâmica	45 ± 7	61 ± 14

III.2.4 – Discussão

Pilocarpina é um modelo de epilepsia de lobo temporal, gerando crises tipicamente límbicas que recrutam estruturas de lobo temporal como amígdala, hipocampo e córtex entorrinal. Raramente a atividade epileptiforme neste modelo se propaga para estruturas extra-temporais ou se generalizam (Sanabria & Cavalheiro 2000).

A análise dos vídeos das crises corrobora essa idéia, uma vez que os animais apresentam apenas uma fase de comportamentos: aqueles estereotipados típicos de crises límbicas e nunca comportamentos generalizados como MG ou CTCG.

Essa fase única da expressão motora da crise se reflete nos parâmetros analisados, a começar pelas curvas de energia e autocorrelação, que mostram uma única deflexão positiva significativa após o início eletrográfico. No espectro de potência, os comportamentos convulsivos também estão associados com um único padrão uniforme de elevação das amplitudes no espectro de potência de forma generalizada das bandas alfa, beta e gama. A explicação aqui é similar à da segunda fase dos parâmetros no modelo de PTZ: o espalhamento por todo espectro de potência é devido, principalmente, ao formato de onda da espícula, que pode ser modelada por uma função impulso, cuja transformada de Fourier abrange todo o espectro.

Paralelamente, há uma atividade eletrodecremental que precede o início eletrográfico, está refletida por valores significativamente inferiores de energia e de potência em frequência, nas análises lineares no domínio do tempo e da frequência, mas não é acompanhada de nenhum comportamento epiléptico distinguível. Há de se considerar o significado fisiológico disso, confrontando o caráter preditor do achado com possibilidade de que ele já representa a crise. Mais abaixo faremos essa discussão.

Assim como no experimento anterior, a curva de correlação cruzada entre córtices apresenta uma deflexão positiva após o início da crise, sempre com atraso zero. Em se tratando de um modelo cuja atividade epileptiforme se restringe preferencialmente a estruturas de lobo temporal, esse padrão pode ser explicado pelo envolvimento bilateral e hipersincrônico de circuitos epileptogênicos profundos (Imamura et al. 2001b), provavelmente com a participação de amígdala e hipocampo (Bertram et al. 1998), cuja atividade é transmitida para os níveis corticais e de estruturas prosencefálicas.

Ainda que sem significância estatística, o formato de onda da dimensão fractal é intrigante. Primeiramente, o valor do parâmetro aumenta, ao invés de diminuir, o que era de se esperar para um sistema cujos osciladores se acoplam, perdendo graus de liberdade. Possivelmente, assim como sugerido no experimento anterior, é necessário que o acoplamento de osciladores neurais seja mais extenso e abrangente, como durante a generalização da atividade epileptiforme, inexistente nas crises desse modelo, para que isso seja refletido por uma diminuição significativa da dimensão fractal medida a partir do EEG em nível cortical. O aumento poderia, de outra forma, ser explicado por uma desconexão da atividade em nível cortical com os níveis mais profundos, já envolvidos no processo disfuncional da ictogênese, contando, portanto, com maior nível de independência de seu funcionamento. O segundo aspecto interessante da curva de dimensão fractal é a deflexão ocorrendo antes do início eletrográfico. Poder-se-ia sugerir que tal indica alguma relação com o período eletrodecremental, por estarem ligados temporalmente. Entretanto, se assim fosse, essa deflexão deveria se extinguir logo após o início eletrográfico, momento no qual a atividade ganha energia e o período eletrodecremental também se extingue. Outra possível explicação é que o processo de

desconexão córtex – níveis profundos, mecanismo sugerido para explicar o padrão da curva de dimensão fractal, ocorra, de fato, antes do início eletrográfico.

A similaridade dinâmica se altera de forma sutil, mas significativamente, logo após o início eletrográfico, refletindo a neurodinâmica reconhecidamente diferenciada do período ictal. A sutileza da deflexão pode ser explicada pelo mascaramento oriundo da escolha do trecho basal com atividade inter-ictal bastante intensa, repleto de espículas isoladas. A segunda deflexão significativa, mais tardia, não se correlaciona, a priori, com qualquer aspecto mais óbvio do EEG. É possível que esta alteração no padrão do parâmetro reflita algum processo endógeno de contenção da crise cuja dinâmica seria bastante diferente dos períodos basais.

Quanto à capacidade de predição e detecção dos parâmetros observados, algumas conclusões podem ser feitas. O aumento dos valores de energia e de correlação aparece em todas as crises de todos os ratos, sugerindo um possível detector adequado. Por outro lado, tal padrão não está bi-univocamente ligado ao surgimento das crises, sendo inerente também a processos fisiológicos como o sono ou de atividade inter-ictal mais intensa, ainda que não epileptiforme (dados não mostrados). Isso acarretaria, caso o parâmetro fosse usado como alarme, em um número elevado de falsos positivos.

A possível predição dada pelas deflexões dos parâmetros correlacionados com o período eletrodecremental deve ser colocada em perspectiva. Primeiramente porque o fenômeno não ocorreu para todos os ratos estudados, não servindo como um preditor geral. Segundo, a capacidade preditiva tem como referência o instante de tempo em que começam a aparecer, de forma sustentada, espículas no EEG (início eletrográfico). Ainda que essa deflexão seja anterior a este marcador consagrado para delimitar o início da crise, nesse instante de tempo o processo de ictogênese pode já ter se desenvolvido a

tal ponto (Babb et al. 1987) a fazer com que o alarme perca o seu objetivo: a tomada de contra-medidas eficazes em proteger o encéfalo e o indivíduo do evento epiléptico.

As deflexões anteriores ao início eletrográfico das curvas de dimensão fractal, apesar da tendência, nunca demonstraram significância estatística.

A similaridade dinâmica só teve deflexões significativas durante os períodos ictais, não sendo, portanto capaz de prever crises, ao menos nesse modelo com a dinâmica neural representada em níveis corticais por eletrodos superficiais.

Mais ainda, há deflexões durante períodos inter-ictais, provavelmente correlacionados com episódios de sono com neurodinâmica bastante distinta.

Os substratos neurais subjacentes às crises límbicas têm sido largamente explorados e vários deles foram identificados. Amígdala, hipocampo e córtex entorrinal são núcleos importantes (Avoli et al. 2002; McCormick & Contreras 2001), recebendo influência sincronizadora do tálamo. Portanto, há, na verdade, diversas redes reverberantes no sistema límbico que se acoplam e se sincronizam para o desenvolvimento da crise. Uma possível explicação para a incapacidade de predição de crises das metodologias aqui usadas pode advir exatamente da localização anatômica das crises límbicas em modelos animais. Apesar de abrangerem estruturas de prosencéfalo, a atividade ictogênica do período pré-ictal parece não estar representada no córtex parietal, local de posicionamento dos eletrodos neste experimento. Portanto, torna-se importante investigar o modelo, reavaliando as técnicas, a partir de registros profundos, com eletrodos localizados no sistema límbico.

III.3 Aspectos temporais do EEG e predição de crises por pilocarpina em eletrodos profundos

III.3.1 – Considerações iniciais

Para dar continuidade à avaliação das metodologias de detecção / predição de crises, optou-se por repetir o modelo mais realístico da pilocarpina, usando eletrodos localizados em estruturas descritas como diretamente envolvidas no processo ictogênico e mesmo epileptogênico. Adicionalmente, foi importante esse reposicionamento dos eletrodos para avaliar a influência de outros processos neurofisiológicos nos parâmetros da atividade registrada nesses substratos.

Paralelamente, este experimento propiciou o estudo de aspectos temporais do EEG de forma mais restrita anatomicamente a estruturas específicas, diretamente envolvidas no processo ictogênico do modelo em questão: amígdala e hipocampo.

III.3.2 – Metodologia

A metodologia para indução do modelo, para a determinação do início eletrográfico e para a análise computacional é rigorosamente a mesma do experimento anterior. Três únicas diferenças devem ser mencionadas. Primeiramente foi usado um número inicial de ratos menor: 18. Ao invés de eletrodos corticais, foram implantados eletrodos bipolares profundos, em CA1 do hipocampo ventral e no núcleo basolateral da amígdala, ambos do lado direito, conforme procedimento descrito na metodologia geral. Por fim, os parâmetros do registro também são diferentes dos usados nos outros experimentos: banda de passagem dos filtros de 0,2 a 400 Hz; ganho de 1000 V/V e; taxa de amostragem de 1000 S/s.

III.3.3 – Resultados

Apenas 3 animais atenderam a todos os critérios de exclusão que são os mesmos do experimento anterior com um adicional: o correto posicionamento dos eletrodos nas estruturas alvo confirmado pelo procedimento histológico.

O comportamento observado nesse grupo de animais, concomitante com atividade epileptiforme, foi diferente do que é esperado de uma crise límbica com expressão motora típica, incluindo mioclonias, elevação e queda (Racine 1972a). Os ratos apresentaram, ao contrário, um comportamento bem mais sutil: congelamento seguido de recuo em fuga. O que nos leva a acreditar que, de fato, trata-se de um comportamento convulsivo, é a simultaneidade com um padrão eletrográfico epileptiforme e a repetição estereotipada do comportamento entre ratos e entre crises de um mesmo rato. Isso poder ser devido ao fato dos registros terem ocorrido 55 – 65 dias após a indução do modelo.

Este comportamento ocorreu simultaneamente ao início eletrográfico, até onde foi possível avaliar, devido à sutileza dessa expressão. Qualquer tentativa de quantificar o intervalo entre início eletrográfico e instante de início desse comportamento sutil, correria grande risco de resultar em erro, ou viés subjetivo.

A figura 45 mostra os traçados EEGráficos registrados com eletrodos na amígdala (AMY) e hipocampo (HP) durante um período inter-ictal de referência (A) e durante a transição do período pré-ictal para ictal (B) para um rato representativo do grupo (05). O padrão epileptiforme é nítido, contendo principalmente salvas de polipontas.

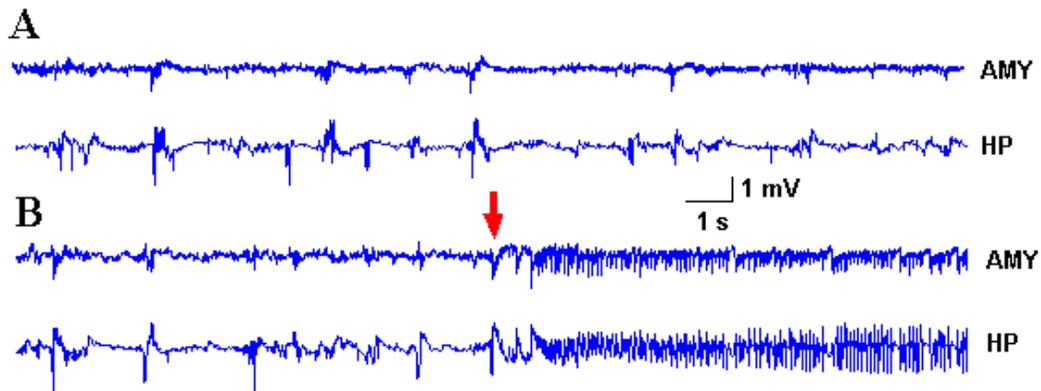


Figura 46 - Trechos do EEG do rato 5 na amígdala (AMY) e no hipocampo, durante o período inter-ictal (A) e na transição de pré-ictal para ictal (B) com fronteira demarcada pela seta.

As análises lineares no domínio do tempo e da frequência para o hipocampo deste rato, figuras 46 e 47, respectivamente, mostram padrões bastante similares daqueles encontrados no experimento anterior com pilocarpina. Há deflexões únicas positivas e significativas de energia média (figura 46 painel A), incrementos de energia acumulada (figura 46 painel B) e autocorrelação (figura 46 painel C) e uma ampla abrangência de aumento de potência por todo o espectro (figura 47), logo após o início eletrográfico. Não há, no entanto, período eletrodecremental que antecede o início eletrográfico, talvez, característica deste tipo de crise. Os resultados para amígdala são análogos e, portanto, não serão mostrados.

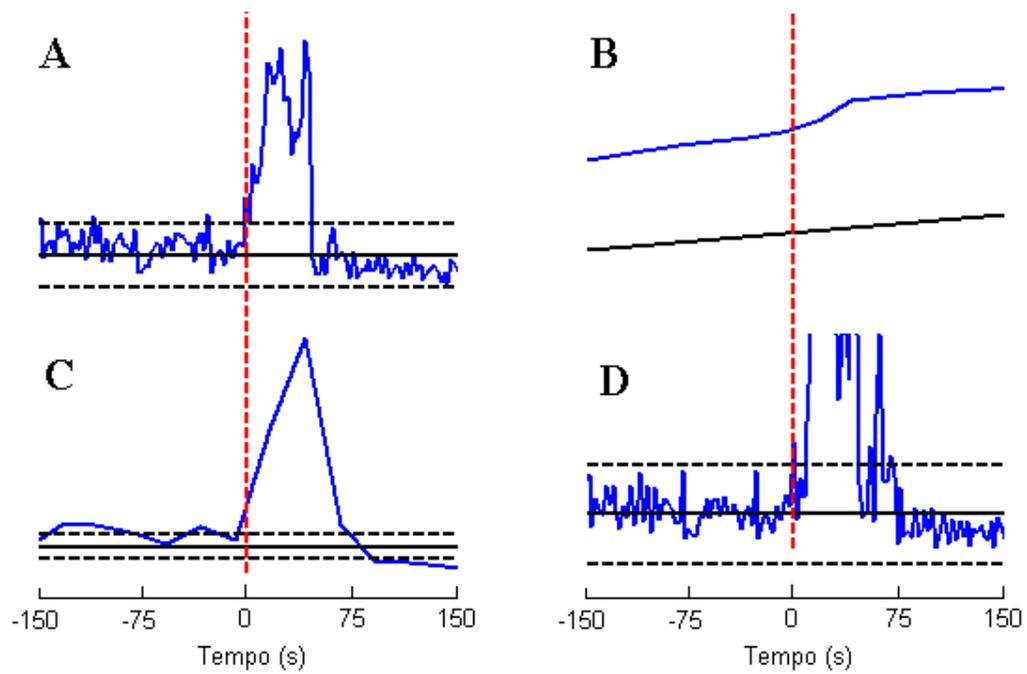


Figura 47 - Análise linear no domínio do tempo do EEG do hipocampo do rato 05 durante uma única crise: energia média (A), energia acumulada (B), incrementos de energia acumulada (C) e autocorrelação (D).

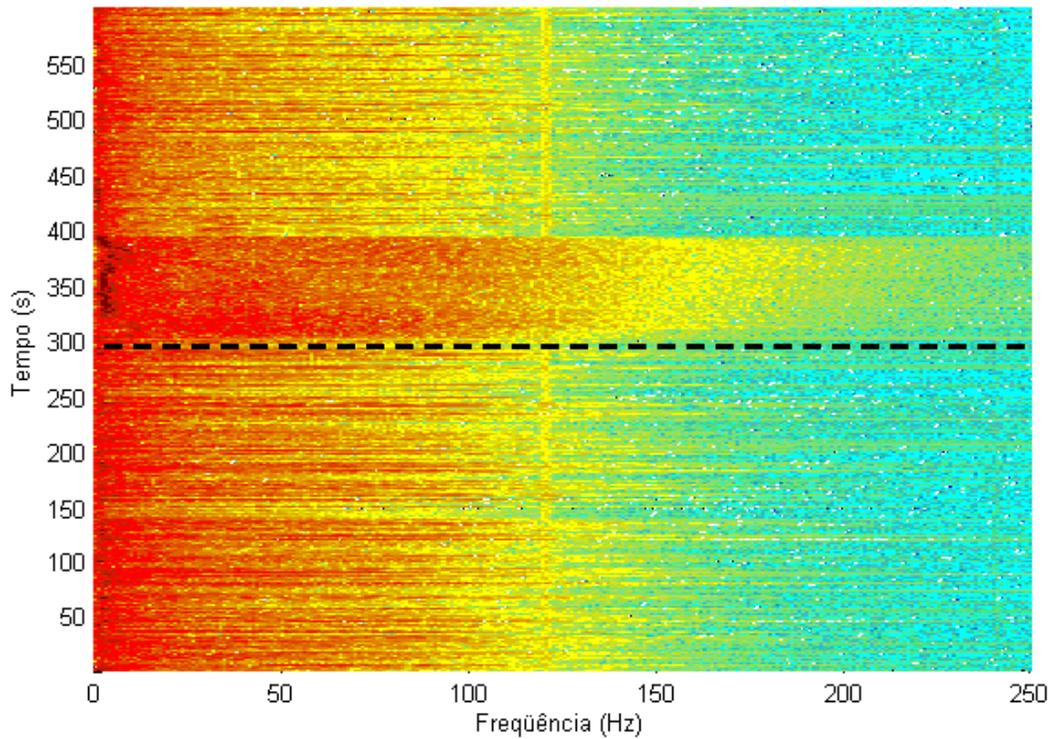


Figura 48 - Análise linear no domínio da frequência: espectro de potência do EEG do hipocampo do rato 05.

As figuras 48 e 49 são, respectivamente, os resultados das análises lineares no domínio da frequência e do tempo (curva de energia acumulada suprimida) para todas as crises do rato e ao longo de todo o registro. As deflexões ocorrem em níveis significativos sempre que há uma crise eletrográfica, correlacionada temporalmente, com expressões sutis de crise. Há, também, deflexões em decorrência de eventos não ictais de alta amplitude (segundo e último pico) sempre de caráter bastante transitório (< 2 s).

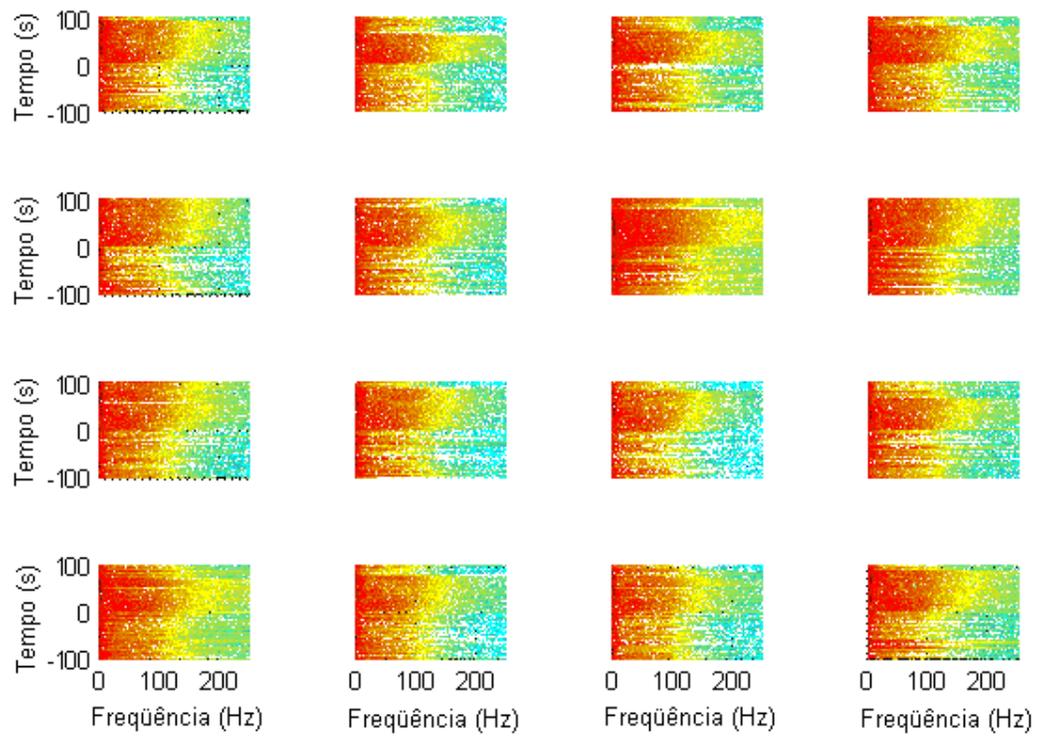


Figura 49 - Análise linear no domínio da frequência do hipocampus de rato 05 em 16 das 17 crises identificadas.

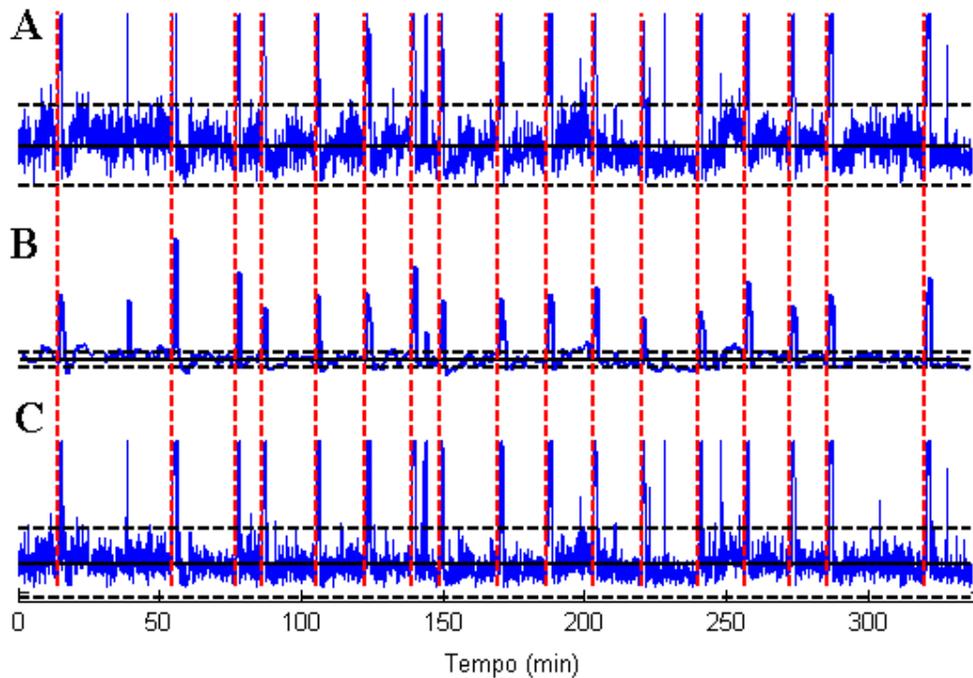


Figura 50 - Análise linear no domínio do tempo do hipocampo do rato 05 ao longo de todo o registro: energia média (A), incrementos de energia acumulada (B) e autocorrelação (C)

Na figura 50 estão as curvas da correlação cruzada entre a atividade da amígdala e do hipocampo (A) e a do atraso do pico da correlação para todo o registro do mesmo rato (B). Há deflexões positivas significativas da correlação sempre após o início de uma crise, mas também para outros eventos não ictais do EEG. O atraso do pico da correlação é variável nesse rato e o padrão não detém qualquer correlação temporal com a curva de correlação que possa ser detectada por inspeção.

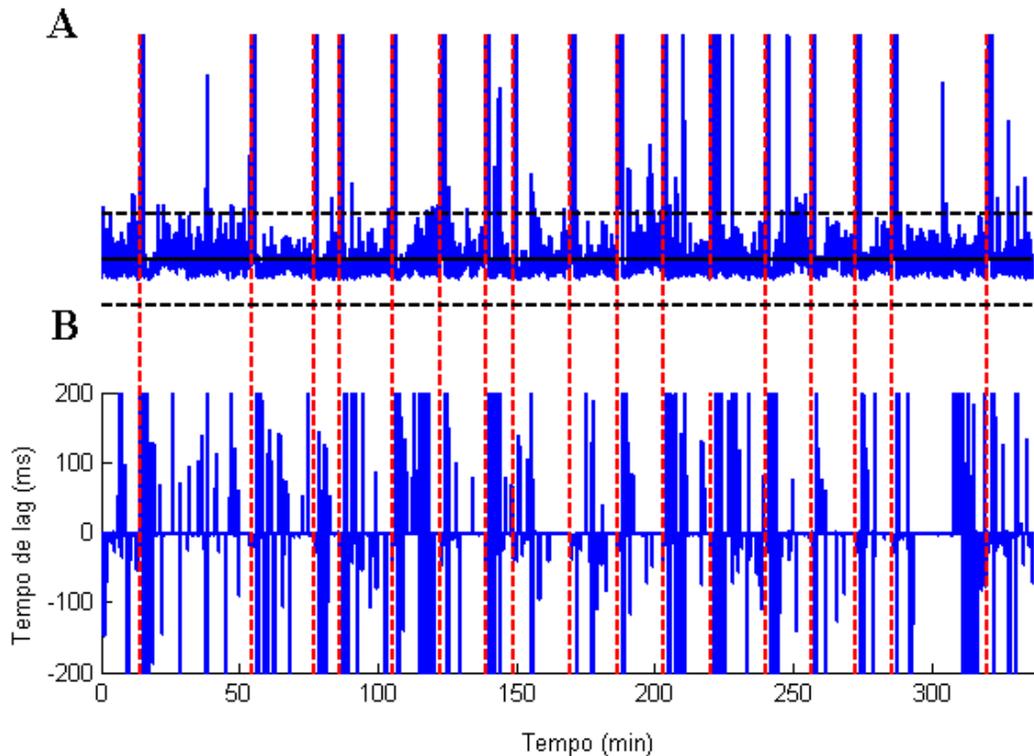


Figura 51 - Correlação cruzada entre amígdala e hipocampo do rato 05 ao longo de todo o registro: valor da correlação (A) e atraso do pico de correlação (B)

Entretanto, em dois ratos desse experimento, o padrão do atraso da correlação é diferente. Conforme está demonstrado na figura 51, painel B, referente à análise do EEG de uma única crise do hipocampo do rato 06, os valores bastante variáveis do atraso da correlação do período inter-ictal (não mostrado na figura) e pré-ictal assumem um padrão bastante constante em torno de zero ms logo após o início eletrográfico e simultaneamente ao aumento do valor da correlação.

Por fim, a figura 52 mostra os resultados da análise não linear de uma única crise do rato 05, contendo a curva de dimensão fractal do EEG do hipocampo (A) e a similaridade dinâmica a partir do EEG da amígdala (B) e do hipocampo (C). A dimensão fractal mostra um aumento significativo imediatamente após o início

eletrográfico. Apenas a similaridade dinâmica calculada a partir da amígdala mostra uma diminuição significativa após o início da crise. O padrão dos resultados da similaridade varia de rato para rato, aparecendo uma deflexão negativa significativa ora apenas na amígdala (R05), ora apenas no hipocampo (R06), ora em ambas as estruturas (R04).

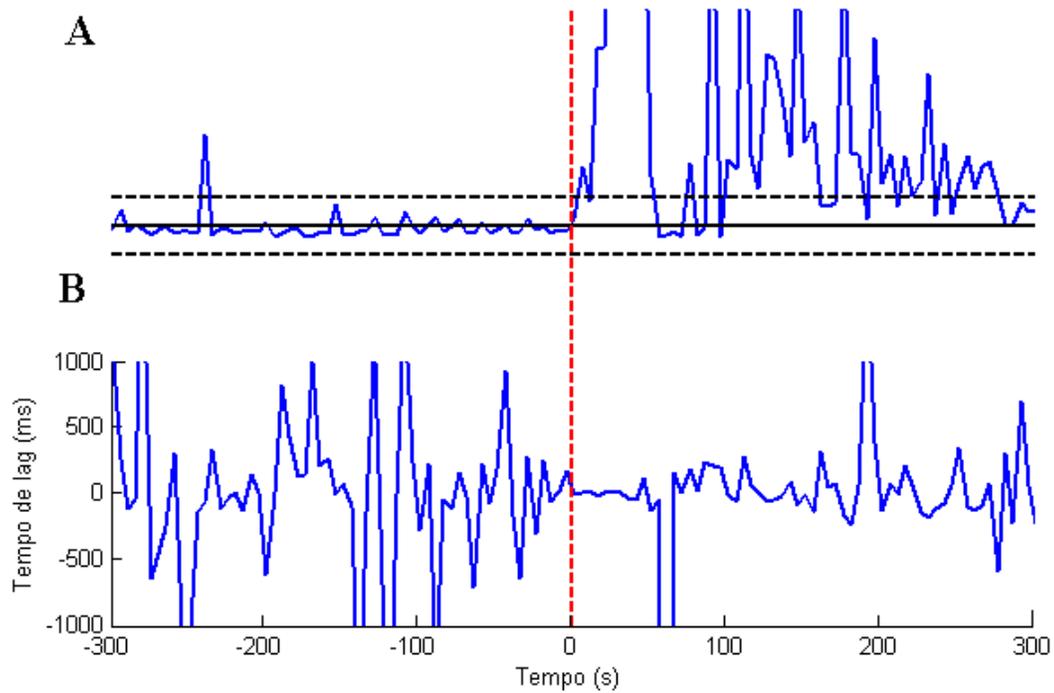


Figura 52 - Correlação cruzada entre amígdala e hipocampo do rato 06 durante a única crise detectada: valor da correlação (A) e atraso do pico (B).

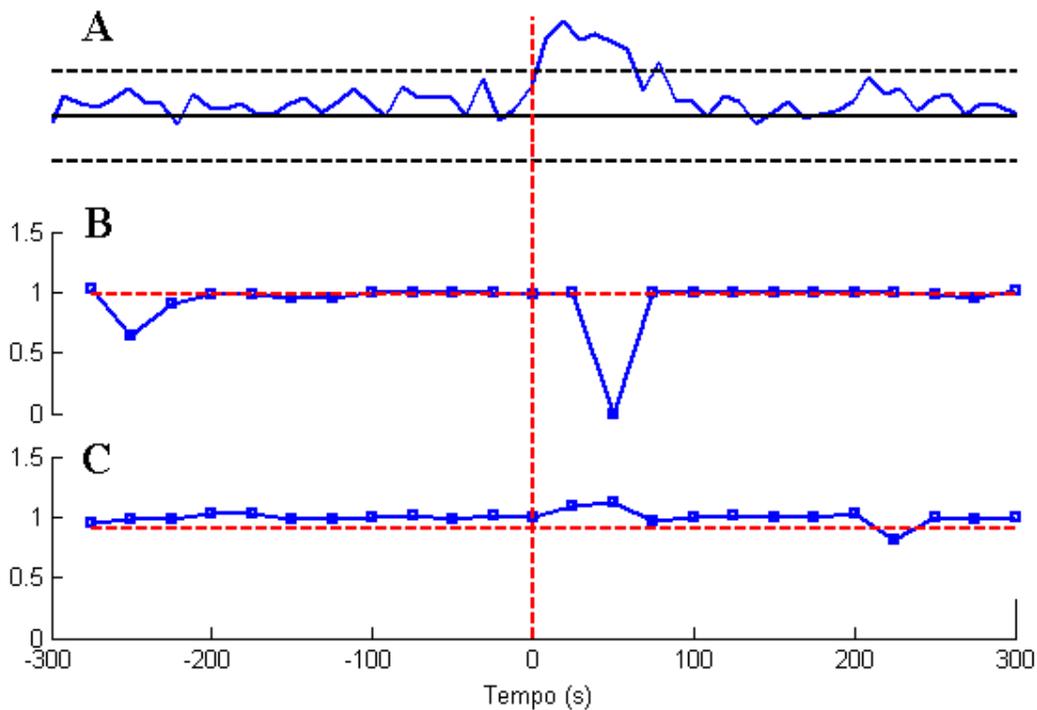


Figura 53 - Análise não linear do EEG do hipocampo do rato 05: dimensão fractal (A) e similaridade dinâmica (B).

A tabela 8 contém os valores médios dos intervalos (em segundos, média \pm epm) entre início eletrográfico e deflexões significativas de todos os parâmetros analisados (AMY e HP).

Tabela 8- Intervalos entre deflexões significativas e início eletrográfico

	AMY	HP
Energia média	10 \pm 3	16 \pm 4
Espectro de potência	5 \pm 2	2 \pm 1
Auto-correlação	19 \pm 4	16 \pm 13
Correlação cruzada	11 \pm 3	
Dimensão fractal	13	13 \pm 4
Similaridade dinâmica	26 \pm 11	72 \pm 53

III.3.4 – Discussão

O uso de eletrodos profundos bipolares tem a capacidade de amplificar a atividade registrada àquela inerente à estrutura alvo. A discussão a seguir foi baseada nesse aspecto do registro intra-encefálico, possibilitando-nos traçar conclusões acerca da participação de amígdala e hipocampo na neurodinâmica da ictogênese.

Através das curvas de energia, pode-se concluir que tanto hipocampo, quanto amígdala são recrutados durante a ictogênese, sem, no entanto, serem necessariamente os causadores do processo. O aumento exacerbado da atividade neuronal destes substratos indica a presença dos aspectos de hiperexcitabilidade e hipersincronismo no sistema límbico de ratos submetidos ao modelo de pilocarpina. No entanto, essa excitabilidade exacerbada não ocorre antes do início eletrográfico. Caso haja, de fato, um período pré-ictal bem definido, isso sugere a existência de outras estruturas, tais como o tálamo, que participam da ictogênese de forma bem inicial. Essa estrutura pode de fato atuar como sincronizador central, influenciando a atividade do complexo amigdalóide-hipocampal. O aumento da correlação cruzada entre as estruturas com atraso próximo de zero se encaixa bem nesse cenário, já que indica que a atividade epileptiforme atinge ambas as estruturas ao mesmo tempo.

Os níveis aumentados de auto-correlação logo após o início da crise reforçam a noção de redes reverberantes subjacente à crise, das quais participam, provavelmente, amígdala e hipocampo. Ainda que o espectro de potência do período ictal demonstre aumento generalizado nas diversas bandas, a frequência de ressonância dessa rede no sistema límbico pode ser sugerida a partir do valor de pico do espectro, identificado como em torno de 4 Hz, tanto na amígdala quanto no hipocampo coincidindo com os resultados anteriores. Portanto, a reverberação de redes no sistema límbico, com uma

freqüência distinta, parece ser importante aspecto da neurodinâmica da ictogênese no modelo de pilocarpina, configurando um cenário que propicia a explicação dos resultados encontrados até aqui.

As alterações eletrográficas captadas por eletrodos em estruturas do sistema límbico parecem mostrar maior seletividade para os períodos ictais. Quando observados no contexto do registro completo, os parâmetros lineares calculados mostram uma correspondência mais profunda com os episódios de crise dos diversos ratos do grupo. Uma possível explicação para isso é que as estruturas registradas não participam ativamente da geração de outros processos, fisiológicos ou não, capazes de alterar a neurodinâmica do encéfalo a ponto de ser refletida nos parâmetros. Por exemplo, o padrão de baixa freqüência e de alta amplitude do EEG do sono de ondas lentas, que provocam deflexões significativas nas curvas de energia se usados eletrodos corticais, é gerado por circuitos tálamo-corticais independentes do complexo amigdalóide-hipocampal.

Entretanto, alguns outros eventos não ictais originados no próprio sistema límbico são fortes o suficiente para serem refletidos por estes parâmetros, o que poderia prejudicar o seu uso como detector de crises por gerar um número indesejável de falsos positivos. Dois critérios simples podem auxiliar bastante na seletividade deste detector sem prejudicar a sua sensibilidade. A primeira delas é a adoção de um valor de tempo mínimo no qual o parâmetro deve permanecer acima dos níveis de significância para que seja dado um alarme, uma vez que estes eventos não ictais são bastante fugazes e, portanto, não se enquadrariam no critério. Outra alternativa é simplesmente elevar o limiar para o disparo do alarme, acima de 3 d.p., já que outra característica destes eventos esporádicos é sua menor magnitude.

O aumento da dimensão fractal durante a crise não encontra, a priori, nenhum correlato neurodinâmico cuja explicação seja direta e fácil.

Os resultados da similaridade dinâmica não foram, novamente, capazes de identificar o período pré-ictal e antecipar a crise, mesmo utilizando eletrodos no foco epileptogênico. O tema será retomado mais adiante.

III.4 – Discussão geral dos experimentos III.1 a III.3 e conclusões

Os resultados encontrados nesse grupo de experimentos revelam uma série de aspectos temporais isolados da atividade neural cortical (eletrodos corticais) ou mais restrita a estruturas específicas (eletrodos profundos). Estas informações devem ser agrupadas para uma compreensão geral do processo ictogênico, observada a partir de dois importantes modelos animais usados na epileptologia. A discussão que se segue trata, portanto, de uma descrição desse processo, sugerida pela bibliografia anterior, inserida no contexto dos resultados obtidos até então. Mais adiante, a relevância e implicação dos resultados, acerca da capacidade de detecção ou predição de crises das diversas metodologias investigadas, serão discutidas.

O PTZ é um antagonista GABAérgico central (MacDonald & Barker 1977) e, portanto, é capaz de causar um severo desequilíbrio entre neurotransmissão excitatória e inibitória, esta última ficando diminuída. A pilocarpina administrada em altas doses provoca extensas lesões no tecido encefálico que acarretam processos de reorganização estrutural celular capazes de originar um desbalanço dos tónus excitatório e inibitório, por exemplo, através do surgimento de microcircuitos retroalimentados positivamente (McNamara 1994). Ambos os modelos dão origem, portanto a um estado de hiperexcitabilidade neuronal (Lothman et al. 1995; Mangan et al. 1995; Rempe et al. 1995). Isso significa que a atividade elétrica de um, ou de alguns neurônios pré-sinápticos, se torna, após o insulto inerente ao modelo, capaz de recrutar a atividade de um número de neurônios pós-sinápticos bem maior do que no caso fisiológico. O recrutamento amplo e simultâneo de neurônios pós-sinápticos gera disparos em fase dessas células, caracterizando um funcionamento hipsincrônico dos substratos neurais. Hiperexcitabilidade e hipsincronismo da atividade neuronal é privilegiada no registro

EEGráfico resultando em maior amplitude do sinal e, conseqüentemente, elevação dos níveis de energia em uma banda específica do espectro ou de forma generalizada.

Ambos os aspectos contribuem também para a transmissão da atividade através de diversos substratos muitas vezes conectados de forma a fechar um ciclo. Quando a atividade elétrica de um determinado substrato é intensa o suficiente para recrutar todos os outros na seqüência de um circuito fechado a ponto de retornar ao original na forma de estímulo novo, esse conjunto de estruturas passa a ressonar formando uma rede neural reverberante (Valentin et al. 2002). Em cada estágio da transmissão da atividade pelo ciclo é gerado um padrão EEGráfico singular e detectável. O somatório destes padrões no tempo e no espaço resulta em uma assinatura EEGráfica da crise que se repete a cada ciclo de reverberação, elevando os níveis da autocorrelação. A análise espectral cautelosa pode sugerir a taxa de repetição do padrão, indicando a freqüência de ressonância da rede reverberante.

A figura 53 ilustra esse raciocínio. Em condições fisiológicas, o neurônio 1 transmite sua atividade apenas para o neurônio 3. Após a indução do modelo, seja devido à diminuição do tônus inibitório, seja por plasticidade neural, o aumento da hiperexcitabilidade faz com que atividade do neurônio 1 passe a ser transmitida também para os neurônio 2 e 4, gerando disparos em fase e hipersincronismo, refletido nos parâmetros de energia. O aumento de energia da atividade neuronal faz com que a rede composta pelos substratos A, B e C passe a reverberar. A atividade de cada substrato origina parte da morfologia da assinatura eletrográfica que se repete no traçado EEGráfico a cada ciclo da reverberação, gerando o aumento da autocorrelação.

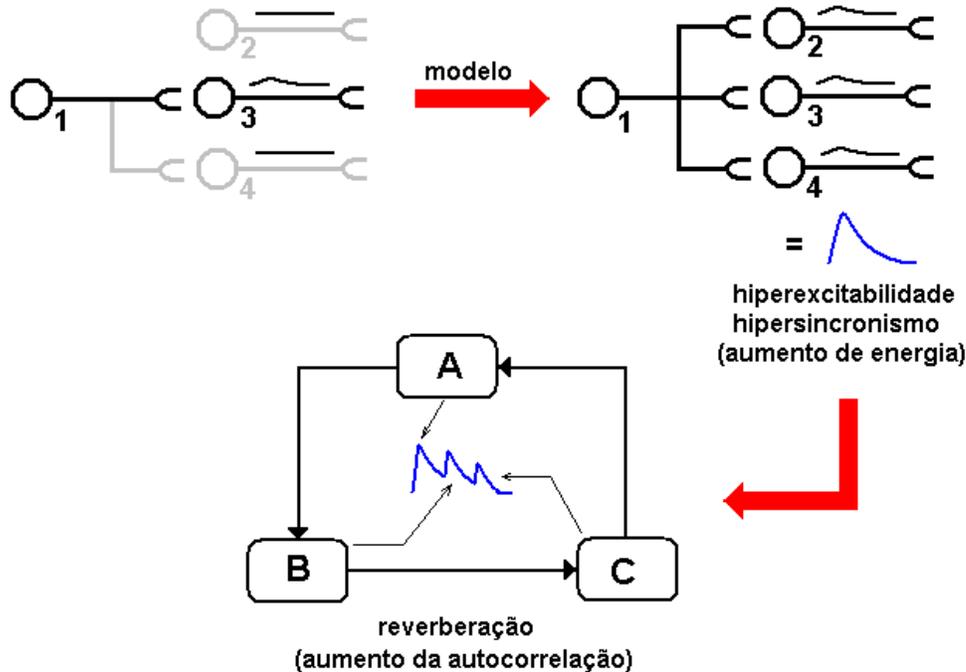


Figura 54 - Proposta de modelo de ictogênese

Há de se considerar, também, o foco de atuação de cada modelo usado no encéfalo (Eells et al. 2004). A ação do PTZ é inespecífica, portanto ela é capaz de gerar reverberação em circuitos neurais por todo o encéfalo paralelamente. Alguns desses circuitos são mais restritos e localizados, tais como circuitos fechados no sistema límbico (Avoli et al. 2002). Outros são mais abrangentes e podem englobar de uma só vez estruturas de prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, cada qual, possivelmente, com redes reverberantes próprias (Hirsch et al. 1997; Moraes et al. 2005a; Moraes et al. 2005b). Dentro do modelo de PTZ, a ativação desta ou daquela rede é dependente da dose administrada (Eells et al. 2004). Doses menores recrutam apenas os circuitos locais, mais susceptíveis ao estado de hiperexcitabilidade, originando os comportamentos típicos de crises parciais já mencionados. Doses maiores conseguem recrutar redes mais extensas e resultam em comportamentos generalizados. De fato, essa noção é corroborada pela análise dos resultados comportamentais durante o experimento

PTZ, cujas crises se iniciam com comportamentos parciais e culminam nos generalizados à medida que a droga vai atingindo sítios de ação mais amplamente localizados no encéfalo.

A ação da pilocarpina é mais restrita a estruturas mais susceptíveis a plasticidade neural. Tem sido mostrado que hipocampo e amígdala são mais intensamente afetados pelo processo de reorganização estrutural celular gatilhado pelas extensas lesões causadas pelo status epilepticus inerente ao modelo (Bernardo & Prince 1981; Mello et al. 1992; Mello et al. 1993). Essas estruturas são, portanto, importantes na ictogênese do modelo.

Portanto o raciocínio é que a reverberação neural durante as crises pode ocorrer em circuitos diferentes e em instantes diferentes em cada um dos modelos. De fato, conforme já havia sido discutido, há trabalhos que corroboram para a noção de múltiplas redes neurais reverberantes, seletivamente ativadas ou bloqueadas, durante as crises epiléticas de um mesmo modelo, através de manobras experimentais diversas, acarretando modificações comportamentais e eletrofisiológicas (de Guzman et al. 2004; Imamura et al. 2001b; Mohapel et al. 1997; Moraes et al. 2005b).

A figura 54 propõe um modelo de redes reverberantes para explicar a ictogênese nos dois modelos usados. Há duas principais redes (setas em círculo): uma mais restrita localizada no sistema límbico, envolvendo amígdala e hipocampo e outra mais extensa, englobando prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Cada circuito é responsável por um determinado grupo de comportamentos estereotipados (quadros) (Eells et al. 2004; Velisek et al. 1992). Eles mantêm um razoável grau de independência, mas podem se acoplar e transferir atividade epileptiforme em sentido bidirecional (setas horizontais entre circuitos) (Eells et al. 2004; Moraes et al. 2000; Moraes et al. 2005a). O modelo de PTZ acomete primeiro o circuito mais local e posteriormente, por propagação da

atividade epileptiforme e/ou ação inespecífica da droga, atinge o circuito mais global. Essa progressão da anatomia da crise por PTZ está refletida pelos resultados obtidos aqui: primeiro pela presença de duas fases distintas nas curvas de energia, de correlação e de similaridade dinâmica e no espectro de potência; e segundo pela deflexão tardia da curva de dimensão fractal, esta última provavelmente correlacionada com o acoplamento desses dois osciladores. O modelo de pilocarpina faz com que a reverberação se dê apenas no âmbito do sistema límbico (Turski et al. 1983), gerando uma única fase distinguível nos padrões analisados. Poder-se-ia hipotetizar que a reverberação disfuncional do circuito límbico impedisse processos de sincronização e acoplamentos fisiológicos com estruturas em nível cortical, resultando em um número maior de graus de liberdade do encéfalo refletido no aumento da dimensão fractal quando acessado pela análise do EEG cortical. No entanto, a presença do mesmo padrão em níveis profundos é paradoxal e contradiz essa hipótese, pois era esperado que hipocampo e amígdala estivessem fortemente envolvidos no processo de acoplamento de osciladores. Até o fechamento desse texto, não foi encontrada hipótese que harmonizasse ambos os fenômenos.

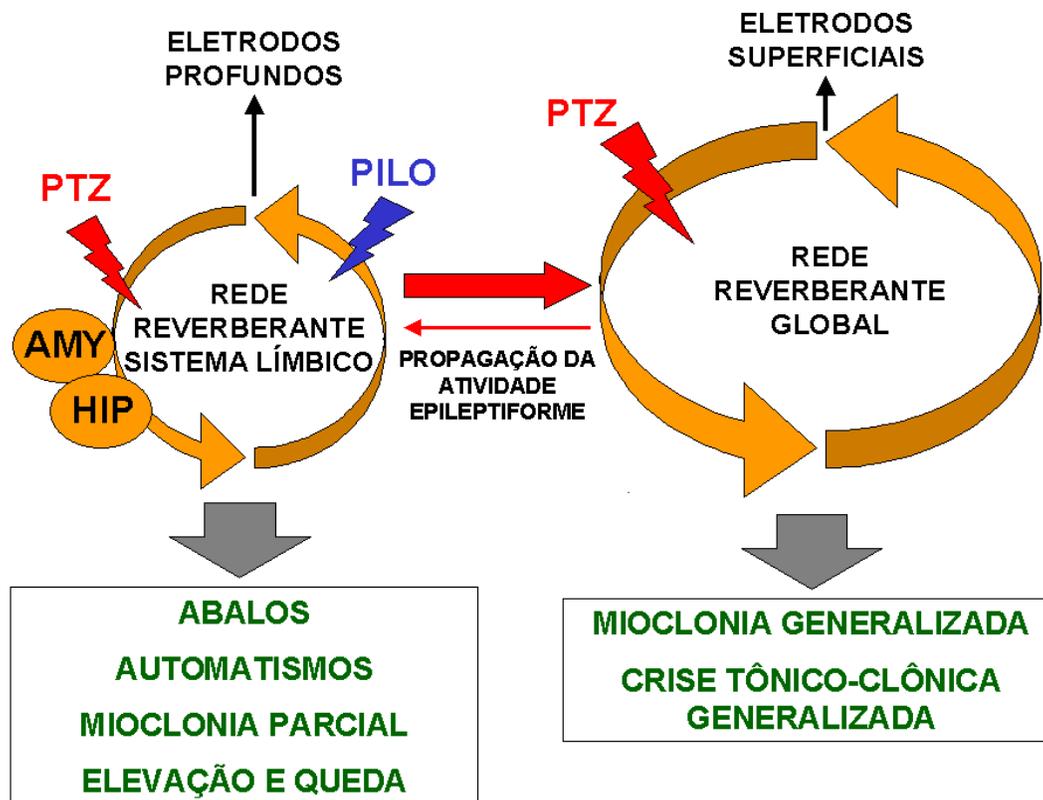


Figura 55 - Modelo de neurodinâmica da ictogênese

A detecção e predição de crises através da análise do EEG devem ser colocadas na correta perspectiva. Há uma série de parâmetros que respondem significativamente logo após o início eletrográfico. No entanto, para que sejam considerados preditores de alto desempenho, é necessário que se observe não só a sensibilidade, mas também a especificidade da metodologia. Em situações controladas, como o modelo de crises únicas do PTZ, a sensibilidade da maioria desses parâmetros é acompanhada de uma “pseudo” especificidade, uma vez que a ausência de falsos positivos se deve exclusivamente à redução da janela temporal de observação do fenômeno EEGráfico que garante a inexistência de eventos espúrios não ictais capazes de diminuir a especificidade do parâmetro. Entretanto, se o detector for considerado dentro do âmbito exclusivamente experimental do modelo de PTZ, um parâmetro simplório e de baixo custo computacional, como a energia média do EEG cortical, pode ser usado com

sucesso, como por exemplo, em Fanselow (2000). Quando analisados no contexto mais próximo da clínica de um modelo de epilepsia, tal detecção simplória passa a apresentar alto número de falsos positivos (dados não mostrados), relativos a processos fisiológicos que carregam em si aspectos dinâmicos similares aos de crise, tais como as oscilações de alta amplitude inerente ao sono de ondas lentas. Uma solução, que, no entanto carece gravemente de praticidade clínica, é o acesso dos parâmetros através do uso de eletrodos profundos. De fato, adicionando-se as melhorias citadas anteriormente (aumento do limiar de detecção e critério de tempo mínimo de deflexão) é possível aumentar bastante a especificidade sem prejudicar sensibilidade. Apesar de inviável para uso ambulatorial, a metodologia poderia ser aplicada para a detecção eficiente de crises durante monitoramento pré-cirúrgico de pacientes com epilepsia.

Por fim, nenhum dos parâmetros analisados foi capaz de antecipar as crises, em nenhum dos modelos usados, sejam eletrodos corticais ou profundos. As raras exceções (dois casos de período eletrodecremental, um caso de predição por similaridade dinâmica e dois casos de tendência não significativa de aumento da dimensão fractal) estão sujeitas a contestações óbvias. Um único caso de predição por similaridade dinâmica têm abrangência inter-animal obviamente limitada. Mais ainda, em sendo um único caso, pode-se sugerir que a predição se deu devido unicamente a uma coincidência de flutuação estatística inerente ao processo exatamente durante o período pré-ictal imediato. A aplicabilidade da detecção do período eletrodecremental deve ser melhor elucidada, particularmente no contexto da investigação do efeito da aplicação contra-medidas durante esse período, como a estimulação elétrica para supressão de crises. Por fim, a deflexão positiva das curvas de dimensão fractal é só uma tendência e, portanto, é inviável para a implementação de um dispositivo preditor.

O tema de predição será retomado no capítulo V, onde se procurou fazer uma abordagem mais fisiologicamente orientada do problema.

**IV – Modulação da neurodinâmica
do sistema límbico visando
supressão de crises**

*“Quem acha que o céu é perto,
morre estirando a mão.”*

“Ditos populares” – Antônio Queiroz e Paraíba da Viola, poetas do nordeste

IV.1 – Considerações iniciais

O modelo de ictogênese elaborado no capítulo anterior reflete a presença de redes reverberantes como fenômeno inerente e necessário para a ocorrência das crises. Ainda, segundo o conceito proposto, a anatomia da rede e seus aspectos dinâmicos se configuram como os responsáveis diretos pela expressão motora convulsiva.

Para avaliar a importância do fenômeno de reverberação na expressão das crises, analisaram-se os comportamentos convulsivos de ratos submetidos à estimulação elétrica (EE) do sistema límbico em diferentes padrões temporais, durante a indução do modelo de crises por infusão controlada de PTZ. A hipótese testada é a de que a EE de baixa frequência (4 pulsos por segundo) funciona como agente sincronizador ou dessincronizador da reverberação neural do sistema límbico, modulando diferencialmente a expressão das crises, caso aplicada, respectivamente, de forma: 1) periódica (intervalos entre pulsos constantes) ou; 2) não-periódica (intervalos randômicos entre pulsos). Paralelamente, avaliamos o efeito anticonvulsivo do padrão não periódico de estimulação elétrica com suposta ação anti-reverberante.

O núcleo basolateral da amígdala (BLA – Basolateral amygdala) foi escolhido como alvo da EE, já que a estrutura faz parte do sistema límbico, com aferências e eferências para a formação hipocampal (Knowles 1992) e tem um forte papel modulatório na atividade do hipocampo (Vouimba & Richter-Levin 2005).

A frequência de 4 pulsos por segundo foi determinada por ser a mais provável candidata a frequência de ressonância do circuito em questão, conforme sugerido pelos resultados anteriores.

Para realizar este experimento foi crucial desenvolver e construir um estimulador elétrico, visto que é inviável se obter um padrão de estimulação, utilizando equipamentos disponíveis comercialmente, com intervalos entre pulsos aleatórios.

IV.2 – Metodologia

O software de controle do estimulador foi expandido para permitir controle pulso a pulso direto do computador, viabilizando a geração do padrão não periódico necessário ao experimento. Em linhas gerais, trata-se de uma rotina computacional para sortear os valores dos intervalos entre cada par de pulsos de forma que exatamente 4 pulsos sejam dados a cada 1 segundo, garantindo uma taxa de repetição de 4 pulsos por segundo, sem, no entanto, qualquer padrão temporal fixo. A cada sorteio de intervalo, o software envia um comando para o circuito eletrônico do estimulador para o disparo do pulso. O algoritmo para a geração deste padrão não periódico utiliza a função *RandomRange(int start, int end)*, da biblioteca do C++ Borland Builder 6.0, para o sorteio de um valor dentro de uma faixa compreendida entre os parâmetros *start* e *end*. Ele se estrutura nas seguintes etapas, dado que *t* é uma variável do tipo inteira:

- 1) sorteia um valor entre 10 ms e 970 ms e armazena em *t*;
- 2) espera *t* e comanda o disparo de um pulso;
- 3) sorteia um valor entre *t* ms e 980 ms e armazena em *t*;
- 4) espera *t* e comanda o disparo de um pulso;
- 5) repete 3 e 4 utilizando os valores de 990 e 1000 ms para o fim da faixa de sorteio (*end*); 6) espera $1000 \text{ ms} - t$ (valor do último sorteio). A cada sorteio de *t*, o seu valor é verificado e, caso ele seja menor do que 10 ms, *t* assume este último valor.

Esse último passo é inserido no algoritmo para garantir uma frequência de estimulação instantânea nunca superior a 100 Hz. A geração do padrão periódico é simplória e consiste de fixar o valor de *t* em 250 ms durante toda a estimulação.

A figura 55 mostra os padrões temporais obtidos para a estimulação periódica a 4 pulsos por segundo e para a estimulação não periódica. Os painéis A e B contêm

histograma de intervalo entre pulsos e os painéis C e D são a representação temporal dos padrões. O padrão periódico está representado nos painéis superiores e o não periódico nos painéis inferiores. Observe que o padrão não-periódico realiza 4 pulsos no intervalo de cada segundo, no entanto a posição destes pulsos em cada segundo é diferente a cada realização do processo. Os padrões foram desenhados dessa forma para que pudessem entregar a mesma quantidade de energia por segundo.

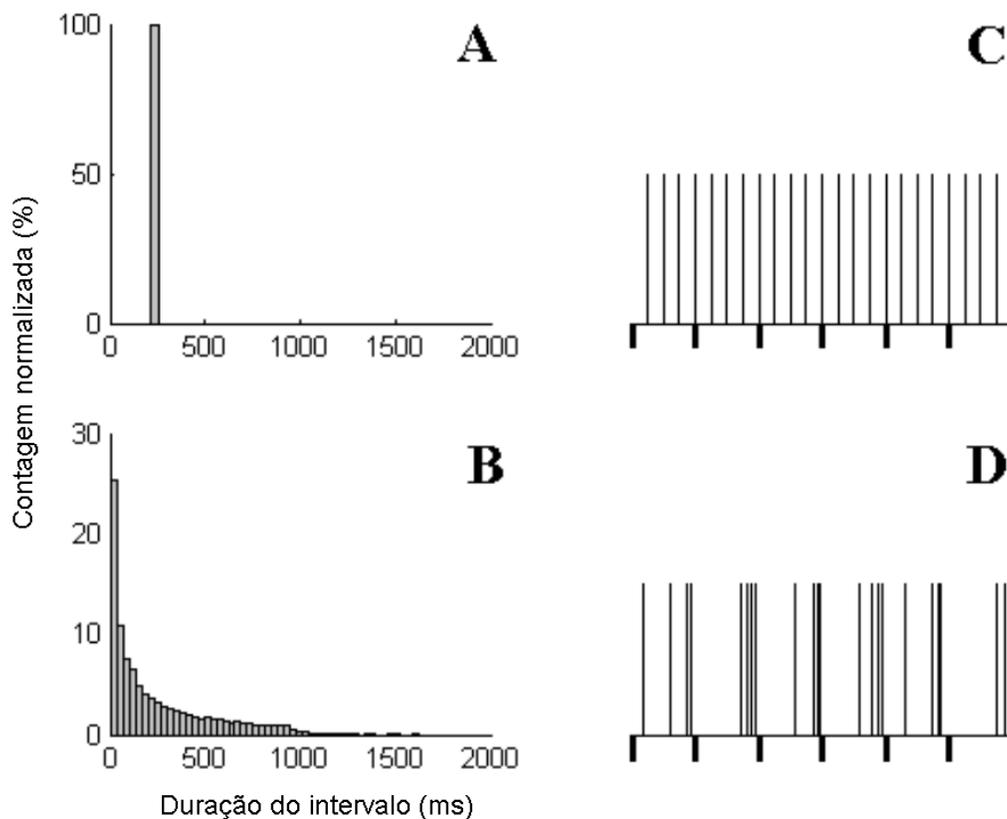


Figura 56 - Padrões temporais de estimulação elétrica usados: histograma de duração do intervalo entre pulsos (painéis à esquerda) e simulação temporal do padrão dos estímulos periódico (painéis superiores) não periódico (painéis inferiores).

Os pulsos foram configurados como positivos, monofásicos e com duração de 100 μ s. A amplitude da corrente variou entre 100 e 300 μ A, de acordo com a resposta de cada animal à estimulação (vide descrição mais abaixo).

Trinta e três (33) ratos Wistar provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, pesando entre 270 e 400 g foram divididos em três grupos com diferentes padrões de estimulação: ausente/controle (n = 14), periódica (n = 9) e não-periódica (n = 10). Para garantir a homogeneidade dos grupos, foi avaliado o peso médio dos animais que não foi significativamente diferente entre os grupos (controle: 342 ± 16 g; periódico: 336 ± 14 g; não-periódico: 337 ± 14 g).

Todos os animais foram submetidos à cirurgia de implante de eletrodos profundos na BLA segundo procedimento descrito previamente. O posicionamento dos eletrodos foi verificado pelo procedimento histológico que revelou a o posicionamento correto dos eletrodos em sua grande maioria. Nos outros casos, os animais foram eliminados da análise estatística.

Imediatamente um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a uma estimulação elétrica de baixa frequência (0,25 Hz) para detecção de um limiar de corrente para uso, arbitrado como a menor amplitude capaz de evocar um comportamento sutil de abalo.

No dia do experimento, os animais foram submetidos a canulação da veia caudal para infusão intra venosa (i.v.) controlada de PTZ (10 mg/min) em solução salina (10 mg/ml), utilizando-se uma bomba de infusão também desenvolvida em nosso laboratório. O padrão de estimulação elétrica foi sorteado para ser usado no animal, começando sempre 10 segundos antes do início da infusão.

O comportamento do animal foi gravado em VHS e foi analisado medindo-se a latência para os seguintes comportamentos estereotipados do modelo: primeiro abalo mioclônico (PAM), mioclonia parcial (MP), mioclonia generalizada (MG) e crise tônico-clônica generalizada (CTCG). Como a infusão de PTZ se dá a uma taxa fixa de 10 mg/min, a latência medida para cada comportamento corresponde diretamente à dose

de PTZ necessária para evocar o comportamento. O efeito da droga depende, naturalmente, do peso corporal do animal. Portanto a dose de PTZ foi devidamente normalizada pelo peso, o que se denominou limiar de PTZ.

O efeito pró ou anti-convulsivante de cada tratamento foi feito comparando-se os valores de limiar de PTZ e a taxa de mortalidade entre grupos.

A figura 56 demonstra o experimento de forma esquemática.

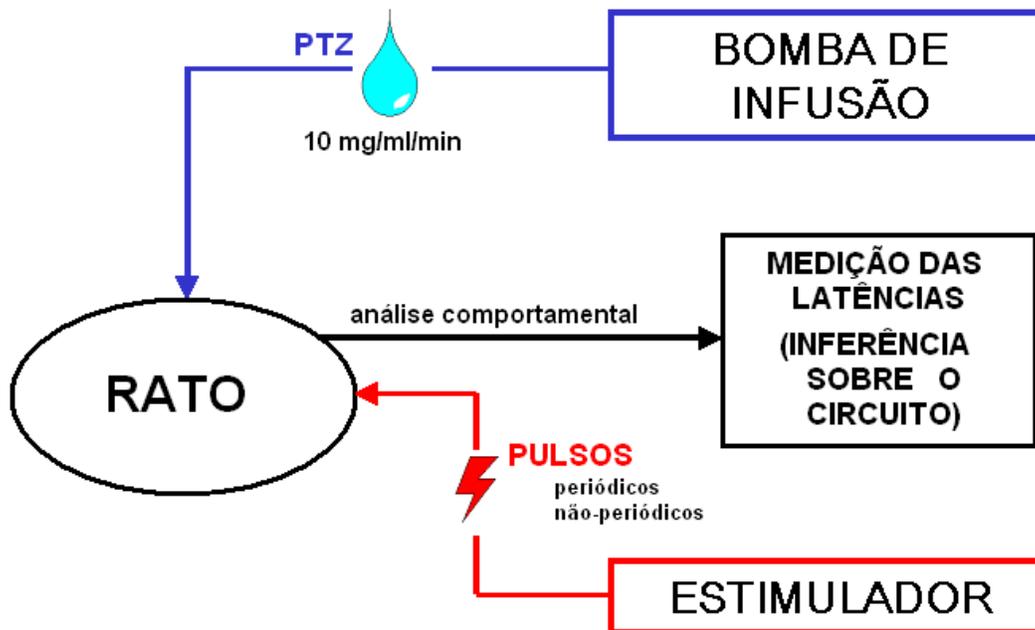


Figura 57 - Diagrama esquemático do desenho experimental.

IV.3 – Resultados

Quando os três grupos são comparados de forma conjunta, não há diferença estatística no limiar de PTZ para evocar MP (figura 57, painel A), ainda que demonstrando uma forte tendência ($p = 0,0784$, One-way ANOVA). Ao se comparar aos pares através do teste t de Student, o limiar de PTZ para o grupo periódico é menor do que o grupo controle ($p < 0,05$), sem diferença significativa, ainda que com uma forte tendência ($p = 0,0767$) para o grupo não periódico.

Para o comportamento de CTCG, os animais estimulados com o padrão não periódico tiveram um aumento robusto no limiar de PTZ, atingindo uma relação de quase duas vezes, quando comparado com ambos os grupos controle e periódico (controle: $0,053 \pm 0,004$ g/kg; periódico: $0,058 \pm 0,004$ g/kg; não periódico: $0,090 \pm 0,010$ g/kg; $p < 0,01$, One-way ANOVA) (figura 57 painel B). Não houve diferença estatística entre grupos controle e periódico.

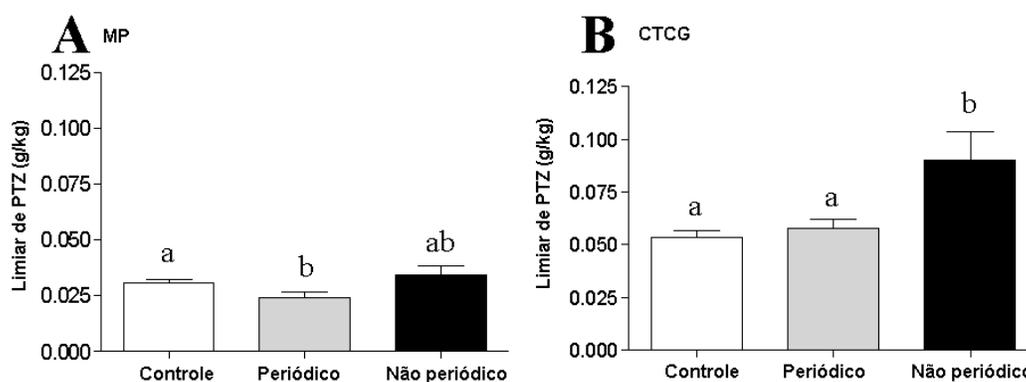


Figura 58 - Limiar de PTZ para mioclonias de membros anteriores (MP) (A) e para a crise tônico clônica generalizada (CTCG) (B) dos diversos grupos experimentais. Grupos com letras diferentes entre si indicam diferença estatisticamente significativa.

O comportamento de elevação (rearing), ao contrário do esperado no modelo por PTZ, pôde ser observado nos grupos estimulados. Os resultados estão compilados na tabela 9 que categoriza a ocorrência ou não do comportamento nos três grupos

estudados. Quando analisados em conjunto através do teste chi-quadrado os dados mostram que comportamento de rearing é dependente do padrão de estimulação ($p < 0,01$). Quando comparado aos pares através do teste exato de Fisher, animais do grupo periódico apresentaram mais comportamento de rearing do que o grupo controle ($p < 0,01$). Nenhuma significância estatística pôde ser observada nas comparações com grupo não periódico.

Tabela 9 - Tabela de contingência de animais que apresentaram comportamento de rearing. As letras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$ teste exato de Fisher).

	Com rearing	Sem rearing
Controle ^a	0	14
Periódico ^b	6	3
Não-periódico ^{a,b}	3	7

Nenhum rato do grupo controle sobreviveu à infusão do PTZ, um rato do grupo periódico e três ratos no grupo não periódico sobreviveram. Entretanto, não há significância estatística nesta contingência, apesar de uma forte tendência na comparação do grupo não periódico com o controle ($p = 0,0593$, teste exato de Fisher).

IV.4 – Discussão

Os resultados obtidos nesse experimento mostram claramente que diferentes padrões temporais de EE em baixa frequência (4 pulsos por segundo) na BLA têm efeitos distintos na expressão comportamental das crises induzidas por PTZ. Primeiro, a DBS não periódica é capaz de aumentar de forma robusta a dose necessária para elicitar a CTCG, quando comparada com EE periódica ou ausente, enquanto que o padrão periódico não tem quaisquer efeitos sobre a CTCG. Segundo, DBS periódica diminui o limiar de PTZ para mioclonias parciais quando comparada com a ausência de DBS. Por último, DBS periódica é capaz de evocar o comportamento de rearing durante a infusão de PTZ.

Como o PTZ acarreta a diminuição do tônus inibitório, as crises induzidas pelo modelo são evocadas, com maior probabilidade, por múltiplos circuitos neurais reverberantes em paralelo, conforme sugerido no modelo do capítulo anterior. Assim, os diferentes padrões temporais de estimulação elétrica poderiam ativar e/ou inibir a reverberação de determinados circuitos ou o acoplamento de circuitos de forma seletiva, dando origem a comportamentos convulsivos distintos dentro de um mesmo modelo.

A sugestão dada pelos presentes resultados é que a estimulação periódica, através de um efeito de ressonância, ativa seletivamente a reverberação do sistema límbico, facilitando mioclonias parciais e rearing. Este último comportamento não aparece no grupo controle possivelmente devido a um processo de mascaramento pela CTCG. Por outro lado, o padrão não periódico é capaz de aumentar o limiar de PTZ para CTCG através do impedimento do acoplamento do sistema límbico, ou outros osciladores, com circuitos mais globais. Ainda assim, o surgimento da fase generalizada da crise é inevitável, devido não só a uma quantidade abundante de PTZ no sistema

após diversos minutos de infusão, bem como à ativação do circuito contralateral não estimulado.

A figura 58 contextualiza o modelo de reverberação proposto na presença dos estímulos sincronizante e dessincronizante. Estímulo periódico facilita a reverberação do sistema límbico, gerando comportamentos parciais, enquanto o estímulo não-periódico dificulta o acoplamento deste circuito ao mais global, prejudicando a propagação da atividade epileptiforme de um para outro.

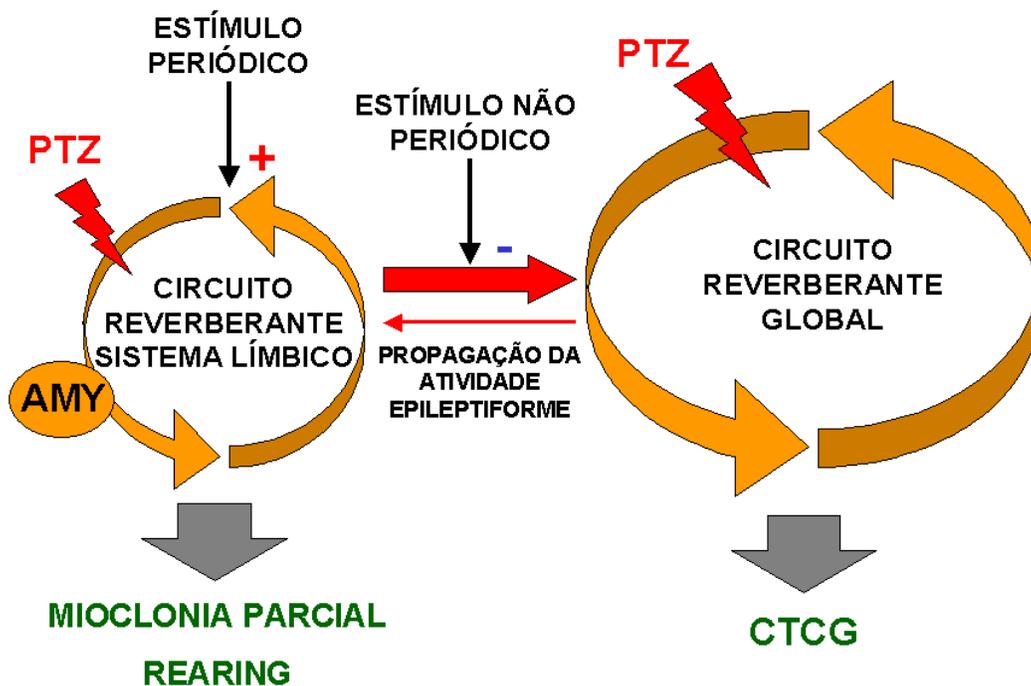


Figura 59 - Modelo da neurodinâmica da ictogênese incorporando os mecanismos de ação dos padrões de estimulação elétrica.

Ainda que as taxas de mortalidade não tenham resultado em significância estatística, a tendência de um percentual aumentado de sobrevivência no grupo periódico é sugestiva. É razoável hipotetizar que o dado padrão impede a propagação de atividade disfuncional para estruturas de tronco ligadas a funções de suporte à vida. Naturalmente, estas observações de cunho neuroetológico hipotético devem ser comprovadas pela abordagem eletrofisiológica sob a influência dos diferentes padrões

de estímulos, de forma a permitir conclusões mais definitivas a respeito de que estruturas e circuitos são ativados ou bloqueados no processo.

Uma melhor compreensão dos mecanismos de ação da EE na supressão de crises vai permitir não só melhorias essenciais na metodologia de neuroestimulação visando a clínica médica, bem como vai fazer avançar o conhecimento dos fenômenos epiléticos (Lozano & Hamani 2004).

Concluindo, a eficácia da EE como medida de controle de crises é dependente do padrão temporal usado, de tal forma que um estímulo não estruturado, potencialmente anti-reverberante, como aquele com intervalos randômico entre pulsos, deve ser considerado para uso na prática médica. Em particular, os autores deste trabalho acreditam nessa idéia e recentemente depositaram uma patente que trata de sugerir a modificação do padrão temporal para um não periódico para melhorar o desempenho de dispositivos de estimulação elétrica do SN para supressão de crises (Cota & Moraes 2006). Paralelamente, estes dados reforçam a idéia de que redes reverberantes são um importante mecanismo para o desenvolvimento das crises, com correlatos comportamentais diretos, e de que a EE deve funcionar através de um processo de dessincronização da atividade epileptiforme nas estruturas envolvidas na crise.

**V – Medição da força de
reverberação do sistema
límbico: uma proposta para
preditor de crises**

*“Sou famoso como os astros
dos filmes no Arizona.
Quando vou fazer um show
o trânsito congestionava*

*E o povo todo murmura
a viola funciona”*

“A viola funciona”

Antônio Queiroz e Paraíba da Viola, poetas do nordeste

V.1 – Considerações iniciais

Os resultados obtidos no capítulo III e IV sugerem que a reverberação de redes é fenômeno necessário para geração e desenvolvimento das crises. Em particular, tanto o modelo de PTZ quanto o de pilocarpina, agem de forma a originar uma atividade reverberatória no sistema límbico, conforme está proposto no modelo de neurodinâmica da ictogênese.

Por outro lado, os parâmetros avaliados no estudo da neurodinâmica de crises não obtiveram um desempenho suficiente para que fossem considerados preditores implementáveis e confiáveis, ao menos em ratos submetidos aos referidos modelos. Na grande maioria dos casos e em todas as análises usadas, as deflexões dos parâmetros ocorreram após o início eletrográfico. Os poucos casos de deflexão anterior ao início eletrográfico ou não eram significativos, ou careciam severamente de abrangência e relevância clínica.

Há uma série de diferenças entre os experimentos de detecção/predição realizados no escopo dessa tese e aqueles citados por trabalhos anteriores com energia acumulada, similaridade dinâmica e dimensão de correlação. Primeiramente, a bibliografia trata de analisar EEG de seres humanos. Ainda que os estudos eletrofisiológicos em ratos sejam de importância crucial para o desenvolvimento da neurofisiologia humana e para aplicação na clínica médica, a extrapolação de resultados da experimentação animal deve ser feita com cuidado e nem sempre é simples e direta. Devido ao seu mais alto grau de complexidade, é plausível que o cérebro humano carregue em si uma neurodinâmica bastante distinta daquela do rato, inclusive durante a ictogênese. Sendo bem mais complexo do ponto de vista de um sistema físico, a priori o cérebro humano tem mais graus de liberdade e tem, portanto, mais estados possíveis, como aquele referente a um período pré-ictal bem definido. Hipoteticamente, o período

pré-ictal no cérebro do rato talvez seja, por conta da sua simplicidade, um período muito instável, acarretando a transição bem mais rápida de período inter-ictal para ictal, o que inviabilizaria sua detecção pelas metodologias usadas no capítulo III.

Outra diferença importante é uma maior quantidade de eletrodos usada para os estudos em seres humanos, seja em nível cortical, de escalpo ou profundo. Apesar de terem sido reportados desempenhos consideráveis dos diversos parâmetros preditores, nem todos os eletrodos trazem a mesma capacidade de predição (e nem todas as crises foram antecipadas). É possível que as posições dos eletrodos nos experimentos do capítulo III não tenham sido as mais propícias para representar a neurodinâmica do período pré-ictal, ainda que isso signifique uma possibilidade mais remota.

Mesmo em seres humanos, as diversas metodologias de predição têm sido alvos de críticas severas, o que naturalmente se reflete nos estudos com ratos. Maiwald e cols. (2004), em um estudo conciso e objetivo, citam três principais problemas dos estudos até então: 1) o termo predição de crises não está definido de forma inequívoca; 2) há diferentes critérios para se avaliar a capacidade preditiva de cada método e; 3) pouca atenção tem sido dada às questões de sensibilidade e especificidade. Esse estudo, portanto, elabora uma forma objetiva de se avaliar o desempenho das técnicas segundo a denominada “Característica de Predição de Crise” que engloba os conceitos de sensibilidade e taxa de falsos positivos. Quando estudados segundo esse critério, as metodologias mais promissoras obtêm desempenho pouco superior ao de alarmes periódicos ou randômicos. Citando os autores do referido estudo, “estes resultados não são suficientes para aplicações clínicas”.

O experimento descrito neste capítulo significa uma tentativa de se avaliar, de forma mais direta, um determinado aspecto inerente e prévio na neurodinâmica da ictogênese, significando, portanto, uma abordagem mais fisiologicamente orientada. A

idéia aqui é avaliar a força de acoplamento entre estruturas que fazem parte da rede reverberante de um modelo experimental de crises. Os objetivos desse estudo são continuar a investigação dos mecanismos da ictogênese e, em paralelo, sugerir uma nova metodologia para predição de crises.

Em linhas gerais, o protocolo utiliza duas estruturas do sistema límbico (amígdala e hipocampo) durante a indução de crises por infusão controlada de PTZ. Para medir a dinâmica de acoplamento entre os referidos substratos, o potencial evocado no hipocampo através da estimulação elétrica na amígdala (PEHA) é registrado e sua morfologia é analisada. As alterações no formato de onda podem servir de preditor de crises, além de elucidar aspectos adicionais da neodinâmica da ictogênese. Trabalhos anteriores utilizaram pulsos elétricos simples e registros eletrofisiológicos, ambos com eletrodos profundos no SNC de humanos, para detecção de anormalidades estruturais, possivelmente epileptogênicas (Valentin et al. 2002; Valentin et al. 2005a; Valentin et al. 2005b). Apesar do sucesso na correlação da morfologia do potencial evocado para detecção de estruturas epileptogênicas, o método não foi utilizado para predição de crises, que é a proposta desta seção.

V.2 – Metodologia

Para este experimento foram usados 22 ratos Wistar machos, pesando entre 240 e 420 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, o CeBIO/ICB-UFMG, sendo cada animal controle de si mesmo.

Todos os animais, exceto um, foram submetidos à cirurgia de implante de eletrodos profundos (núcleo basolateral da amígdala e na região CA1 de hipocampo), à indução de crises por infusão controlada de PTZ (10 mg/min em solução salina de 10 mg/ml) e ao procedimento histológico para a confirmação do posicionamento dos eletrodos, conforme procedimentos descritos na metodologia geral e nos capítulos anteriores. Esse rato exceção foi usado como um pilto para verificar a existência do potencial evocado no hipocampo através da estimulação elétrica da amígdala. Portanto não foi submetido à infusão de PTZ e o registro do potencial foi feito sob efeito da anestesia.

A estimulação elétrica utilizou pulsos quadrados monofásicos positivos com os seguintes parâmetros: 100 μ s de duração de pulso; 4 Hz de frequência de repetição e 100 μ A de amplitude de corrente, para todos os ratos. Essa amplitude foi consideravelmente menor do que a média usada no capítulo anterior, para evitar distorções acentuadas no registro de EEG.

Para o registro, utilizamos o sistema desenvolvido no escopo dessa tese acoplado ao aparato de vídeo. Os parâmetros de aquisição foram: banda de filtragem de 0,5 a 400 Hz, ganho de 1000 V/V e frequência de amostragem de 1000 S/s.

Para a obtenção da eletrofisiologia de controle, foi registrado 1 minuto de potenciais evocados sem infusão de PTZ, com o animal livre na gaiola de registro. Na

seqüência, iniciou-se infusão e registro simultâneos de PEHA até poucos instantes após o rato entrar em CTCG.

As latências para os comportamentos estereotipados do modelo de PTZ foram anotadas e os correspondentes limiares de droga foram calculados.

A estimulação elétrica produziu uma distorção considerável do traçado EEGráfico, dificultando a inspeção visual do registro para a definição início eletrográfico. Para uma determinação menos subjetiva do parâmetro, utilizou-se a curva de energia média do EEG durante a crise, comparado-a estatisticamente com o trecho basal. Foi considerado o exato instante em que ocorre uma deflexão positiva, significativa e sustentada do parâmetro. Apesar de o artefato contribuir para o valor da energia em cada janela considerada, ele afeta igualmente os trechos de referência (basal) e teste (durante a crise) e, portanto, têm pouco efeito no resultado final.

Para retirar a atividade de fundo do EEG, os potenciais evocados foram pró-mediados, através da obtenção da média aritmética de 10 trechos consecutivos de EEG, referentes aos 100 ms imediatamente após o estímulo, com máxima sobreposição possível (9 trechos). No caso do rato 1, o potencial evocado foi obtido a partir da pró-mediação de todo o período de registro, somando quase 240 trechos. Após a pró-mediação, o cálculo da correlação cruzada de todos os potenciais evocados consecutivos com o primeiro da série foi realizado para poder observar a curva de atraso do pico da correlação. O racional por trás dessa análise é que o processo de acoplamento dos substratos altera a velocidade do tráfego de informação pelo circuito, refletindo-se na latência do PEHA. O atraso da correlação cruzada, quando processado temporalmente pela evolução dos potenciais, é capaz de indicar o deslocamento temporal desta onda.

V.3 – Resultados

A estimulação usada neste experimento, não foi capaz de gerar comportamentos perceptíveis durante os registros basais, como os abalos percebidos no capítulo anterior. Isso se deveu provavelmente à amplitude consideravelmente menor do estímulo, conforme discutido mais adiante. Portanto, a repetição periódica também não facilitou, nesse caso, o aparecimento de comportamento de elevação e nem a diminuição da latência para as mioclonias de membros anteriores. De fato, os comportamentos decorrentes da infusão controlada de PTZ seguiram rigorosamente o fenótipo de crises mínimas seguidas de crises máximas observados nos ratos sem estimulação, conforme consta na bibliografia descrita e nos resultados do capítulo III.

Durante o procedimento histológico, foi encontrada uma série de dificuldades técnicas, que não cabe ser comentada aqui, mas que prejudicou severamente a identificação do posicionamento dos eletrodos, principalmente aqueles localizados no hipocampo. Dos 21 ratos submetidos à infusão de PTZ, as lâminas de somente 2 ratos (#10 e #20) obtiveram qualidade suficiente para identificar o posicionamento, no caso correto, dos eletrodos em ambas regiões, no hipocampo e na amígdala. O rato #1, usado para verificação do potencial evocado, teve posicionamento correto do eletrodo na amígdala, sem informações para o hipocampo. Os resultados a seguir versam apenas sobre estes 3 ratos.

A figura 59 mostra o resultado da pró-mediação dos trechos de EEG do rato #1. A curva em linha contém o potencial evocado por um estímulo positivo, a em linha tracejada por estímulo negativo e a em traço-ponto por um estímulo positivo após a morte do rato, induzida por sobredose de anestésico. Para ambas as polaridades de estímulo, o potencial evocado consiste de uma onda negativa de aproximadamente 250

μV de pico ocorrendo por volta de 25 ms após o estímulo. Esta onda some após a morte do animal.

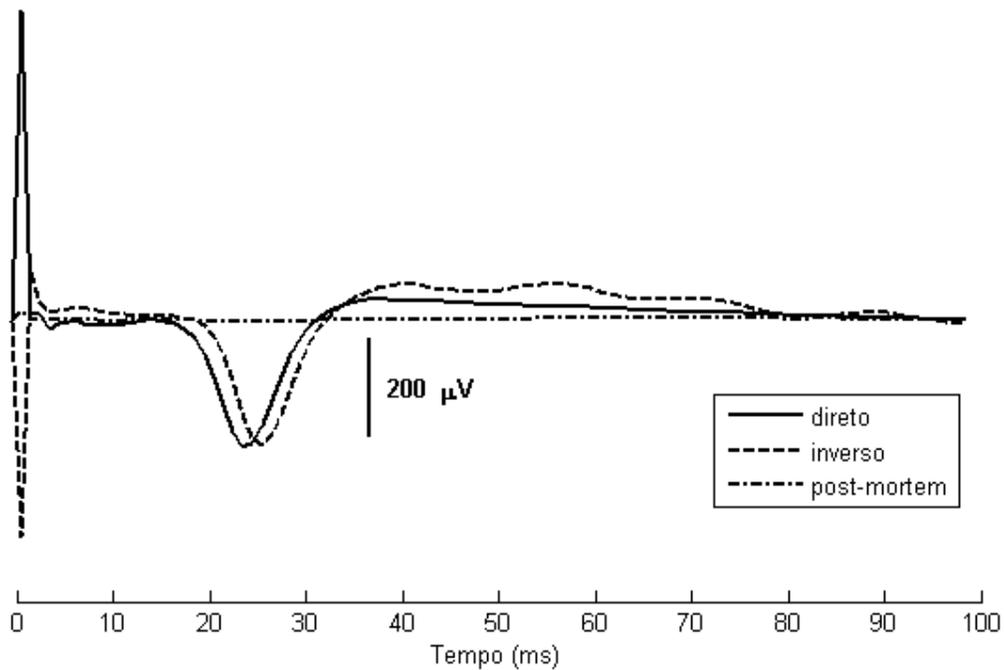


Figura 60 - Potencial evocado no hipocampo pela estimulação elétrica da amígdala em um rato anestesiado.

A figura 60 demonstra a evolução temporal do potencial evocado do rato #10 através de uma superfície plana com amplitudes mapeadas por cores: azul corresponde ao nível mais inferior e vermelho ao nível mais superior. A linha cheia mostra o instante de tempo que separa o período de referência do de infusão de PTZ, a linha tracejada denota o início eletrográfico conforme indicado pela curva de energia e a linha com traço ponto indica o momento de início da CTCG. Pode-se observar, por inspeção visual, um vale nítido em torno de 20 ms que se desloca para baixo cerca de 30 s antes do início eletrográfico.

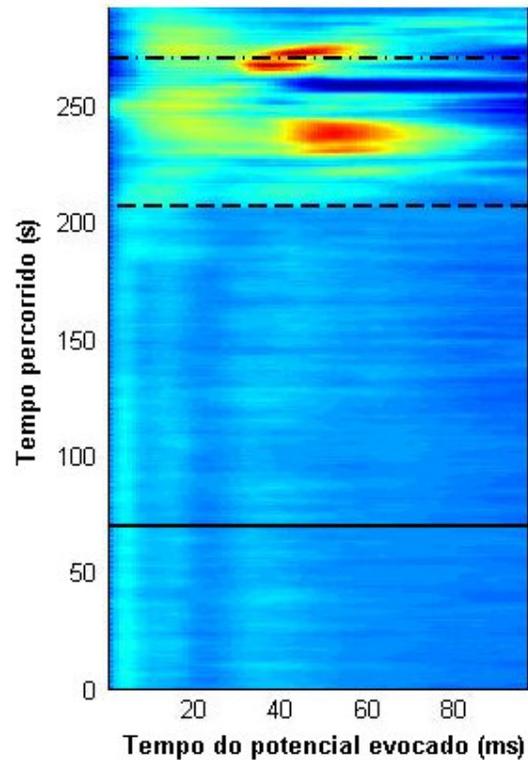


Figura 61 - Evolução temporal do potencial evocado mostrado como uma superfície codificada por cores: cor azul representa vales e cor vermelha representa picos. Cada linha da imagem é um potencial evocado.

A figura 61 contém o resultado do atraso da correlação cruzada dos potenciais evocados na situação de referência e durante a infusão de PTZ (períodos separados pela linha cheia). O valor se mantém bastante estável em zero ms durante todo o período de referência, com pequenas e transitórias variações de 1 ms. O padrão persiste até aproximadamente 110 s após o início da infusão da droga e a partir daí se mantém no mesmo patamar, indicando o aumento do atraso entre sinal potencial evocado atual e de referência. Pouco depois do início eletrográfico (linha tracejada), a curva passa a conter oscilações de alta amplitude, fixando-se várias vezes em valores de baixa latência. O padrão é o mesmo para o rato #20, cujo aumento do atraso ocorre cerca de 15 s antes do início eletrográfico da crise.

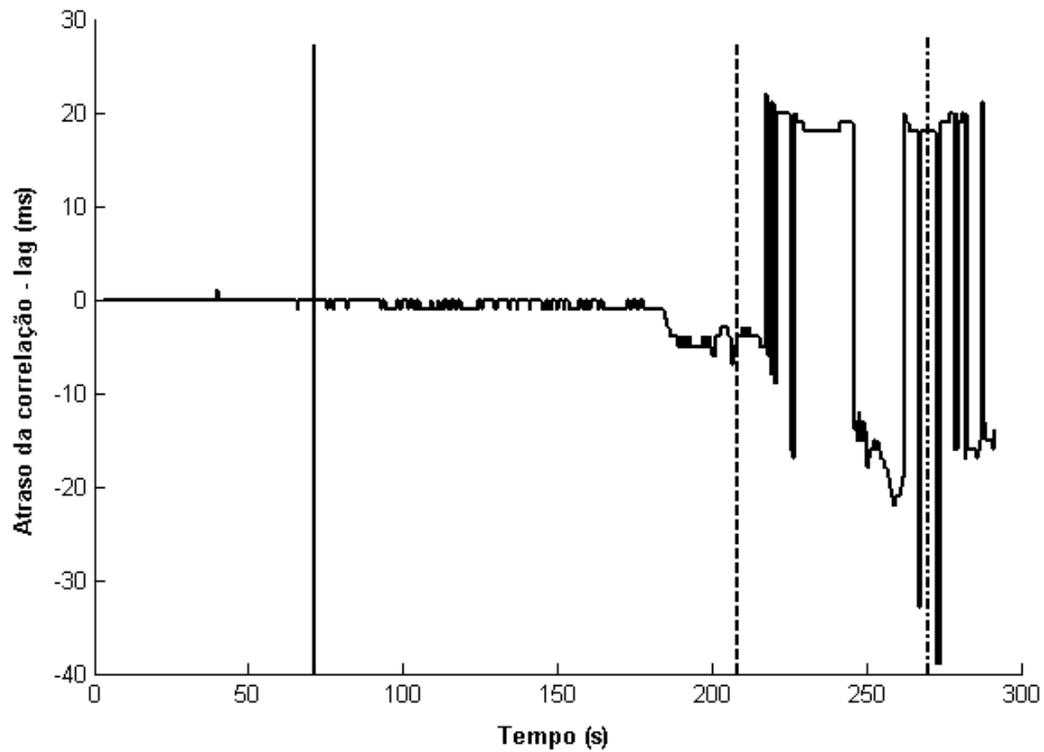


Figura 62 - Atraso da correlação cruzada entre potenciais evocados durante o período de referência, o período pré-ictal e o período ictal. As fronteiras entre períodos são demarcadas com a linha vertical cheia e a tracejada. Esta última indica início eletrográfico. A linha vertical traço-ponto indica o instante de início da CTCG.

Este padrão se repetiu para a maioria dos ratos do grupo. Apesar da ausência de confirmação histológica, o padrão característico de desvio da curva de atraso é intrigante o suficiente para justificar a figura 62, que contém as superfícies codificadas por cor da seqüência de potenciais evocados, já com as curvas de atraso sobrepostas (vide figura 64).

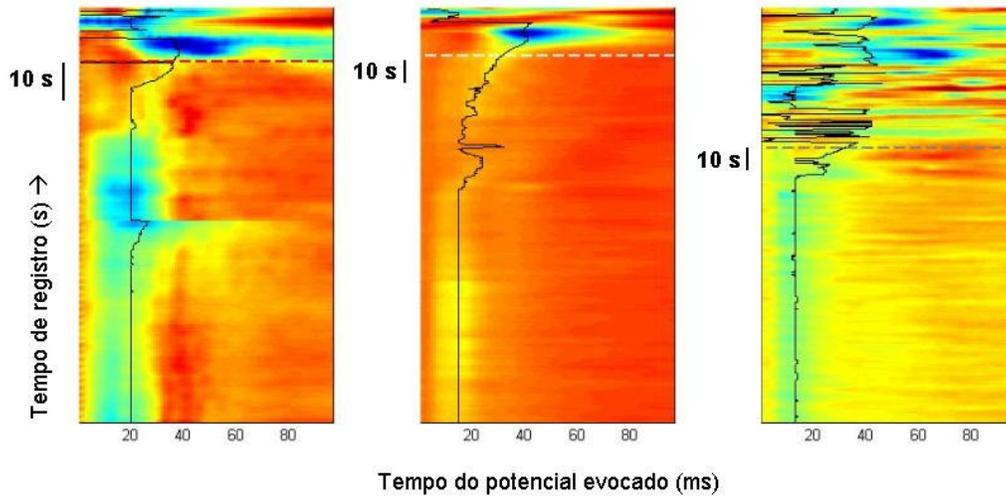


Figura 63 - Superfícies codificadas por cor da seqüência de potenciais evocados nos períodos de referência e pré-ictal.

Considerando os demais ratos sem confirmação histológica incluídos no grupo, o valor do atraso médio nos 5 s do período pré-ictal que precedem os início eletrográfico é significativamente menor ($p < 0,01$, teste t de Student) do que os 5 últimos segundos do período de referência, conforme mostra a figura 63.

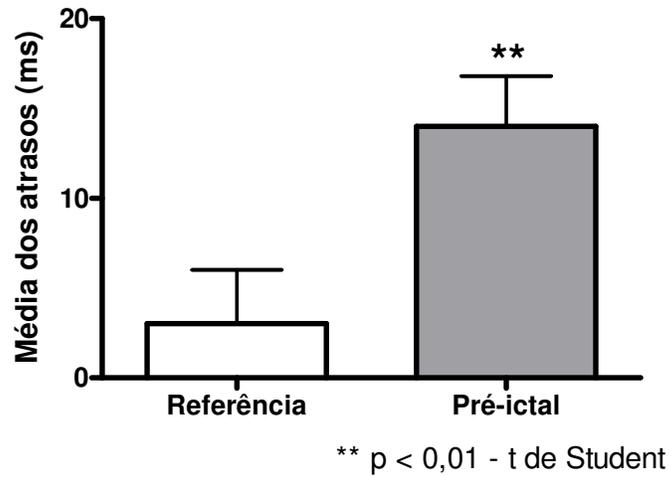


Figura 64 - Análise estatística do atraso do pico de correlação 5 s do período pré-ictal imediatamente antes do início eletrográfico e dos últimos 5 s do período de referência. * $p < 0,01$, teste t de Student.

V.4 – Discussão

As manobras realizadas no rato 1, alterando-se a polaridade do estímulo e registrando-se após a morte do animal, foram desenhadas para garantir que qualquer variação observada no registro fosse de origem fisiológica e de resposta ao estímulo. Na possibilidade que a deflexão fosse mero artefato elétrico ou eletrônico, a sua direção deveria se inverter conforme a inversão da polaridade. Isso não ocorreu, indicando que o fenômeno tem origem diversa. O achatamento completo do registro, após a morte do rato, liga a deflexão observada ao estado fisiológico do sistema, indicando, portanto a sua origem. Ou seja, a morfologia observada é a resposta neuronal à ativação da amígdala por um estímulo elétrico, configurando-se, portanto, um potencial evocado.

O padrão de deflexão do atraso da correlação se repete em ambos os ratos considerados nesse experimento. Portanto, ao menos nos dois ratos válidos, o parâmetro demonstrou completa sensibilidade ao período pré-ictal. Em dois (2) dos ratos descartados da análise, a deflexão do valor ocorreu também durante o período de referência, o que acarretaria em falsos positivos. Por outro lado, considerando o padrão bastante estável do atraso durante o período de referência em todos os outros ratos, a representatividade desses resultados discrepantes deve ser colocada em perspectiva. Cabe avaliar se o fenômeno é decorrente de algum processo neurofisiológico ou devido a algum outro fator espúrio. Uma abordagem adequada seria usar registros de longa duração em modelos animais de Epilepsia, tal como o de pilocarpina, com diversas crises ao longo de um período. Nesse caso, é possível observar o comportamento do parâmetro em uma situação mais ecologicamente orientada, em que o animal passa por outros estados neurodinâmicos fisiológicos.

O valor do atraso da correlação correspondeu diretamente à posição relativa do vale do potencial evocado. Isso pode ser observado através da sobreposição da

superfície de potenciais evocados com a curva do atraso, conforme demonstrado na figura 64 (vide também figura 62). Durante o período pré-ictal, a dinâmica da rede reverberante no sistema límbico atua de maneira a aumentar a latência do vale, atrasando-o.

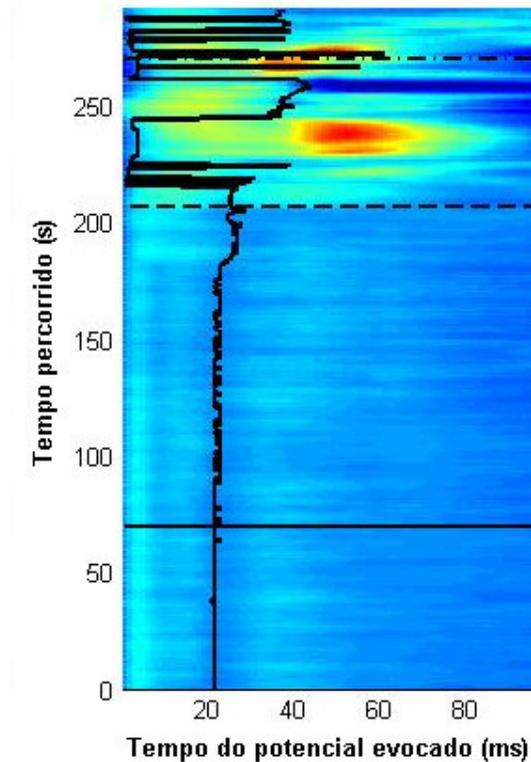


Figura 65 - Sobreposição da superfície de potenciais evocados com o atraso da correlação entre potenciais.

O significado desse padrão ainda não foi completamente compreendido. A priori, era esperado o comportamento inverso: que a latência diminuísse no período pré-ictal devido à facilitação do acoplamento entre substratos, decorrente da diminuição do tônus inibitório. Entretanto, ainda que a amígdala tenha conexões di-sinápticas com o hipocampo, a atividade evocada na amígdala pode ter se propagado até o hipocampo através de algum outro circuito. Essa noção é corroborada pelo valor basal da latência, em média superior a 15 ms, envolvendo provavelmente, bem mais do que as duas

sinapses que separam os substratos. Um circuito mais complexo e longo pode ser influenciado de maneira mais ampla, tornando o padrão de flutuação da latência do potencial evocado bem mais intrincado.

Outra forma de ser interpretar o resultado advém dos trabalhos de Bertram e cols., 1998. Neste estudo, foram realizado registros extracelulares *in vitro* de CA1 hipocampal frente a estimulação talâmica e pôde ser observado uma nítida diferença entre as respostas de cérebros de ratos normais e de ratos submetidos a um modelo crônico de epilepsia. Em particular, a resposta do cérebro epilético foi polifásica, enquanto que a do rato normal continha apenas uma positividade. O padrão polifásico de resposta tem o efeito de alargar a base da onda, deslocando para a direita do eixo temporal o pico da envoltória. Há a possibilidade de que, nos resultados obtidos aqui, esteja-se observando o mesmo padrão de resposta polifásico, no entanto, através de um filtro passa-baixa bem mais rigoroso, cuja saída é apenas a envoltória da onda. Ou seja, o aumento da latência do atraso pode ser um simples artefato oriundo do condicionamento de um sinal, em sua realidade polifásico, com base alargada e pico deslocado, no entanto distorcido pelo filtro. Nesse caso, a conclusão deve seguir a linha de raciocínio proposta no referido estudo, situando o aspecto de hipersincronismo em uma rede reverberante no sistema límbico, como mecanismo ictogênico e epileptogênico.

Há, ainda, uma terceira possibilidade, cuja confirmação extrapola os dados, mas que deve ser mencionada. É possível que o atraso da latência represente, na verdade, a tentativa do sistema de reagir ao insulto neuroquímico excitatório da antagonização GABAérgica. Apesar de uma ação abrangente, o PTZ é infundido lentamente e, portanto, não acomete todo o tecido neural de uma só vez. Os grupos neuronais não acometidos pela condição de hiperexcitabilidade, reagindo com o aumento do tônus

GABAérgico, podem ser os responsáveis pelo aumento da latência do potencial evocado. Em determinado momento, a quantidade de convulsivante é tão grande que a reação se torna ineficaz e a crise se instala por completo. Nesse momento o potencial evocado deveria diminuir a latência drasticamente. De fato, uma revisão cuidadosa dos resultados apresentados mostra o aparecimento de múltiplos vales no potencial evocado concomitante ao aparecimento dos comportamentos convulsivos generalizados. Via de regra, o primeiro vale desse período aparece imediatamente após o artefato de estímulo (omitido nas figuras), com poucos milissegundos de latência, correspondendo, possivelmente, a um acoplamento direto e patológico dos substratos investigados. Outros vales com maior latência podem corresponder a outras frentes de onda, oriundas de novos circuitos reverberantes, mais amplos, que se acoplam aos substratos à medida que a neurodinâmica se aprofunda no período ictal.

Ainda que a neurofisiologia subjacente ao período pré-ictal não esteja completamente elucidada, os resultados aqui apresentados indicam claramente a existência de um período pré-ictal com neurodinâmica distinta. De fato, é diferente o suficiente para permitir sua detecção através de técnicas eletrofisiológicas, como a avaliação da morfologia do potencial evocado no hipocampo pela estimulação elétrica da amígdala.

Certamente, a histologia é crucial para validar os resultados de experimentos em neurofisiologia cujo substrato é peça chave para o raciocínio e discussão do fenômeno em questão. De fato, já estão sendo feitos esforços no sentido de contornar a falta de informação quanto ao posicionamento dos eletrodos, através da correção das falhas do procedimento histológico e o aumento do número de animais desse grupo experimental.

É, portanto, natural e compreensível que as conclusões oriundas desses resultados recebam críticas, principalmente devido ao pequeno número de ratos válidos.

Entretanto, há de se considerar alguns aspectos deste problema que corroboram a validade dos resultados.

Primeiramente a ação do PTZ é bastante inespecífica, acometendo, desde o início, uma série de estruturas prosencefálicas e, mais tardiamente, também do tronco encefálico. Considerando-se que a amígdala mantém conexões bastante abrangentes com outras estruturas prosencefálicas, é bastante plausível que o aumento da força de reverberação que precede a crise possa ser detectado através das alterações do potencial evocado registrado em outros substratos vizinhos que não hipocampo per se. A priori, não são esperados erros grosseiros de posicionamento dos eletrodos, localizando-os fora do prosencéfalo e, mesmo, das imediações do sistema límbico. Segundo, o resultado proveniente do rato, cuja localização de eletrodos é reconhecidamente correta, é certamente um caso representativo do grupo. Por fim, ainda que fique prejudicada a compreensão do fenômeno neurofisiológico, o achado de que potenciais evocados em substratos diversos do prosencéfalo se alteram previamente ao início eletrográfico da crise têm relevância científica. Particularmente, corrobora a noção de que crises, incluindo as obtidas em modelos animais, não são fenômenos abruptos e, portanto a neurodinâmica se modifica lentamente para culminar em crise convulsiva. A consequência disso é que é possível desenvolver sistemas de alarme de crises eficientes e, mais ainda, que potenciais evocados medidos nos substratos envolvidos podem ser uma forma eficaz de resolver o problema de predição de crises.

VI – Discussão geral

***O NNC é “onde o pensamento da gente
se forma mais forte que o poder do lugar.”***

*Quase uma heresia, não fosse a qualidade desse laboratório, com o tesouro da
literatura brasileira, Grande Sertão: Veredas, de Guimarães Rosa*

A proposta inicial desta tese foi investigar a neurodinâmica da ictogênese em modelos animais de Epilepsia, através de registro e estimulação, e propor um modelo de mecanismo. Sob a égide deste modelo, usar a estimulação elétrica em padrões temporais específicos para supressão de crise e traçar marcadores adequados para detecção de um período pré-ictal preditor de crises, ambos mais fisiologicamente orientados do que tem sido feito até então. Como mencionado na introdução, a consolidação dessas inovações representa avanços relevantes no tratamento das Epilepsias.

Para realizar a investigação proposta nos objetivos desta tese, foi realizada uma série de desenvolvimentos tecnológicos que resultaram em um sistema de registro e estimulador elétrico, cujos desempenhos podem ser equiparados ao de marcas estabelecidas. Apesar de ter havido outras motivações, foi crucial o projeto e construção destes sistemas para a obtenção dos resultados registrados aqui. Em particular, o projeto do sistema de registro proprietário facilitou o processamento dos dados através de rotinas matemático-computacionais não disponíveis nas plataformas comerciais. Outras características técnicas, ainda que disponíveis comercialmente, foram privilegiadas nos equipamentos desenvolvidos, aumentando a qualidade dos resultados obtidos. Exemplo disso são os avanços realizados no *headstage*, cuja amplificação diferencial propiciou registros bipolares intracefálicos de alta qualidade. Ainda mais crítico foi o desenho do estimulador, que permitiu a geração um padrão temporal não periódico de estimulação elétrica, inédito e indispensável para o experimento do capítulo IV. Apesar de ter consumido uma fração considerável dos esforços dessa tese, todo esse trabalho se justificou pelo benefício direto para o aparelhamento do laboratório e também, ainda que de forma humilde, para o repertório de soluções tecnológicas realizadas em território nacional.

Os resultados encontrados nos experimentos contribuíram para a compreensão do processo da ictogênese, ao mesmo tempo em que levantaram novas hipóteses prontamente investigáveis acerca do fenômeno.

No capítulo III, as análises do EEG reforçam fortemente três aspectos importantes da neurodinâmica da ictogênese já suscitados por trabalhos anteriores: hipsincronismo, hiperexcitabilidade e redes reverberantes. Os parâmetros observados localizam temporalmente cada um dos conceitos neurodinâmicos, correlacionando-os com características específicas de cada modelo de Epilepsia testado e seus respectivos substratos neurais. Dessa forma foi possível elaborar um modelo que integrasse os resultados com os aspectos mencionados. A condição inicial de hiperexcitabilidade leva ao funcionamento hipsincrônico do tecido neural, originando múltiplas redes reverberantes que, por sua vez, correlacionam-se intimamente com um determinado comportamento convulsivo conforme a localização anatômica dos substratos ativados.

A idéia de redes reverberante como mecanismo de propagação e sustentação de crises não é nova, mas permanece por ser explicada de forma mais completa. Os resultados experimentais obtidos no capítulo IV trazem uma nova evidência a favor dessa noção. Estímulos elétricos de padrões temporais distintos modulam diferencialmente o comportamento convulsivo da crise. Em particular, o estímulo ressonante (periódico) reforça a reverberação, acarretando o surgimento precoce de comportamentos convulsivos correlacionados com os substratos neurais estimulados. Ao contrário, o estímulo anti-ressonante atrasa robustamente o aparecimento de comportamentos convulsivos generalizados, devido, provavelmente, a um impedimento da reverberação de circuitos neurais mais abrangentes. As novas idéias puderam ser facilmente encaixadas no modelo inicialmente proposto.

O conceito de reverberação é novamente colocado em prática no experimento do capítulo V. Em se considerando que redes reverberantes representam um fenômeno intrínseco e necessário para a ictogênese, realizar uma medida direta desse aspecto poderia ter utilidade na detecção o período pré-ictal. O potencial evocado é uma forma de se avaliar a “função de transferência” entre dois pontos distintos do circuito neural, cujas alterações em momentos que precedem a crise podem ser sutis demais para serem observados por medidas mais grosseiras e abrangentes, como a análise de EEG. De fato, o estudo da latência do potencial evocado a partir do atraso do pico da correlação cruzada indicou nítidas deflexões prévias ao início eletrográfico, Portanto, os resultados da seção apontam no sentido da capacidade preditiva da metodologia proposta, ainda que contassem com um número pequeno de animais. Os dados levantados não são suficientes para assertivas definitivas acerca da neurofisiologia do período pré-ictal. Mesmo assim, o padrão estereotipado da evolução temporal do potencial evocado é intrigante e permitiu que se elaborassem hipóteses racionais e testáveis do fenômeno em questão.

Além de uma nova proposta de preditor de crise feita no capítulo V, a avaliação da capacidade de detecção ou predição de diversas técnicas realizada nos experimentos do capítulo III representa, em alguns aspectos, uma contribuição inédita. Apesar de não ser a primeira vez que se testam metodologias de predição em ratos, a literatura nesse campo é bastante escassa e possivelmente hermética, com contribuições mais amplas oriundas de testes clínicos. Por outro lado, nenhuma das técnicas descritas e usadas nesse trabalho havia sido usada no sentido de predizer crises em ratos, apenas em humanos. Em particular, a similaridade dinâmica, que recebeu grande atenção pela sua suposta capacidade preditiva diferenciada, foi avaliada em ratos pela primeira vez. Isso tem dupla utilidade. Primeiramente, auxilia a verificar a eficácia do método em

contextos neurofisiológicos diferentes, ampliando o conhecimento acerca do mesmo. Segundo, e talvez mais importante, permite sugerir diferenças entre a neurodinâmica da ictogênese no encéfalo humano e no encéfalo de ratos submetidos a modelos animais de Epilepsia. Decorrência direta disso é o uso mais racional dos modelos.

No aspecto clínico, há uma contribuição para a alternativa de estimulação elétrica do SNC (EE) para o tratamento das Epilepsias. Classicamente o EE consiste de estimulação de alta frequência e seu suposto mecanismo de ação é a inativação do substrato alvo e vizinhança. Talvez uma proposta mais interessante seja a estimulação elétrica dessincronizante do circuito neural reverberante, conforme proposto no capítulo IV. A principal vantagem é um menor número de pulsos por segundo que, quando no padrão periódico inerente ao EE, é tido como pró-convulsivante, noção esta corroborada pela bibliografia e pelos resultados encontrados. O benefício do menor número de pulsos é uma menor energia entregue ao tecido neural podendo, portanto, representar um insulto mais brando. Outra vantagem é que esta proposta de estimulação elétrica não periódica age em um aspecto diverso da ictogênese: reverberação de redes; enquanto que o tratamento farmacológico e a EE clássica atuam na hiperexcitabilidade neuronal. Acredita-se que a estimulação anti-ressonante pode minimizar possíveis prejuízos no desempenho cognitivo induzido pela inibição do SNC. Naturalmente, isso deve ser testado.

Idealmente a estimulação para supressão de crises deve ser acoplada a sistemas de detecção ou, preferencialmente, predição das mesmas, visando diminuir a ocorrência de efeitos colaterais do tratamento. A solução deste problema, ainda que não testada de forma direta, pode ter sido resolvida com a tecnologia desenvolvida aqui. Trata-se apenas de acoplar a metodologia de predição descrita no capítulo V com a estimulação elétrica não-periódica descrita no capítulo IV através de desenvolvimentos de software.

De fato, a perspectiva de implementar esse sistema de neurofeedback para predição e supressão de crises é empolgante e causa pesar não ter havido tempo hábil para realizá-lo no escopo dessa tese. Tal sistema retroalimentado de registro e estimulação já foi descrito e realizado em outros contextos das neurociências (Nicoletti 2001; Nicoletti 2003) e mesmo em Epileptologia (Faselow et al. 2000). Entretanto, nesse caso, há duas diferenças cruciais: a estimulação elétrica é realizada em estruturas do sistema nervoso periférico e está acoplada apenas à detecção simplória de crises. A possibilidade de atuar, via estimulação elétrica, na neurodinâmica da ictogênese, antes do surgimento da crise per se, representa uma forma inédita e poderosa de se estudar os mecanismos subjacentes ao fenômeno. Por exemplo, um novo ganho de conhecimentos acerca das metodologias de predição de crises poderia ser impulsionado por estudos que avaliassem o comportamento dos parâmetros preditivos, frente a diferentes padrões de estimulação elétrica, em diversas estruturas do SNC.

A nova metodologia de predição de crises, proposta aqui, encontra-se em estágios bem iniciais, inclusive devido ao limitado número de ratos usados para a obtenção dos resultados. Ainda assim, representa uma possibilidade que deve ser considerada. As alterações do potencial evocado no sistema límbico mostram sensibilidade bastante superior às outras técnicas avaliadas no capítulo III, inclusive em comparação com as alternativas mais promissoras para antecipação de crise (similaridade dinâmica). Adicionalmente, o padrão bastante estável do parâmetro durante o período de referência sugere a possibilidade de alta especificidade ao período pré-ictal. Caso ambos os aspectos, sensibilidade e especificidade, revelem-se superiores e suficientemente altos, a metodologia significará um importante avanço na ciência de antecipação de crises.

Caso essas condições fossem satisfeitas, a metodologia encontraria dificuldades de ordem prática clínica: o procedimento cirúrgico de implante de eletrodos profundos (Niedermeyer 1993). Por outro lado, a neurocirurgia está em constante desenvolvimento e diversas restrições técnicas para implante de eletrodos têm sido contornadas (Kralik et al. 2001; McCarthy et al. 1992). Acredita-se, portanto, que em breve os procedimentos de implante de eletrodos profundos cronicamente poderão ser feitos de forma mais corriqueira, acarretando pouco ou nenhum efeito adverso. Ainda que essa possibilidade não se concretize por completo, há alternativas hipotéticas para a avaliação da neurodinâmica de reverberação que contornam o problema. Uma dessas hipóteses, suscitadas neste trabalho, é que a avaliação mais cuidadosa das espículas do período inter-ictal, existentes no EEG de cérebros com Epilepsia, pode ser capaz de detectar o período pré-ictal. O racional por detrás da idéia é de que as espículas representam a atividade oriunda especificamente de redes reverberante ictogênicas, mas que não culminam em crises. As análises feitas sobre essa atividade são de caráter geral e superficial e não têm obtido sucesso na predição de crises, tal como o estudo da relação da frequência de aparecimento de espículas com o período pré-ictal (Katz et al. 1991; Lange et al. 1983). Propõe-se, portanto, que outros parâmetros, principalmente de avaliação da morfologia, sejam usados para a predição das crises. Uma possibilidade é a clusterização das espículas segundo seu formato, observando se os agrupamentos correspondem aos períodos inter-ictal, ictal e, mais importante, pré-ictal. Isso pode ser feito na clínica com eletrodos de escalpo, cuja fixação é corriqueiramente realizada em situação ambulatorial. Por outro lado, mesmo que necessite de implante de eletrodos profundos, a metodologia de potenciais evocados encontra aplicabilidade clínica. Em particular, a monitoração pré-cirúrgica para localização do foco epileptogênico pode se beneficiar da técnica. O alarme de crises pode facilitar a sincronização da administração

de marcadores metabólicos para mapeamento funcional por técnicas de imagem não invasivas dos substratos candidatos à ablação cirúrgica.

Ambos os desenvolvimentos, nova metodologia para predição de crises e alternativa não periódica da técnica de estimulação elétrica do SNC, encontram aplicabilidade direta na clínica epileptológica. Como foi mencionado na introdução, têm o potencial de aumentar substancialmente a qualidade de vida de pacientes com Epilepsia, principalmente no caso de intratabilidade. Naturalmente, um conjunto de questões acerca de ambas as idéias deve ser investigado antes que se faça uma proposta definitiva para testes clínicos. Entretanto, levando-se em consideração que ambas as idéias representam inovações fortemente orientadas à neurofisiologia do fenômeno, muito provavelmente estas questões poderão ser investigadas de forma mais direta e racional. Cabe refrisar algumas delas, abaixo pontuadas.

- Investigação complementar dos aspectos de hiperexcitabilidade, hipersincronismo e reverberação de redes da neurodinâmica da ictogênese, através de metodologias alternativas ou inéditas no contexto, tais como amostragem espacial de campo elétrico (Moraes et al. 2005b) e múltiplos registros multi-unitários (Nicoletis et al. 1999).
- Avaliar o comportamento dos parâmetros neurodinâmicos observados em resposta a manobras que interferem na ictogênese, tais como intervenção farmacológica, procedimentos de ablação e, sobretudo, de estimulação elétrica;
- Investigação dos efeitos pró ou anticonvulsivantes de outros padrões supostamente anti-reverberantes, conforme gerados por diferentes algoritmos;
- Estudo de possíveis efeitos colaterais dos diversos padrões da estimulação elétrica, através da análise de desempenho em tarefas de aprendizado e memória em ratos;

- Caracterização de sensibilidade e especificidade da metodologia de predição por potenciais evocados em contextos realisticamente orientados;
- Incorporação do conceito de “Característica de Predição de Crises” para análise de desempenho da metodologia de predição (Maiwald et al. 2004);
- Investigação dos mecanismos responsáveis pelo padrão de alteração do potencial evocado no período pré-ictal;
- Investigação da capacidade preditiva da clusterização de espículas inter-ictais do EEG de cérebros Epilépticos.

Por fim, tendo em vista toda a discussão, acredita-se que esta tese realiza contribuições significativas em três aspectos importantes da atividade científica: desenvolvimento tecnológico, achados científicos e elaboração de novas hipóteses passíveis de investigação.

Apêndice A: fundamentos matemáticos

A.1 – Energia

O conceito de energia tem significado físico importante e se relaciona com a quantidade de trabalho que um sistema é capaz de realizar. Por definição, a energia potencial elétrica U é dada por:

$$U = Vq, \quad (1)$$

onde V é o potencial elétrico e q é a carga.

No caso de uma carga dq que se desloca por um decréscimo de potencial de intensidade V , a energia potencial elétrica diminui de intensidade conforme dados por:

$$dU = Vdq. \quad (2)$$

No entanto, pela definição de corrente, a carga pode ser dada por:

$$dq = idt \quad , \text{ logo:}$$

$$dU = Vidt \quad (3)$$

Caso se considere que a energia é dissipada sobre uma carga puramente resistiva, a equação (3) pode ser reescrita como:

$$dU = \frac{V^2}{R} dt \quad , \quad (4)$$

onde R é a resistência da carga. Agora, integrando ambos os lados da equação (4), obtém-se:

$$U = \frac{1}{R} \int V^2 dt \quad . \quad (5)$$

Dessa forma, a energia de uma série temporal de valores de tensão:

$$\{v_i\}_{i=0}^{N-1},$$

pode ser dada por:

$$U = \frac{1}{R} \sum_{i=0}^{N-1} v_i^2 \quad (6)$$

Para o cálculo da energia de um serie temporal de um registro de EEG, o termo referente à condutância é dispensado, uma vez que é difícil avaliar esse parâmetro adequadamente. Portanto, a energia de um sinal de EEG, dado por:

$$U = \sum_{i=0}^{N-1} v_i^2, \quad (7)$$

representa uma avaliação semi-quantitativa do parâmetro real.

As curvas de energia média, obtidas nesta tese, são os valores de energia calculados em janelas temporais de 3 s consecutivas e normalizados pelo número de pontos dentro da janela. O seja, a energia média U_m é dada por:

$$U_m = \frac{U}{N}. \quad (8)$$

A energia acumulada nada mais é que o somatório cumulativo das energias cronologicamente anteriores, ou seja (Maiwald et al. 2004):

$$AE_j = \frac{1}{10} \sum_{k=10^{j-9}}^{10^j} U_k + AE_{j-1}, \quad (9)$$

onde:

$$j = 1, 2, \dots \text{ e } AE_0 = 0$$

Os incrementos de energia média podem ser dados por:

$$iAE_j = \frac{1}{10} \sum_{k=10^{j-9}}^{10^j} E_k = AE_m - AE_{m-1}. \quad (10)$$

Os algoritmos que implementam estes cálculos foram desenvolvidos dentro do escopo de trabalhos desta tese.

A.2 – Espectro de potência

O espectro de potência de um sinal é a sua decomposição em termos das componentes de frequências (funções de base senoidais) que o constituem, configurando, portanto, a sua representação no domínio da frequência. É obtido através da transformada de Fourier, uma transformada integral que expressa uma função como a integral de funções senoidais multiplicadas por coeficientes ("amplitudes") e com suas respectivas fases.

Dada uma função $f(t)$ contínua e integrável, a transformada de Fourier $F(\omega)$, sendo ω o domínio de frequências angulares, pode ser calculada por (Weisstein 2004c):

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{i\omega t} dt \quad (1)$$

Para uma série temporal

$$\{x_k\}_{k=0}^{n-1} \quad (2)$$

utiliza-se a transformada de Fourier discreta (DFT) (Weisstein 2003):

$$f_j = \sum_{k=0}^{n-1} x_k e^{-\frac{2\pi}{n}jk} \quad (3)$$

Computacionalmente, a DFT é calculada por algoritmos como a “Fast Fourier Transform” (FFT), capaz de reduzir o número de computações necessárias de $2N^2$ para $2N \log N$ (Weisstein 2004b). Em particular, a rotina “spectrogram.m”, usada nessa tese, usa uma variação da FFT, denominado “Short-time Fourier Transform”, para o cálculo do espectro de potência de forma otimizada para trechos menores da série temporal. Basicamente, este *script* retorna uma matriz cujos valores são as amplitudes de cada componente de frequência ao longo do tempo, ficando a informação de fase perdida.

Os detalhes matemáticos específicos dos algoritmos extrapolam o escopo desse texto e, portanto, não serão tratados aqui.

A.3 – Autocorrelação e correlação cruzada

A função de autocorrelação $R_f(t)$ de uma função real contínua $f(t)$ é definida por (Papoulis 1962):

$$R_f(t) = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T f(t) f(t + \tau) d\tau. \quad (1)$$

Dada uma série temporal:

$$\{a_i\}_{i=0}^{N-1}, \quad (2)$$

a sua autocorrelação é o vetor ρ_i dado por:

$$\rho_i = \sum_{j=0}^{N-1} a_j a_{j+i}, \quad (3)$$

onde o índice máximo é o valor $N - 1$ (Zwillinger 1995).

A rotina do Matab “xcorr.m”, usada nesta tese para cálculo das autocorrelações, implementa um algoritmo para cálculo de (3), de forma a considerar a série temporal como proveniente de um sinal infinito. Nesse caso, a expansão corresponde a:

$$\rho_i = \sum_{j=-N+1}^{N-1} a_j a_{N+j+i-1}. \quad (4)$$

Para o cálculo da correlação cruzada de duas séries temporais, basta substituir o segundo termo do produto pelo valor correspondente da segunda série temporal. Ou seja, dadas as séries temporais de mesmo tamanho:

$$\{a_i\}_{i=0}^{N-1} \quad \text{e} \quad \{b_i\}_{i=0}^{N-1},$$

a correlação cruzada entre elas é dada por:

$$\rho_i = \sum_{j=-N+1}^{N-1} a_j b_{N+j+i-1} \quad (5)$$

Caso as séries correspondam a vetores de tamanhos diferentes, o menor é preenchido com zeros até se igualar em tamanho com o maior.

Nas curvas de correlação desta tese, o valor correspondente a cada janela temporal é o somatório do vetor de correlação para aquela janela. Ou seja, o valor da correlação C referente à janela temporal do instante t é dado por:

$$C(t) = \sum \rho_i(t). \quad (6)$$

O valor do atraso do pico de correlação nada mais é que o valor do atraso para o qual a correlação é máxima em módulo. Ou seja, o atraso do pico de correlação L é dado por:

$$L = m - N, \quad (7)$$

sendo que m satisfaz:

$$\rho_m = \max(\rho_i). \quad (8)$$

O valor de L é corrigido segundo a frequência de amostragem usada na aquisição da série temporal.

A.4 – Dimensão fractal

A dimensão fractal, também denominada de dimensão de capacidade, é utilizada para medir a irregularidade de um objeto imerso em um espaço capaz de contê-lo, como por exemplo, um traçado irregular que está contido em uma superfície bidimensional. De forma intuitiva, este traçado não pode ser realizado em um espaço de dimensão 1 (uma reta) e nem é capaz de abranger toda uma superfície de dimensão 2, portanto o valor de sua dimensão está entre 1 e 2. O cálculo da dimensão fractal é capaz de determinar o valor exato da dimensão de um objeto irregular.

Em termos matemáticos, a dimensão fractal ($d_{fractal}$) pode ser calculada por (Weisstein 2004a):

$$d_{fractal} = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln N}{\ln \varepsilon} \quad (1)$$

onde N é o número finito de elementos necessários para cobrir o objeto completamente e ε é o tamanho deste elemento.

O correlato computacional da dimensão fractal é a dimensão *box-counting*, nome do algoritmo que estima a dimensão fractal do objeto através da contagem do número elementos regulares (segmento de reta para espaço unidimensional; quadrado para bidimensional; cubo para tridimensional e hipercubo para espaços de maior dimensão), de diferentes tamanhos, necessários para recobrir o objeto por completo. Em termos matemáticos, na iteração n , considerando L o tamanho do objeto (comprimento do seguimento de reta, lado do quadrado, aresta do cubo e do hiper-cubo) e N o número de elementos contados, a dimensão fractal (df_n) pode ser dada por:

$$df_n = \frac{\log(N)}{\log(1/L)} \quad (2)$$

onde L satisfaz:

$$L = \frac{1}{2^n} \tag{3}$$

e $n = 0, 1, 2, \dots$

A estimativa final da dimensão ($d_{fractal}$) fractal é a inclinação média da reta obtida pelo gráfico log-log de N em função de n , tal com descrito em (2).

A.5 – Similaridade dinâmica

O algoritmo de similaridade dinâmica, implementado na sua totalidade nessa tese, segue rigorosamente os passos descritos em Van Quyen, 1999. A descrição que se segue é, de forma geral, a transcrição do texto original.

A técnica é baseada em uma abordagem anterior para rastreamento de não estacionariedades de longo prazo em séries temporais. Em linhas gerais, o algoritmo consiste em dividir o EEG em pequenos trechos e comparar, segundo um método de correlação entre reconstruções geométricas, o tanto que pares de trechos distantes são diferentes entre si. Para a predição de crises, trechos do período pré-ictal e ictal (S_t) são comparados com um trecho de referência (S_{ref}), durante a vigília do animal. Por ter alto custo computacional, a forma clássica de realizar a reconstrução geométrica do sinal (Takens 1981) foi substituída por uma nova metodologia (Janson et al. 1998; Pikovsky et al. 1997; Sauer 1994). Essa nova técnica faz a imersão do sinal através da obtenção de coordenadas m -dimensionais, dadas por m intervalos de tempo consecutivos, calculados a partir dos instantes de tempo em que a série temporal cruza a linha de zero subindo. Ou seja, denominando T_n os instantes de tempo em que o EEG cruza a linha de zero subindo, os intervalos I_n são dados por:

$$I_n = T_{n+1} - T_n \quad (1)$$

Cada coordenada da imersão A_n é dada por m intervalos consecutivos:

$$A_n = (I_n, I_{n-1}, \dots, I_{n-m+1}) \quad (2)$$

Nos estudos de Van Quyen e na investigação desta tese, foi usado $m = 16$.

Para otimizar a reconstrução geométrica de séries temporais pequenas e diminuir o nível de ruído, foi feita a decomposição por valor singular (SVD) do espaço de imersão m -dimensional, identificando a trajetória ótima. Ou seja, chamando $\mathbf{A}(S_{ref})$ a

matriz com a trajetória do trecho de referência S_{ref} (cada linha corresponde a uma coordenada de m dimensões), a SVD é computada pela transformação:

$$\mathbf{A}(S_{ref}) \rightarrow \mathbf{X}(S_{ref}) = \mathbf{A}(S_{ref}) \cdot \mathbf{V} , \quad (3)$$

onde $\mathbf{X}(S_{ref})$ é a matriz da trajetória projetada na base \mathbf{V} definida pelos auto-vetores da matriz de covariância

$$\mathbf{A}(S_{ref})^T \cdot \mathbf{A}(S_{ref}) \quad (4)$$

O próximo passo é comparar a dinâmica de referência, reconstruída geometricamente por $\mathbf{X}(S_{ref})$ com a dinâmica de trechos consecutivos de 25 s do EEG do período pré-ictal e ictal. Para possibilitar a comparação do conjunto de pontos da dinâmica de referência com o conjunto de pontos da dinâmica de teste, que contém tamanhos diferentes, foi considerado apenas um “esqueleto básico” da referência, constituído da seleção aleatória de um número reduzido de pontos do conjunto total, de forma a se equiparar em tamanho ao conjunto de pontos da dinâmica de teste. Isso provê um mimético resumido $\mathbf{Y}(S_{ref})$ da reconstrução da dinâmica de referência, extraindo as ocupações mais freqüentes do espaço de fase.

A similaridade dinâmica é, então, estimada entre a dinâmica de referência $\mathbf{Y}(S_{ref})$ e a projeção $\mathbf{X}(S_t)$ da reconstrução geométrica de S_t nos eixos principais da dinâmica de referência. Em termos matemáticos:

$$\mathbf{X}(S_t) = \mathbf{A}(S_t) \cdot \mathbf{V} \quad (5)$$

sendo \mathbf{V} a matriz de auto-vetores calculada anteriormente em (4).

Para isso, foi usada a integral de correlação cruzada (Kantz 1994):

$$C(S_{ref}, S_t) = \frac{1}{N_{ref} \cdot N_t} \sum_{i=1}^{N_{ref}} \sum_{j=1}^{N_t} \Theta(r - \| Y_i(S_{ref}) - X_j(S_t) \|) \quad (6)$$

onde Θ é a função degrau de Heaviside, $\| \|$ é a norma euclidiana e N_{ref} e N_t denotam o número de pontos de cada conjunto de referência de teste, respectivamente.

Esta medida é probabilidade de se encontrar pontos da reconstrução de S_t na vizinhança de uma hiper-esfera de raio r a partir dos pontos da reconstrução de S_{ref} . Nessa investigação, tal como nos trabalhos originais, r foi definido como 30% da distribuição acumulada das vizinhanças entre pontos da reconstrução da referência.

Por fim, para aumentar a capacidade discriminatória entre referência e teste, foi usada uma taxa de correlação cruzada dada por:

$$\gamma(S_{ref}, S_t) = C(S_{ref}, S_t) / \sqrt{C(S_{ref}, S_{ref})C(S_t, S_t)} \quad (7)$$

γ varia de 0 (dinâmicas muito diferentes) a 1 (dinâmicas muito similares) e provê uma medida sensível de similaridade entre dinâmicas.

Apêndice B – Lógica do sistema de gerenciamento de opções

Esta seção discorre a respeito da lógica interna do sistema de gerência de opções do estimulador elétrico, omitida anteriormente para maior clareza do texto. Para tal, repetimos a figura do circuito.

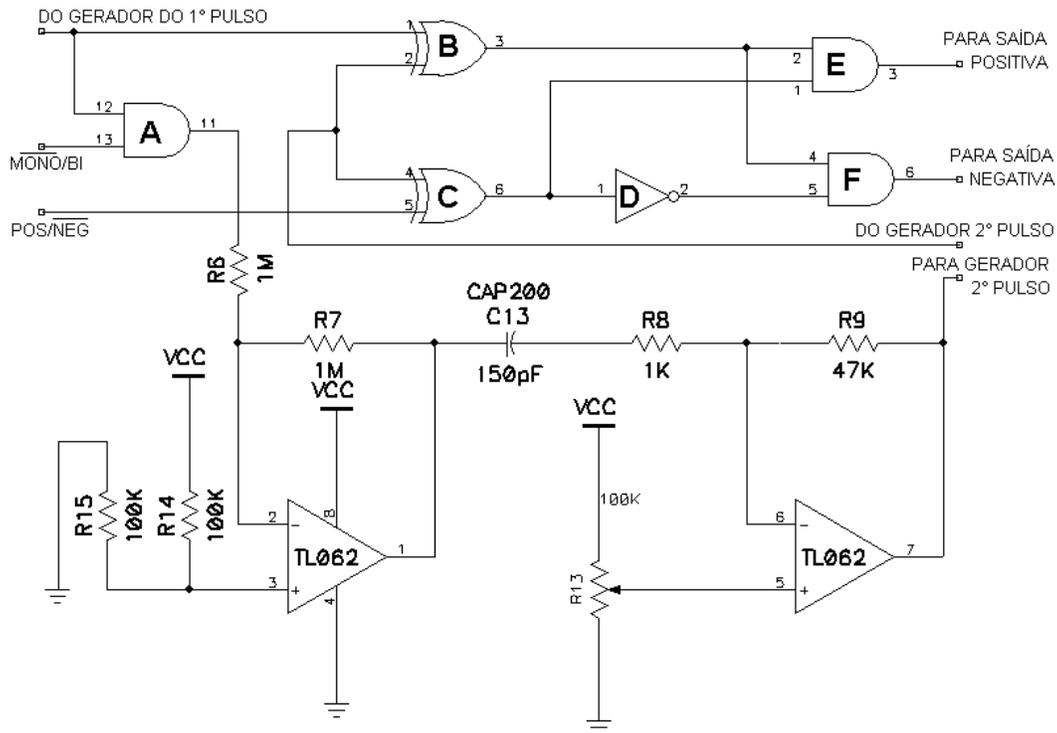


Figura 66 - Circuito do sistema de gerência de opções

Na explicação que se segue, considerar-se-á que a estimulação foi iniciada e, portanto, os pulsos entram no sistema de gerência de opções a partir do gerador do primeiro pulso normalmente.

Quando o bit correspondente ao número de fases está configurado em nível baixo, significando morfologia monofásica, a saída da porta A permanecerá constantemente em nível baixo, implicando que nenhum pulso será redirecionado ao gerador de segundo pulso. Assim, a saída desse sistema que se conecta às entradas das portas B e C também permanecerá em nível baixo. Quando o pulso chega à porta B, ele é imediatamente transmitido para a saída, conforme a lógica da porta X-OR. Se o bit de

polaridade está configurado para nível alto, significando polaridade positiva, a saída da porta C também estará em nível alto. Conseqüentemente, o pulso será transmitido para a saída da porta E, mas não para a da porta F, já que D inverte a saída alta de C. O pulso então flui da porta E para o estágio de saída positivo conectado a ela. Se o bit de polaridade estiver configurado para nível baixo, significando polaridade negativa, a saída de C também será baixa e o pulso será transmitido para a saída de F, mas não a de E, novamente devido à inversão feita por D, comandando o estágio de saída negativo. Caso o bit correspondente ao número de fases esteja configurado em nível alto, significando morfologia bifásica, o pulso de entrada, além de seguir o percurso normal descrito acima, seguirá também para a porção analógica do circuito, que irá gerar um sinal de gatilho na borda de descida do primeiro pulso. O gerador de segundo pulso gera outro pulso com duração controlada que entra nas portas B e C, tal como o primeiro pulso. Antes da chegada do segundo pulso nas portas X-OR, o circuito se comporta exatamente como explicado anteriormente, redirecionando o primeiro pulso para os estágios de saída positivo ou negativo, conforme o estado do bit de polaridade. Logo, no momento em que o segundo pulso chega às entradas das portas B e C, o primeiro pulso já terminou, fazendo com que a outra entrada de B esteja em nível baixo. Assumindo que o bit de polaridade está em nível alto (polaridade positiva) e, portanto, o primeiro pulso foi redirecionado para a saída positiva, o segundo pulso é transmitido para a saída de B, simultaneamente com uma transição de nível alto para baixo na saída de C. Dessa forma, o pulso é redirecionado, devido à inversão de D, para a saída da porta F, mas não para a da E, comandando o estágio de saída negativo. Por fim, caso o bit de polaridade esteja configurado em nível baixo (polaridade negativa), o primeiro pulso será direcionado para a saída negativa e o segundo pulso será transmitido para as saídas de B e C simultaneamente e daí para a saída de E, comandando o estágio positivo.

A parte analógica deste circuito é responsável pela geração do sinal de gatilho para o gerador do segundo pulso. O primeiro OP AMP está configurado para implementar um amplificador inversor de ganho unitário e alta resistência de entrada, para minimizar a entrada de corrente a partir da porta lógica A. O segundo OP AMP é um filtro passa-altas com ganho inversor de -47 V/V , definido empiricamente para geração do sinal de gatilho adequado para a entrada no próximo estágio. A opção de se usar dois OP AMPs e não uma porta NOT e um circuito RC se deve a um único e simples motivo: já havia 6 portas NOT encapsulados em um único chip em uso no circuito, portanto, incluir mais uma porta do tipo implicaria necessariamente em mais um CI de 14 pinos sub-usado no projeto da placa de circuito impresso. Ao contrário, OP AMPs duais, tais como o TL062, são encapsulados em CIs de 8 pinos apenas, simplificando o projeto.

Referências bibliográficas

Annegers, J. F., Coan, S. P., Hauser, W. A., & Leestma, J. 2000, "Epilepsy, Vagal Nerve Stimulation by the NCP System, All-Cause Mortality, and Sudden, Unexpected, Unexplained Death", *Epilepsia*, vol. 41, no. 5, pp. 549-553.

Annegers, J. F., Coan, S. P., Hauser, W. A., Leestma, J., Duffell, W., & Tarver, B. 1998, "Epilepsy, Vagal Nerve Stimulation by the NCP System, Mortality, and Sudden, Unexpected, Unexplained Death", *Epilepsia*, vol. 39, no. 2, pp. 206-212.

Avoli, M., D'antuono, M., Louvel, J., Köhling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G., & Tancredi, V. 2002, "Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro", *Progress in Neurobiology* no. 68, pp. 167-207.

Babb, T. L., Wilson, C. L., & Isokawa-Akesson 1987, "Firing patterns of human limbic neurons during stereoencephalography (SEEG) and clinical temporal lobe seizures", *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, vol. 66, pp. 467-482.

Baumgartner, C., Serles, W., & Leutmezer, F. 1998, "Preictal SPECT in temporal lobe epilepsy: regional cerebral blood flow is increased prior to electroencephalography-seizure onset", *Journal of Nuclear Medicine* no. 39, pp. 978-982.

Ben Menachem, E. 2002, "Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy", *The Lancet Neurology*, vol. 1, no. 8, pp. 477-482.

- Bernard, C., Anderson, A., Becker, A., Poolos, N. P., Beck, H., & Johnston, D. 2004, "Acquired Dendritic Channelopathy in Temporal Lobe Epilepsy", *Science*, vol. 305, no. 5683, pp. 532-535.
- Bernardo, L. S. & Prince, D. A. 1981, "Acetylcholine induced modulation of hippocampal pyramidal neurons", *Brain Research* no. 211, pp. 227-234.
- Bertram, E. H., Zhang, D. X., Mangan, P., Fountain, N., & Rempe, D. 1998, "Functional anatomy of limbic epilepsy: a proposal for central synchronization of a diffusely hyperexcitable network", *Epilepsy Research*, vol. 32, no. 1-2, pp. 194-205.
- Binnie, C. D. 2000, "Vagus nerve stimulation for epilepsy: a review", *Seizure*, vol. 9, no. 3, pp. 161-169.
- Borges, M. A., De Marchi, N. S. A., & Sato, A. K. 2000, "Epileptic syndromes and seizures and their relationship with work: a prospective ambulatory study in 412 epileptic patients", *Arq.Neuro-Psiquiatr*, vol. 58, no. 3A, pp. 691-697.
- Brakel, S., Babb, T., Mahnke, J., & Verzeano, M. 1971, "A compact amplifier for extracellular recording", *Physiology & Behavior*, vol. 6, no. 6, pp. 731-733.
- Brasil, R. O. & Leal-Cardoso, J. H. 1999, "An optically coupled power stimulus isolation unit with high voltage and fast rise time output", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 32, pp. 767-771.
- Buchhalter, J. R. 1993, "Animal Models of Inherited Epilepsy", *Epilepsia*, vol. 34, no. Suppl. 3, p. S31-S41.

Casdagli, M. C., Iasemidis, L., Savit, R. S., Gilmore, R. L., Roper, S. N., & Sackellares, J. 1997, "Non-linearity in invasive EEG recordings from patients with temporal lobe epilepsy", *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* no. 102, pp. 98-105.

Cavalheiro, E. A. 1995, "The pilocarpine model of epilepsy", *Ital J Neurol Sci* no. 16, pp. 33-37.

Cavalheiro, E. A., Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Turski, W. A., Ikonomidou, C., & Turski, L. 1991, "Long term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures", *Epilepsia* no. 32, pp. 778-782.

Chiu, A. W. L., Kang, E. E., Derchansky, M., Carlen, P. L., & Bardakjian, B. L. 2006, "Online Prediction of Onsets of Seizure-like Events in Hippocampal Neural Networks Using Wavelet Artificial Neural Networks", *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 34, no. 2, pp. 282-294.

Clifford, D. B., Olney, J. W., Mationis, A., Collins, R. C., & Zorumski, C. F. 1987, "The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures", *Neuroscience*, vol. 23, no. 3, pp. 953-968.

Cockerell, O. C. & Sander, J. W. A. S. 1998, "O Custo Econômico da Epilepsia," in *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias: Aspectos Clínicos e Cirúrgicos*, 1 edn, vol. 1 J. C. Dacosta et al., eds., Lemos Editorial, São Paulo, pp. 21-32.

Coppola, R. & Morgan, N. T. 1987, "Multi-channel amplifier system for computerized topographic EEG analysis", *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, vol. 2, no. 67, pp. 191-193.

Costa, J. C. d. 2004, "Carbamazepina. O desenvolvimento a partir dos psicotr3picos," in *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gr3ficos Ltda., S3o Paulo, pp. 89-96.

Cota, V. R. & Moraes, M. F. D. 2006, *Estimula3o el3trica de estruturas do sistema nervoso para tratamento de epilepsias e supress3o de crises epil3pticas, dispositivo, controlador de dispositivo e usos*, CT&IT-UFMG and INPI, (patent).

de Guzman, P., D'antuono, M., & Avoli, M. 2004, "Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal and perirhinal cortices in vitro", *Neuroscience*, vol. 123, no. 4, pp. 875-886.

de Paola, L. & Gates, J. R. 1998, "Eventos n3o Epil3pticos," in *Fundamentos Neurobiol3gicos das Epilepsias: Aspectos Cl3nicos e Cir3rgicos*, 1 edn, J. C. Dacosta et al., eds., Lemos Editorial, S3o Paulo, pp. 445-480.

DeGiorgio, C. M., Shewmon, D. A., & Whitehurst, T. 2003, "Trigeminal nerve stimulation for epilepsy", *Neurology*, vol. 61, no. 3, pp. 421-422.

Dempsey, E. W. & Morison, R. S. 1942, "The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation", *Am J Physiol*, vol. 135, pp. 293-300.

Devereux, J. A. 2002, "Epilepsy and driving licences", *Med.Law*, vol. 21, no. 1, pp. 121-132.

Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Pilato, F., Saturno, E., Dileone, M., Meglio, M., Colicchio, G., Barba, C., Papacci, F., & Tonali, P. A. 2004, "Effects of vagus nerve stimulation on cortical excitability in epileptic patients", *Neurology*, vol. 62, no. 12, pp. 2310-2312.

Dominguez, L. G., Wennberg, R. A., Gaetz, W., Cheyne, D., Snead III, O. C., & Velazquez, J. L. P. 2005, "Enhanced Synchrony in Epileptiform Activity? Local versus Distant Phase Synchronization in Generalized Seizures", *The Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 25, pp. 8077-8084.

Eells, J. B., Clough, R. W., Browning, R. A., & 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*, vol. 123, pp. 279-292.

Engel, J. Jr. 1995, "Concepts of Epilepsy", *Epilepsia*, vol. 36, pp. 23-29.

Fanselow, E. E., Reid, A. P., & Nicolelis, M. A. L. 2000, "Reduction of Pentylenetetrazole-Induced Seizure Activity in Awake Rats by Seizure-Triggered Trigeminal Nerve Stimulation", *Journal of Neuroscience*, vol. 20, no. 21, pp. 8160-8168.

Fisher, R. S. 1989, "Animal models of the Epilepsies", *Biomedical Research Reviews* no. 14, pp. 215-278.

Fisher, R. S., Boas, W. v. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. 2005, "Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)", *Epilepsia*, vol. 46, no. 4, pp. 470-472.

Freeman, J. M., Kossoff, E. H., & Hartman, A. L. 2000, "The ketogenic diet:one decade later", *Pediatrics*, vol. 3, no. 119, pp. 535-543.

Garzon, E., Sakamoto, A. C., Fernandes, R. M. F., & Guerreiro, C. A. M. 1998, "Estado de Mal Epiléptico," in *Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias*, 1 edn, J. C. Dacosta et al., eds., Lemos Editorial, São Paulo, pp. 417-444.

Garzon, E., Jorge, L. C., & Liberalesso, P. B. N. 2004, "Fenitoína. Explorando a estrutura molecular dos barbitúricos," in *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, pp. 77-87.

Gloor, P. 1991, "Mesial temporal sclerosis: historical background and an overview from a modern perspective," in *Epilepsy Surgery*, 1 edn, H. Luders, ed., Raven Press, New York, pp. 689-703.

Guerreiro, C. A. M. & Palmira, A. 2000, "Tratamento medicamentoso das Epilepsias," in *Epilepsia*, 3 edn, C. A. M. Guerreiro et al., eds., Lemos Editorial, São Paulo, pp. 319-337.

Guerreiro, C. A. M. & Mello, L. E. d. M. 2004, "Fenobarbital. A descoberta a partir do efeito hipnótico," in *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, pp. 71-76.

Hamani, C., Ewerton, F. I. S., Bonilha, S. M., Ballester, G., Mello, L. E., & Lozano, A. M. 2004, "Bilateral Anterior Thalamic Nucleus Lesions and High Frequency Stimulation Are Protective Against Pilocarpine-induced Seizures and Status Epilepticus", *Neurosurgery*, vol. 54, pp. 191-197.

Hammond, E. J., Uthman, B. M., Reid, S. A., & Wilder, B. J. 1992, "Electrophysiological studies of cervical vagus nerve stimulation in humans: I. EEG effects", *Epilepsia*, vol. 33, no. 6, pp. 1013-1020.

Hart, D. J., Taylor, P. N., Chappell, P. H., & Wood, D. E. 2006, "A microcontroller system for investigating the catch effect: Functional electrical stimulation of the common peroneal nerve", *Medical Engineering & Physics*, vol. 28, no. 5, pp. 438-448.

Hauser, W. A. & Hesdorffer, D. C. 1990, "Incidence and Prevalence," in *Epilepsy: frequency, causes and consequences*, 1 edn, W. A. Hauser & D. C. Hesdorffer, eds., Demos, New York, pp. 1-51.

Helmholtz, H. 1853, "Über einige gesetze der vertheilung elektrischer ströme in körperlichen leitern, mit anwendunf auf die thierischelektrischen versuche", *Ann.De Phys.U.Chem.*, vol. 29, no. 3, p. 222.

Hirsch, E., Danober, L., Simler, S., Pereira de Vasconcelos, A., Maton, B., Nehlig, A., Marescaux, C., & Vergnes, M. 1997, "The amygdala is critical for seizure propagation from brainstem to forebrain", *Neuroscience*, vol. 77, no. 4, pp. 975-984.

Hoodless, D. J., Macdonald, I. A., Ballal, M. A., & Blecher, A. 1980, "A portable physiological data recording/decoding system", *Journal of Biomedical Engineering*, vol. 3, no. 2, p. 196.

Iasemidis, L. 2003, "Epileptic Seizure Prediction and Control", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 50, no. 5, pp. 549-558.

Iasemidis, L., Pardalos, P., Sackellares, J., & Shiau, D. 2001, "Quadratic binary programming and dynamical system approach to determine the predictability of epileptic seizures", *J Combinatorial Optimization*, vol. 5, pp. 9-26.

IFSENC 1974, "A glossary of terms commonly used by clinical electroencephalographers", *Electroencephalogr and Clin Neurophysiol* no. 37, pp. 538-548.

ILAE 1981, "Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures: from the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy", *Epilepsia*, vol. 22, pp. 489-501.

ILAE 1989, "Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic seizures: Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy", *Epilepsia*, vol. 30, pp. 389-399.

ILAE 1997, "ILAE Commission report. Restrictions for children with epilepsy. Commission of Pediatrics of the ILAE. International League Against Epilepsy", *Epilepsia*, vol. 38, no. 9, pp. 1054-1056.

Imamura, S. i., Tanaka, S., Akaike, K., Tojo, H., Takigawa, M., & Kuratsu, J. i. 2001a, "Hippocampal transection attenuates kainic acid-induced amygdalar seizures in rats", *Brain Research*, vol. 897, no. 1-2, pp. 93-103.

Imamura, S. i., Tanaka, S., Akaike, K., Tojo, H., Takigawa, M., & Kuratsu, J. i. 2001b, "Hippocampal transection attenuates kainic acid-induced amygdalar seizures in rats", *Brain Research*, vol. 897, no. 1-2, pp. 93-103.

Iwamoto, J., Yonezawa, Y., Maki, H., Ogawa, H., Ninomiya, I., Sada, K., Hamada, S., Hahn, A. W., & Caldwell, W. M. 2006, "A mobile phone-based ECG monitoring system", *Biomedical sciences instrumentation* no. 42, pp. 217-222.

Jalilian, E., Onen, D., Neshev, E., & Mintchev, M. P. 2007, "Implantable neural electrical stimulator for external control of gastrointestinal motility", *Medical Engineering & Physics*, vol. 29, no. 2, pp. 238-252.

Janson, N. B., Pavlov, A. N., Neiman, A. B., & Anishchenko, V. S. 1998, "Reconstruction of dynamical and geometrical properties of chaotic attractors from threshold-crossing interspike intervals", *Physical Review E*, vol. 58, no. 1, p. R4.

Jaw, F. S., Liu, S. J., Kuo, T. S., & Wang, C. Y. 1995, "Microcomputer-based pulse stimulator", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 1-2, no. 62, pp. 193-197.

Jaw, F. S., Tsao, H.-W., Yu, H. J., & Yen, C.-T. 1993, "Effect of conduction distance on amplitude and area of compound action potentials of A fiber and C fiber", *Journal of Neuroscience Methods* no. 46, pp. 177-181.

Jones, M. W., French, P. J., Bliss, T. V. P., & Rosenblum, K. 1999, "Molecular Mechanisms of Long-Term Potentiation in the Insular Cortex In Vivo", *J.Neurosci.*, vol. 19, no. 21, p. 36RC.

Jung, K.-Y., Kim, J.-M., & Kim, D. W. 2003, "Nonlinear dynamic characteristics of electroencephalography in a high-dose pilocarpine-induced status epilepticus model", *Epilepsy Research* no. 54, pp. 179-188.

Kantz, H. 1994, "Quantifying the closeness of fractal measures", *Physical Review E*, vol. 49, no. 6, p. 5091.

Katz, A., Marks, D., McCarthy, G., & Spencer, S. S. 1991, "Does interictal spiking change prior to seizures?", *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, vol. 79, pp. 153-156.

Keogh, B. P., Cordes, D., Stanberry, L., Figler, B. D., Robbins, C. A., Tempel, B. L., Green, C. G., Emmi, A., Maravilla, K. M., & Schwartzkroin, P. A. 2005, "BOLD-fMRI of PTZ-induced seizures in rats", *Epilepsy Research*, vol. 66, no. 1-3, pp. 75-90.

Kinoshita, M., Ikeda, A., Matsumoto, R., Begum, T., Usui, K., Yamamoto, J., Matsushashi, M., Takayama, M., Mikuni, N., Takahashi, J., Miyamoto, S., & Shibasaki, H. 2004, "Electric Stimulation on Human Cortex Suppresses Fast Cortical Activity and Epileptic Spikes", *Epilepsia*, vol. 45, no. 7, pp. 787-791.

Knowles, W. D. 1992, "Normal Anatomy and Neurophysiology of the Hippocampal Formation", *Journal of Clinical Neurophysiology*, vol. 9, no. 2, pp. 252-263.

Kralik, J. D., Dimitrov, D. F., Krupa, D. J., Katz, D. B., Cohen, D., & Nicolelis, M. A. L. 2001, "Techniques for Long-Term Multisite Neuronal Ensemble Recordings in Behaving Animals", *Methods*, vol. 25, pp. 121-150.

Krauss, G. L. & Fisher, R. S. 1993, "Cerebellar and thalamic stimulation for epilepsy", *Adv Neurol*, vol. 63, pp. 213-245.

Lange, H. H., Lieb, J., Jr., Engel, J., & Crandall, P. 1983, "Temporal-spatial patterns of pre-ictal spike activity in human temporal lobe epilepsy", *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, vol. 56, pp. 543-555.

Lanmüller, H., Ashley, Z., Unger, E., Sutherland, H., Reichel, M., Russold, M., Jarvis, J., Mayr, W., & Salmons, S. 2005, "Implantable device for long-term electrical stimulation of denervated muscles in rabbits", *Medical and Biological Engineering and Computing*, vol. 43, no. 4, pp. 535-540.

Larsby, B., Hällgren, M., & Arlinger, S. 2000, "A system for recording of auditory evoked responses", *Technology and Health Care*, vol. 8, no. 6, pp. 315-326.

Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., & Cavalheiro, E. A. 1990, "Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy", *Neurosci Biobehav Res* no. 14, pp. 511-517.

Lemos, T. & Cavalheiro, E. A. 1995, "Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats", *Exp Brain Res*, vol. 102, no. 3, pp. 423-428.

Li, D., Zhou, W., Drury, I., & Savit, R. S. 2003, "Non-linear, non-invasive method for seizure anticipation in focal epilepsy", *Mathematical Biosciences*, vol. 186, pp. 63-77.

Litt, B. & Echauz, J. 2002, "Prediction of epileptic seizures", *The Lancet Neurology*, vol. 1, no. 1, pp. 22-30.

Litt, B., Esteller, R., Echauz, J., D'Alessandro, M., Shor, R., Henry, T., Pennell, P., Epstein, C., Bakay, R., Dichter, M., & Vachtsevanos, G. 2001, "Epileptic Seizures May Begin Hours in Advance of Clinical Onset: A Report of Five Patients", *Neuron*, vol. 30, no. 1, pp. 51-64.

Lopes da Silva, F. H. 1993a, "Dynamics of EEGs as Signals of Neuronal Populations: Models and Theoretical Considerations," in *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, 3 edn, E. Niedermeyer & F. H. Lopes da Silva, eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 63-77.

Lopes da Silva, F. H. 1993b, "EEG Analysis: Theory and Practice," in *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, 3

edn, E. Niedermeyer & F. H. Lopes da Silva, eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1097-1124.

Lopes da Silva, F. H. & Van Rotterdam, A. 1993, "Biophysical Aspects of EEG and Magnetoencephalogram Generation," in *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, 3 edn, E. Niedermeyer & F. H. Lopes da Silva, eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 78-91.

Loscher, W. 1997, "Animal models of intractable epilepsy", *Progress in Neurobiology*, vol. 53, no. 2, pp. 239-258.

Loscher, W. 2002, "Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy", *Epilepsy Research*, vol. 50, no. 1-2, pp. 105-123.

Lothman, E. W., Rempe, D. A., & Mangan, P. S. 1995, "Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy", *Journal of Neurophysiology*, vol. 74, no. 2, pp. 841-848.

Lozano, A. M. & Hamani, C. 2004, "The Future of Deep Brain Stimulation", *Journal of Clinical Neurophysiology*, vol. 21, no. 1, pp. 68-69.

Lundgren, J., Ekberg, O., & Olssen, R. 1998, "Aspiration: a potential complication to vagus nerve stimulation", *Epilepsia* no. 39, pp. 998-1000.

MacDonald, R. L. & Barker, J. L. 1977, "Pentylentetrazol and penicillin are selective antagonists of GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurones", *Nature*, vol. 267, no. 5613, pp. 720-721.

Maiwald, T., Winterhalder, M., Aschenbrenner-Scheibe, R., Voss, H. U., Schulze-Bonhage, A., & Timmer, J. 2004, "Comparison of three nonlinear seizure prediction methods by means of the seizure prediction characteristic", *Physica D: Nonlinear Phenomena*, vol. 194, pp. 357-368.

Mangan, P. S., Rempe, D. A., & Lothman, E. W. 1995, "Changes in inhibitory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy", *Journal of Neurophysiology*, vol. 74, no. 2, pp. 829-840.

Marino Jr, R. 1993, "O Tratamento Cirúrgico das Epilepsias," in *Epilepsia*, 1 edn, C. A. M. Guerreiro & M. M. Guerreiro, eds., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, pp. 183-190.

Mavoori, J., Jackson, A., Diorio, C., & Fetzi, E. 2005, "An autonomous implantable computer for neural recording and stimulation in unrestrained primates", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 148, no. 1, pp. 71-77.

McCarthy, G., Spencer, D. D., & Riker, R. J. 1992, "The stereotaxic placement of depth electrodes," in *Epilepsy Surgery*, H. O. Lüders, ed., Raven Press, New York, pp. 385-393.

McCormick, D. A. & Contreras, D. 2001, "On The Cellular and Network Bases of Epileptic Seizures", *Annu Rev Physiol* no. 63, pp. 815-846.

McNamara, J. O. 1994, "Cellular and Molecular Basis of Epilepsy", *The Journal of Neuroscience*, vol. 14, no. 6, pp. 3413-3425.

Mello, L. E., Cavalheiro, E. A., & Tan, A. M. 1993, "Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting", *Epilepsia* no. 34, pp. 985-995.

Mello, L. E., Cavalheiro, E. A., Tan, A. M., Pretorius, J. K., Babb, T. L., & Finch, D. M. 1992, "Granule cell dispersion in relation to mossy fiber sprouting, hippocampal cell loss, silent period and seizure frequency in the pilocarpine model of epilepsy", *Epilepsy Research* no. 9, pp. 51-59.

Mirski, M. A., Rossell, L. A., Terry, J. B., & Fisher, R. S. 1997, "Anticonvulsant effect of anterior thalamic high frequency electrical stimulation in the rat", *Epilepsy Research*, vol. 28, no. 2, pp. 89-100.

Mohapel, P., Armitage, L. L., Hannesson, D. K., & Corcoran, M. E. 1997, "The effects of fimbria/fornix transections on perforant path kindling and mossy fiber sprouting", *Brain Research*, vol. 778, pp. 186-193.

Moraes, M. F. D., Chavali, M., Mishra, P. K., Jobe, P. C., & Garcia-Cairasco, N. 2005a, "A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures of GEPR-9s", *Brain Research*, vol. 1033, no. 1, pp. 1-12.

Moraes, M. F. D., Galvis-Alonso, O. Y., & Garcia-Cairasco, N. 2000, "Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures", *Epilepsy Research*, vol. 39, no. 3, pp. 251-259.

Moraes, M. F. D., Mishra, P. K., Jobe, P. C., & Garcia-Cairasco, N. 2005b, "An electrographic analysis of the synchronous discharge patterns of GEPR-9s generalized seizures", *Brain Research*, vol. 1046, no. 1-2, pp. 1-9.

Mormann, F., Andrzejak, R. G., Elger, C. E., & Lehnertz, K. 2007, "Seizure prediction: the long and winding road", *Brain* no. 130, pp. 314-333.

Murray, J. 1993, "Coping with the uncertainty of uncontrolled epilepsy", *Seizure*, vol. 3, no. 2, pp. 167-178.

Nadler, J. V., Perry, B. W., & Cotman, C. W. 1980, "Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid", *Brain Research*, vol. 182, pp. 1-9.

Neto, E. P. & Cendes, F. 2000, "Tratamento cirúrgico," in *Epilepsia*, 3 edn, C. A. M. Guerreiro et al., eds., Lemos Editorial, São Paulo, pp. 379-393.

Nicolelis, M., Stambaugh, C. R., Brisben, A. J., & Laubach, M. 1999, "Methods for simultaneous multisite neural ensemble recordings in behaving primates," in *Methods for neural ensemble recordings*, M. A. L. Nicolelis, ed., CRC Press, New York, pp. 121-156.

Nicolelis, M. A. 2001, "Actions from thoughts", *Nature*, vol. 409 Suppl, pp. 403-7.

Nicolelis, MA. 2003, "Brain-machine interfaces to restore motor function and probe neural circuits.", *Nat Rev Neurosci.*, vol. 4, no. 5, pp. 417-422.

Niedermeyer, E. 1993, "Depth Electroencephalography," in *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Application, and Related Fields*, 3 edn, E. Niedermeyer & F. H. Lopes da Silva, eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 661-678.

Niedermeyer, E. 1998, "Abnormal EEG Patterns: Epileptic and Paroxysmal," in *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Application, and Related Fields*, 3

edn, E. Niedermeyer & F. H. Lopes da Silva, eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 217-240.

Novak, V., Reeves, L., Novak, P., Low, A., & Sharbrough, W. 1999, "Time frequency mapping of R-R interval during complex partial seizures of temporal lobe origin", *Journal of Autonomus Nervous System* no. 77, pp. 195-202.

Osorio, I., Frei, M. G., & Wilkinson, S. B. 1998, "Real-Time Automated Detection and Quantitative Analysis of Seizures and Short-Term Prediction of Clinical Onset", *Epilepsia*, vol. 6, no. 39, pp. 615-627.

Papoulis, A. 1962, *The Fouries Integral and Its Application* McGraw-Hill, New York.

Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., & Lowenstein, D. H. 1997, "Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus", *Journal of Neuroscience* no. 17, pp. 3727-3738.

Paxinos, G. & Watson, C. 1998, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 1 edn, Academic Press, San Diego.

Perelman, Y. & Ginosar, R. 2006, "Analog frontend for multichannel neuronal recording system with spike and LFP separation", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 153, no. 1, pp. 21-26.

Persinger, M. A., Makarec, K., & Bradley, J.-C. 1988, "Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine", *Physiology & Behavior*, vol. 44, no. 1, pp. 27-37.

Pikovsky, A. S., Rosenblum, M. G., Osipov, G. V., & Kurths, J. 1997, "Phase synchronization of chaotic oscillators by external driving", *Physica D: Nonlinear Phenomena*, vol. 104, no. 3-4, pp. 219-238.

Pinto, D. J., Patrick, S. L., Huang, W. C., & Connors, B. W. 2005, "Initiation, Propagation, and Termination of Epileptiform Activity in Rodent Neocortex *In Vitro* Involve Distinct Mechanisms", *The Journal of Neuroscience*, vol. 36, no. 25, pp. 8131-8140.

Prado, V. F., Martins-Silva, C., de Castro, B. M., Lima, R. F., Barros, D. M., Amaral, E., Ramsey, A. J., Sotnikova, T. D., Ramirez, M. R., Kim, H. G., Rossato, J. I., Koenen, J., Quan, H., Cota, V. R., Moraes, M. F. D., Gomez, M. V., Guatimosim, C., Wetsel, W. C., Kushmerick, C., Pereira, G. S., Gainetdinov, R. R., Izquierdo, I., Caron, M. G., & Prado, M. A. M. 2006, "Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition", *Neuron*, vol. 51, no. 5, pp. 601-612.

Racine, R. J. 1972a, "Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure", *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, vol. 32, no. 3, pp. 281-94.

Racine, R. 1972b, "Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold", *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, vol. 32, no. 3, pp. 269-279.

Rajna, P., Clemens, B., & Csibri, E. 1997, "Hungarian multicentre epidemiologic study of the warning and initial symptoms (prodrome, aura) of epileptic seizures", *Seizure* no. 6, pp. 361-368.

Rempe, D. A., Mangan, P. S., & Lothman, E. W. 1995, "Regional heterogeneity of pathophysiological alterations in CA1 and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy", *Journal of Neurophysiology*, vol. 74, no. 2, pp. 816-828.

Rieger, R., Schuettler, M., Pal, D., Clarke, C., Langlois, P., Taylor, J., & Donaldson, N. 2006, "Very low-noise ENG amplifier system using CMOS technology", *IEEE Transactions on neural systems and rehabilitation engineering*, vol. 4, no. 14, pp. 427-437.

Sakamoto, A. C. & Garzon, E. 2000, "EEG nas Epilepsias e síndromes epilépticas," in *Epilepsia*, 3 edn, C. A. M. Guerreiro et al., eds., Lemos Editorial, São Paulo, pp. 81-104.

Sanabria, E. R. G. 1999, *Caracterização eletrofisiológica da epileptogênese crônica em modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina*, UNIFESP-EPM, São Paulo.

Sanabria, E. R. G. & Cavalheiro, E. A. 2000, "Epileptogênese: contribuição dos modelos experimentais," in *Epilepsia*, 3 edn, C. A. M. Guerreiro et al., eds., Lemos Editorial, São Paulo, pp. 29-58.

Sauer, T. 1994, "Reconstruction of dynamical systems from interspike intervals", *Physical Review Letters*, vol. 72, no. 24, p. 3811.

Savit, R. S., Li, S., Zhou, W., & Drury, I. 2001, "Understanding Dynamic State Changes in Temporal Lobe Epilepsy", *Journal of Clinical Neurophysiology*, vol. 3, no. 18, pp. 246-258.

Sia, J., Macneil, D. A., & Sigg, E. B. 1971, "A miniature three-channel preamplifier for unit recording in freely moving animals", *Physiology & Behavior*, vol. 7, no. 1, pp. 121-122.

Sloviter, R. S. 1991, "Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability *in vivo*", *Hippocampus*, vol. 1, pp. 31-40.

Speckmann, E.-J. & Elger, C. E. 1993, "Introduction to the Neurophysiological Basis of the EEG and DC Potentials," in *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related fields*, 3 edn, E. Niedermeyer & F. H. Lopes da Silva, eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 15-26.

Steriade, M. 1974, "Interneuronal epileptic discharges related to spike-and-wave cortical seizures in behaving monkeys", *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology* no. 37, pp. 247-263.

Steriade, M. 1990, "Spindling, incremental thalamocortical responses, and spike-wave epilepsy," in *Generalized Epilepsy*, 1 edn, M. Avoli et al., eds., Birkhäuser, Boston, pp. 161-180.

Steriade, M. 1993, "Cellular Substrates of Brain Rhythms," in *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Application, and Related Fields*, 3 edn, E. Niedermeyer & F. H. Lopes da Silva, eds., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 27-62.

Steriade, M. & Deschênes, M. 1984, "The thalamus as neuronal oscillator", *Brain Research Reviews* no. 8, pp. 1-63.

Takens, F. 1981, "Detecting strange attractors in turbulence," in *Lecture Notes in Mathematics*, D. A. Rand & L. S. Young, eds., Springer Verlag, Berlin, pp. 366-381.

Tehovnik, E. J. 1996, "Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 65, no. 1, pp. 1-17.

Theodore, W. H. & Fisher, R. S. 2004, "Brain stimulation for epilepsy", *The Lancet Neurology*, vol. 3, no. 2, pp. 111-118.

Tolner, E. A., Kloosterman, F., van Vliet, E. A., Lopes da Silva, F. H., & Gorter, J. A. 2005, "Presubiculum Stimulation *In Vivo* Evokes Distinct Oscillations in Superficial and Deep Entorhinal Cortex Layers in Chronic Epileptic Rats", *The Journal of Neuroscience*, vol. 38, no. 25, pp. 8755-8765.

Turski, L., Cavalheiro, E. A., Czuczwar, S. J., Turski, W. A., & Kleinrok, Z. 1987, "The seizures induced by pilocarpine: behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents", *Pol J Pharmacol Pharm* no. 39, pp. 545-555.

Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwartz, M., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z., & Turski, L. 1983, "Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study", *Behavioural Brain Research* no. 9, pp. 315-335.

Valencia, I., Holder, D. L., Helmers, S. L., Madsen, J. R., & Riviello, J. 2001, "Vagus nerve stimulation in pediatric epilepsy: a review", *Pediatric Neurology*, vol. 25, no. 5, pp. 368-376.

Valentin, A., Alarcon, G., Garcia-Seoane, J. J., Lacruz, M. E., Nayak, S. D., Honavar, M., Selway, R. P., Binnie, C. D., & Polkey, C. E. 2005a, "Single-pulse electrical

stimulation identifies epileptogenic frontal cortex in the human brain", *Neurology*, vol. 65, no. 3, pp. 426-435.

Valentin, A., Anderson, M., Alarcon, G., Seoane, J. J. G., Selway, R., Binnie, C. D., & Polkey, C. E. 2002, "Responses to single pulse electrical stimulation identify epileptogenesis in the human brain in vivo", *Brain*, vol. 125, no. 8, pp. 1709-1718.

Valentin, A., Alarcon, G., Honavar, M., Garcia Seoane, J. J., Selway, R. P., Polkey, C. E., & Binnie, C. D. 2005b, "Single pulse electrical stimulation for identification of structural abnormalities and prediction of seizure outcome after epilepsy surgery: a prospective study", *The Lancet Neurology*, vol. 4, no. 11, pp. 718-726.

van der Heyden, M. J., Velis, D. N., Hoekstra, B. P. T., Pijn, J. P. M., Boas, W. E., van Veelen, C. W. M., van Rijen, P. C., Lopes da Silva, F. H., & DeGoede, J. 1999, "Non-linear analysis of intracranial human EEG in temporal lobe epilepsy", *Clinical Neurophysiology*, vol. 110, pp. 1726-1740.

Van Quyen, M. L., Martinerie, J., Baulac, M., & Varela, F. 1999, "Anticipating epileptic seizures in real time by a non-linear analysis of similarity between EEG recordings", *Neuroreport*, vol. 10, no. 10, pp. 2149-2155.

Van Quyen, M. L. 2005, "Anticipating epileptic seizures: from mathematics to clinical applications", *Comptes Rendus Biologies* no. 328, pp. 187-198.

Van Quyen, M. L., Navarro, V., Martinerie, J., Baulac, M., & Varela, F. J. 2003, "Toward a Neurodynamical Understanding of Ictogenesis", *Epilepsia*, vol. 44, no. s12, pp. 30-43.

Van Quyen, M., Martinerie, J., Navarro, V., Baulac, M., & Varela, F. J. 2001a, "Characterizing Neurodynamic Changes Before Seizures. [Review]", *Journal of Clinical Neurophysiology*, vol. 18, no. 3, pp. 191-208.

Van Quyen, M., Martinerie, J., Navarro, V., Boon, P., D'Have, M., Adam, C., Renault, B., Varela, F., & Baulac, M. 2001b, "Anticipation of epileptic seizures from standard EEG recordings", *The Lancet*, vol. 357, no. 9251, pp. 183-188.

Velisek, L., Kubova, H., Pohl, M., Stankova, L., Mares, P., & Schikerova, R. 1992, "Pentylenetetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, vol. 346, pp. 588-591.

Vonck, K., Boon, P., Goossens, L., Dedeurwaerdere, S., Claeys, P., Gossiaux, F., Van Hese, P., De Smedt, T., Raedt, R., Achten, E., Deblaere, K., Thieleman, A., Vandemaele, P., Thiery, E., Vingerhoets, G., Miatton, M., Caemaert, J., Van Roost, D., Baert, E., Michielsen, G., Dewaele, F., Van Laere, K., Thadani, V., Robertson, D., & Williamson, P. 2003, "Neurostimulation for refractory epilepsy", *Acta Neurol Belg.*, vol. 103, no. 4, pp. 213-217.

Vonck, K., Van Laere, K., Dedeurwaerdere, S., Caemaert, J., De Reuck, J., & Boon, P. 2001, "The Mechanism of Action of Vagus Nerve Stimulation for Refractory Epilepsy: The Current Status. [Review]", *Journal of Clinical Neurophysiology*, vol. 18, no. 5, pp. 394-401.

Vouimba, R. M. & Richter-Levin, G. 2005, "Physiological Dissociation in Hippocampal Subregions in Response to Amygdala Stimulation", *Cerebral Cortex*, vol. 15, no. 11, pp. 1815-1821.

Weinand, M., Carter, L., el-Saadany, W., Sioutos, P., Labiner, D., & Oommen, K. 1997, "Cerebral blood flow and temporal lobe epileptogenicity", *Journal of Neurosurgery* no. 86, pp. 226-232.

Weinstein S. 2001, "The anticonvulsant effect of electrical fields", *Curr Neurol Neurosci Rep*, vol. 1, no. 2, pp. 155-161.

Weisstein, E. W. Discrete Fourier Transform. MathWorld - A Wolfram Web Resource . 2003.

Weisstein, E. W. Capacity Dimension. MathWorld - A Wolfram Web Resource . 2004a.

Weisstein, E. W. Fast Fourier Transform. MathWorld - A Wolfram Web Resource . 2004b.

Weisstein, E. W. Fourier Transform. MathWorld - A Wolfram Web Resource . 2004c.

Westmoreland, B. 1990, "Benign EEG variants and patterns of uncertain clinical significance," in *Current Practice of Clinical electroencephalography*, 2 edn, D. D. Daly & T. A. Pedely, eds., Raven Press, New York.

Wiebe, S. & Blume, W. T. G. J. P. 2001, "A randomized controlled trial of surgery for temporal lobe epilepsy", *New England Journal of Medicine* no. 345, pp. 311-318.

Winter, K. F., Hartmann, R., & Klinke, R. 1998, "A stimulator with wireless power and signal transmission for implantation in animal experiments and other applications", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 79, no. 1, pp. 79-85.

Woodbury JW & Woodbury DM 1991, "Vagal stimulation reduces the severity of maximal electroshock seizures in intact rats: use of a cuff electrode for stimulating and recording", *Pacing Clin Electrophysiol*, vol. 14, no. 1, pp. 94-107.

Xu, S., Talwar, S. K., Hawley, E. S., Li, L., & Chapin, J. K. 2004, "A multi-channel telemetry system for brain microstimulation in freely roaming animals", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 133, no. 1-2, pp. 57-63.

Yacubian, E. M. T. 2005, "Valproato. O amplo espectro de um solvente," in *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, pp. 97-113.

Zweizig, J. R., Kado, R. T., Hanley, J., & Adey, W. R. 1967, "The design and use of an FM-AM radiotelemetry system for multichannel recording of biological data", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 4, no. 14, pp. 230-238.

Zwillinger, D. 1995, *CRC Standard Mathematical Tables and Formulae*, 31 edn, CRC Press, Boca Raton, FL.