

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 894

**CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS ICTOGÊNICOS PERANTE EXTRAÇÃO DE
PARÂMETROS ELETROGRÁFICOS**

Vinícius Rezende Carvalho

DATA DA DEFESA: 28/10/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Caracterização de Sistemas Ictogênicos Perante Extração
de Parâmetros Eletrográficos

Vinícius Rezende Carvalho

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

Área de Concentração: Sinais e Sistemas

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Belo Horizonte

Outubro de 2015

- C331c Carvalho, Vinícius Rezende.
Caracterização de sistemas ictogênicos perante extração de parâmetros eletrográficos [manuscrito] / Vinícius Rezende Carvalho . - 2015.
xv, 110 f., enc.: il.
- Orientador: Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes.
Coorientador: Márcio Flávio Dutra Moraes.
- Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.
- Anexos: f.82-110.
- Bibliografia: f. 145-150.
1. Engenharia elétrica - Teses. 2. Processamento de sinais - Teses. 3. Epilepsia - Teses. I. Mendes, Eduardo Mazoni Andrade Marçal. II. Moraes, Márcio Flávio Dutra. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. VI. Título.
- CDU: 621.3(043)

**"Caracterização de Sistemas Ictogênicos Perante Extração de
Parâmetros Eletrográficos"**

Vinicius Rezende Carvalho

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

Aprovada em 28 de outubro de 2015.

Por:



Prof. Dr. Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes
DELT (UFMG) - Orientador



Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes
Departamento de Fisiologia e Biofísica (UFMG)



Prof. Dr. Vinicius Rosa Cota
Departamento de Engenharia Elétrica (UFSJ)



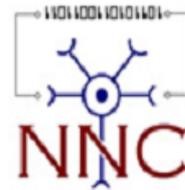
Prof. Dr. Danilo Barbosa Melges
DEE (UFMG)



Prof. Dr. Daniel de Castro Medeiros
PPGEE (UFMG)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA**



**Caracterização de Sistemas Ictogênicos Perante
Extração de Parâmetros Eletrográficos**

Vinícius Rezende Carvalho

Belo Horizonte

2015

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha base e fundação, que tornou tudo isto possível. Ao meu pai, pelos conselhos e apoio em todos os momentos. À minha mãe, pelo carinho incondicional. Felipe, Aline e Davi, por encher a casa de novas alegrias.

Ao Dudu, eterno irmão e inspiração por toda minha vida.

À Aninha, amor que começou com o início deste trabalho e já é parte constante de minha vida.

Ao Prof. Mazoni, pela orientação e apoio há mais de três anos. Ao Prof. Márcio, mestre e referência, por ensinar o significado e a importância de se fazer ciência.

Aos colegas do laboratório, Prof. Dr. Flávio Mourão (grande pesquisador e patrimônio do NNC), Simões, Hyo, Daniel, Henrique, Levíticus, Pedrão e demais alunos e professores do NNC.

Aos amigos, pelos momentos de descontração entre os trabalhos; Colegas da pelada ameríndia, da Olaria do Arrocha, colegas de curso e do Paçoca F.C.

À UFMG e Escola de Engenharia, pelo privilégio do aprendizado.

Às agências de fomento à pesquisa; CNPq, Capes e Fapemig.

*“Look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see,
and wonder about what makes the universe exist. Be curious.”*
Stephen Hawking

RESUMO

Este trabalho envolve a extração de características relacionadas à excitabilidade e sincronismo em registros eletrográficos, para a avaliação de hipóteses a respeito do processamento auditivo em ratos da linhagem WAR, um modelo animal de Crises Audiogênicas. Estas são avaliadas em registros do Colículo Inferior, obtidos em protocolos de experimentos baseados na sondagem acústica, onde tons modulados em amplitude são apresentados, evocando respostas auditivas em regime permanente (ASSR). Respostas evocadas deste tipo podem ser consideradas como assinaturas eletrográficas do processamento auditivo ao longo do tempo de cada animal, realçando atributos relativos à magnitude e sincronismo da resposta com o estímulo. O primeiro protocolo utiliza sons com intensidade 85 dB, insuficiente para desencadear Crises Audiogênicas nos animais, modulados em amplitude em 53,71 Hz ou 92,77 Hz, em *trials* intercalados. Este protocolo é utilizado para abordar a hipótese de que o processamento auditivo de WARs é hiperexcitável em relação a animais saudáveis, sendo necessária a aplicação de estímulos auditivos para ressaltar a diferença. A maior amplitude da resposta confirmou o processamento auditivo anormal de WARs, indicando a hiperexcitabilidade do Colículo Inferior destes animais. Porém, a atividade basal também é diferenciada entre os grupos, com animais ictogênicos apresentando maior energia nas bandas de alta frequência (Gamma e Beta), além de episódios semelhantes a fusos de alta amplitude. A segunda hipótese proposta, que circuitos neurais de WARs possuem tendência a sincronizar mais facilmente com estímulos externos, foi confirmada pelo maior índice de acoplamento de fase (PLV) entre estímulo e resposta destes animais. Com os atributos de energia e PLV utilizados nas abordagens das duas primeiras hipóteses, foram testados classificadores para identificação de registros provenientes de animais WAR. A amplitude da resposta evocada possui o maior poder preditivo, sobretudo quando a moduladora de 53,71 Hz é utilizada (96% de exatidão), em comparação com a de 92,77 Hz (80% de exatidão). O uso de mais atributos (como energia de outras bandas e PLV) possibilita a melhora no desempenho no segundo caso, aumentando de 80% para 87%. Isto indica a possibilidade de usar atributos de um protocolo de sondagem como biomarcadores, com aplicações em ferramentas diagnósticas. A dinâmica dos mesmos atributos ao longo de crises é analisada em um segundo protocolo, de modo a confirmar ou refutar a hipótese que o processamento auditivo de WARs é prejudicado durante e após uma crise audiogênica. As características são extraídas de registros do novo protocolo, onde uma estimulação sonora de maior intensidade (110 dB) induz crises tônico-clônicas em animais WAR. Foi mostrado que, apesar de alterações transitórias durante a crise, a energia da resposta evocada não é alterada significativamente entre os períodos pré-ictal, ictal e pós-ictal. Isto contrasta com as energias em outras bandas de frequência, que aumentam consideravelmente durante a crise, devido ao recrutamento pelo foco ictal, mas diminuem no pós-ictal, onde circuitos recrutados pela crise estão em período hipoexcitável. O sincronismo da resposta com o estímulo, quantificado pelo índice PLV, confirma parte desta conclusão. Antes da crise, o PLV está abaixo dos valores normais encontrados em WARs, possivelmente devido a interações entre os circuitos responsáveis pela resposta e circuitos. Assim, apesar da amplitude da resposta não ser alterada antes da crise, a capacidade de acompanhar o estímulo é ligeiramente prejudicada. Durante a crise há somente alterações transitórias do PLV, sobretudo próximo ao final. No período pós-

ictal, grande parte das oscilações endógenas do sistema está em período hipoexcitável, mas este ainda é responsivo a estímulos sonoros externos, evidenciado pela persistência e sincronismo da ASSR. Estes resultados refutam a hipótese proposta, pois apesar de alterações transitórias, a capacidade de processamento auditivo não é significativamente comprometida durante e após a crise audiogênica. Isto sugere que circuitos que fazem parte do processamento auditivo, apesar de estarem envolvidos no processo que leva a uma crise audiogênica, podem não fazer parte efetivamente da via ictogênica, pois continuam responsivos durante e após a crise.

ABSTRACT

This work deals with the extraction of features related to excitability and synchronism in electrographic signals, for evaluating hypotheses about auditory processing in WAR animals, an animal model for audiogenic seizures. These hypotheses are evaluated in Local Field Potential (LFP) signals from the Inferior Colliculus, obtained through experiment protocols based on the acoustic probing of the brain. Amplitude Modulated tones are presented to evoke Auditory Steady State Responses (ASSR). These can be considered as electrographic signatures of the auditory processing over time of each animal, highlighting features related to response magnitude and synchronism. The first protocol employs tones with intensity of 85 dB, enough to evoke the ASSR, but without triggering audiogenic seizures, modulated in amplitude at 53.71 Hz or 92.77 Hz, in interleaved trials. The first hypothesis states that the auditory processing in WARs is distinct from physiologic animals. The application of auditory stimuli would be needed to elicit responses which would make this difference visible. The larger amplitude response in WARs confirmed the hypothesis, indicating the hyperexcitability of the Inferior Colliculus of these animals. However, basal activity is also different between the groups, with ictogenic animals having greater energy in high frequency bands (gamma and beta), besides the occurrence of episodes resembling High Amplitude Spindles. The second hypothesis proposed that neural circuits in WARs have a tendency to synchronize more easily with external stimuli. This was confirmed by the higher phase coupling index (PLV) between stimulus and response of these animals. A diagnostic tool is then proposed, on which these features extracted from the probing protocol are used as inputs to classifiers that identify animals prone to audiogenic seizures. The ASSR was found to have the greatest predictive power, achieving accuracy of 96% with a modulating frequency of 53 Hz. The use of other features such as energies of endogenous EEG rhythms enables the improvement of performance, when a modulating frequency of 92 Hz is used. This indicates the possibility of using features from a probing protocol as diagnostic biomarkers. The second protocol involves the presentation of high intensity (110dB) AM tones in order to elicit audiogenic seizures in WARs only. The dynamic of the features presented earlier is analyzed in the pre-ictal, ictal and post-ictal periods, with the purpose of evaluating the hypothesis that the auditory processing in WARs is impaired during and after a seizure. It was shown that, although transitory changes happen during the seizure, the energy of the evoked response is not significantly changed across these three periods. This contrasts with the energies in other frequency bands, which significantly increase during the seizure due to recruitment by the ictal focus, followed by a refractory period with decreased activity after the seizure. The synchrony of the response with the stimulus, measured by the PLV index, confirms part of this conclusion. Before the seizure, the PLV is below the normal range found in WARs, possibly due to interactions of the response circuits with ictogenic ones. Thus, despite the magnitude of the response not being changed before the seizure, the ability to follow the stimulus is slightly impaired. During the seizure, there are only transient changes of the PLV, especially near its end. In the post-ictal period, most of the endogenous oscillations are in refractory period, but the system is still responsive to external sound stimuli, as evidenced by the persistence and synchrony of the ASSR. Thus, the dynamics of the ASSR suggest that the circuitry of the auditory

pathway, despite being involved in the processes leading to audiogenic seizures, may not effectively be part of the ictogenic focus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama representando as etapas de treinamento e teste de um classificador	10
Figura 2: Diagrama mostrando a sondagem de um sistema e subsequente extração de informações para análise ou classificação.	12
Figura 3: Exemplos de acoplamento entre X e Y.	18
Figura 4: Representação do Protocolo de Estimulação sublimiar de 85 dB.	24
Figura 5: Exemplo de um sinal (CI do WAR02) e seu respectivo espectrograma	28
Figura 6: Sinal AM $s(t)$ e respectiva Transformada de Hilbert, sHt	31
Figura 7: Representação do sinal AM $s(t)$ e respectivas séries de amplitude At e fase ϕt instantâneas.....	31
Figura 8: Fase Relativa de dois sinais.....	33
Figura 9: Exemplo simples mostrando a maximização da margem entre separador e vetores de suporte	37
Figura 10: Exemplos de HVS no sinal.....	39
Figura 11: Espectrograma e ASSR de dois registros.	41
Figura 12: Potências ASSR normalizadas pelo basal, grupos WAR x Wistar.	42
Figura 13: Potências ao redor da moduladora	42
Figura 14: Potências dos ritmos <i>Delta</i> , <i>Theta</i> , <i>Alpha</i> , <i>Beta</i> e <i>Gamma</i> , em trechos sem som	43
Figura 15: Potências normalizadas pelos respectivos níveis basais, das bandas <i>Delta</i> , <i>Theta</i> , <i>Alpha</i> , <i>Beta</i> e <i>Gamma</i> , durante trechos com som (<i>trials</i>)	45
Figura 16: Registros e seus respectivos valores de PLV ao longo do tempo.....	46
Figura 17: PLV, protocolo de 85 dB.	47
Figura 18: Registro CI do WAR 01, protocolo 110 dB, e o respectivo espectrograma... 55	
Figura 19: Potência da ASSR, normalizada pelo respectivo basal, de animais WAR ao longo dos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal.....	56
Figura 20: Potência da ASSR, normalizada pelo respectivo basal, de animais WAR e Wistar ao longo dos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal	56
Figura 21: Potências normalizadas de WARs, nos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal	58

Figura 22: Potências normalizadas das cinco bandas, comparando cada trecho de animais WARs (pré-ictal, ictal e pós-ictal) com os respectivos períodos em animais Wistar	59
Figura 23: Índices PLV de animais WAR, ao longo dos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal	61
Figura 24: Índices de PLV de animais WAR e Wistar, ao longo dos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal	61
Figura 25: Dinâmica de uma Crise Audiogênica em um WAR.....	64
Figura 26: Dinâmica do <i>trial</i> do protocolo de 110 dB, em um Wistar.	65
Figura 27: Variância intra-trial da ASSR, nos trials de 53 Hz e 92 Hz do protocolo de 85 dB.....	85
Figura 28: Variância intra-trial da ASSR, protocolo de 110 dB.....	86
Figura 29: Atributos de $A'ASSRt$	88
Figura 30: Centroide espectral de $A'ASSRt$, protocolo de 110 dB.	89
Figura 31: Potência de $A'ASSRt$, no protocolo de 110 dB.....	89
Figura 32: Filtragem de sinais para índice PAC.....	93
Figura 33: Acoplamento fase-amplitude.	94
Figura 34: Registro e MI ao longo do tempo. Acima,	95
Figura 35: Exemplo de segmentação do Espectro de um EEG normal	102
Figura 36: Sinais de EEG e respectivos espectros de frequência	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados de Classificação	49
Tabela 2: Melhores índices de desempenho de cada método	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AM	<i>Amplitude Modulated</i> – Modulado em Amplitude
ASSR	<i>Auditory Steady-State Response</i> - Resposta Auditiva em Regime Permanente
CA	Crise Audiogênica
CFC	<i>Cross-Frequency Coupling</i> – Acoplamento cruzado de frequências
CI	Colículo Inferior
EEG	Eletroencefalograma
EMD	<i>Empirical Mode Decomposition</i> – Decomposição Empírica de Modos
EWT	<i>Empirical Wavelet Transform</i> – Transformada de Wavelet Empírica
f_c	Frequência portadora
f_m	Frequência moduladora
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i> – Transformada Rápida de Fourier
FM	<i>Frequency Modulated</i> – Modulado em Frequência
HVS	<i>High Voltage Spindles</i> – Fusos de Alta Amplitude
IS	Índice de Severidade
LFP	<i>Local Field Potential</i> – Potencial de Campo Local
PAC	<i>Phase-Amplitude Coupling</i> – Acoplamento fase-amplitude
PDS	<i>Paroxysmal Depolarization Shift</i> – Desvio Paroxísmico de Despolarização
PLV	<i>Phase Locking Value</i>
PSD	<i>Power Spectral Density</i> – Densidade de Potência Espectral
STFT	<i>Short Time Fourier Transform</i> - Transformada de Fourier de Tempo Curto
WAR	Wistar Audiogenic Rat
WIS	Wistar

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
1. Introdução	1
1.1. Epilepsia e Crises Epilépticas	1
1.2. Diagnóstico	2
1.3. Ictogênese e Epileptogênese	4
1.4. Sincronismo e Excitabilidade	6
1.5. Extração de Características de Sinais de EEG e Reconhecimento de Padrões ..	8
1.6. Sondagem de um Sistema Neural.....	11
1.7. Tipo de estímulo	13
1.8. Modelo animal.....	15
1.9. Região de interesse e LFP	15
1.10. Análise dos Sinais	17
1.11. Objetivos e Hipóteses.....	19
1.12. Estrutura do Texto.....	20
2. Protocolo de Sondagem por Estimulação Sonora Sublimiar.....	21
2.1. Introdução.....	21
2.2. Protocolo de Estimulação	22
2.2.1. Animais.....	23
2.2.2. Cirurgia	23
2.2.3. Estimulação Acústica.....	24

2.3.	Extração de Características e Classificação.....	26
2.3.1.	Potência das bandas e ASSR.....	27
2.3.1.1.	Potência Espectral por STFT	27
2.3.2.	Transformada de Hilbert	30
2.3.3.	Phase Locking Value	32
2.4.	Avaliando a Hipótese I	34
2.5.	Avaliando a Hipótese II	35
2.6.	Avaliando a Hipótese III	36
2.6.1.	Classificadores	36
2.7.	Descarte de Segmentos	38
2.8.	Resultados e Discussão	40
2.8.1.	Hipótese I - Resultados.....	40
2.8.2.	Hipótese II: Sincronismo de fase	45
2.9.	Hipótese III - Classificação.....	48
2.10.	Conclusão do Capítulo.....	52
3.	Processamento Auditivo ao Longo de Crises Audiogênicas	53
3.1.	Protocolo de estimulação a 110 dB	53
3.2.	Hipótese IV – dinâmica ictal.....	53
3.3.	Resultados e Discussão	55
3.4.	Conclusão do Capítulo	66
4.	Conclusão.....	68
4.1.	Trabalhos Futuros	69
5.	Referências	71
6.	Anexos	82
6.1.	CERTIFICADO CEUA	83
6.2.	DINÂMICA DA ASSR	84

6.2.1.	Variância intra-trial <i>AASSR(t)</i>	84
6.2.1.1.	Resultados	85
6.2.2.	Características do envelope da ASSR: Centroide espectral e energia de <i>A'ASSRt</i>	86
6.2.2.1.	Resultados	88
6.3.	MODULAÇÃO FASE-AMPLITUDE	90
6.3.1.1.	Modulation Index – MI	92
6.3.2.	Resultados PAC	95
6.4.	CLASSIFICAÇÃO DE SINAIS DE EEG POR DECOMPOSIÇÃO DE MODOS	98
6.4.1.	Introdução	98
6.4.2.	Empirical Mode Decomposition - EMD	99
6.4.3.	Empirical Wavelet Transform	101
6.4.4.	Base de Dados utilizada	103
6.4.5.	Extração de Características	104
6.4.6.	Seleção de Características e Classificação	106
6.4.7.	Resultados e Discussão	107
6.4.8.	Conclusão	109

1. Introdução

1.1. Epilepsia e Crises Epilépticas

Epilepsia é uma desordem neurológica que afeta cerca de 50 milhões de pessoas ao redor do mundo, 80% das quais vivem em países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Esta desordem é caracterizada por uma ou mais das seguintes condições; (1) ocorrência de ao menos duas crises espontâneas, separadas entre si por no mínimo 24 horas, (2) uma crise espontânea com alto risco de recorrência, ou (3) diagnóstico de uma síndrome epiléptica (FISHER et al., 2014).

Um dos fatores que contribui para sua alta incidência é o grande número de causas que levam a essa condição, tais como: fatores genéticos, falhas no desenvolvimento, convulsões febris, traumas e infecções no sistema nervoso, isquemia, tumores, entre outros. Apesar de ocorrer em todas as faixas etárias, crianças e idosos possuem as maiores taxas de incidência (IASSEMIDIS, 2003).

Crises são caracterizadas pela atividade anormal, em geral rítmica e de alta intensidade, de grupos de neurônios do cérebro, cuja dinâmica é comumente interpretada como excesso de excitabilidade e sincronismo neural (MORAES, 1998; JIRUSKA et al., 2013).

Crises epilépticas podem ser classificadas como parciais ou generalizadas, dependendo de seu local de origem e natureza (DREIFUSS, 1989). Tais disparos podem começar localmente, em porções de hemisférios cerebrais, caracterizando crises parciais ou focais (sendo focos únicos ou múltiplos), ou simultaneamente em ambos os hemisférios, nas crises generalizadas (IASSEMIDIS, 2003). Após o início de uma crise parcial, essa pode permanecer local e levar a certos sintomas cognitivos, sensoriais, motores e autonômicos. Mas caso se espalhe, sintomas mais severos podem ocorrer, como consciência alterada, comportamentos automáticos complexos, ou movimentos tônico-clônicos bilaterais (IASSEMIDIS, 2003). Abaixo é mostrado, de modo geral, como crises epilépticas são classificadas (BERG et al., 2010).

- Crises Generalizadas
 - Tônico-Clônico
 - Ausência
 - Típica
 - Atípica
 - Ausência com características especiais
 - Mioclônica
 - Mioclônica
 - Mioclônica-atônica
 - Mioclônica-tônica
 - Clônica
 - Tônica
 - Atônica
- Crises Focais
- Desconhecido
 - Espasmos Epilépticos

1.2.Diagnóstico

Dentro da ampla categorização das síndromes epiléticas generalizadas e locais, são definidas duas subclassificações: Epilepsia primária (idiopática) e secundária (sintomática). Na epilepsia primária, nenhuma patologia subjacente é identificada, sendo que as próprias crises constituem a doença. Na epilepsia secundária, as crises são consequências de algum tipo de desordem neurológica. Como resultado, no segundo caso os prognósticos são menos favoráveis, assim como respostas a medicamentos (DREIFUSS, 1989).

Considerando os diferentes tipos e manifestações de epilepsia e a semelhança de seus sintomas com outras condições, seu diagnóstico em geral não é uma tarefa simples. Os principais indicadores utilizados no diagnóstico desta condição são os tipos de crise de um paciente e suas possíveis causas, assim como exames que envolvem o monitoramento por Eletroencefalografia (EEG) do paciente. Além destes, são levados em conta uma série de fatores e exames, como histórico médico, exames por imagem, testes sanguíneos e testes de desenvolvimento, comportamento e neurológicos (FRAZEN, 2000). Contudo, diagnósticos errôneos de epilepsia ainda não são incomuns, com taxas que variam de 4.6% até 30% em diferentes situações (SMITH; DEFALLA;

CHADWICK, 1999; STROINK et al., 2003; ULDALL et al., 2006; CHOWDHURY; NASHEF; ELWES, 2008). Entre outros fatores, isso se deve à semelhança de episódios de crise com outras condições como Síncopes, ataques não epiléticos de origem psicogênica e até vertigem e enxaqueca (SMITH; DEFALLA; CHADWICK, 1999; CHOWDHURY; NASHEF; ELWES, 2008).

É comum que relatos de episódios de crise por testemunhas façam parte do histórico do paciente. Ainda que estes relatos possam prover indícios que auxiliam no diagnóstico, sua confiabilidade é muitas vezes questionável. Além da subjetividade inerente a todo testemunho, que dificulta a descrição inequívoca de eventos, é comum que testemunhas estejam ansiosas durante episódios de crise, podendo prejudicar ainda mais a confiabilidade do relato. Contudo, a ausência de testemunhas ou registros de uma crise é ainda pior, uma vez que as características não podem ser determinadas de modo algum. Logo, é comum o monitoramento por vídeo-EEG de pacientes por longos períodos de tempo, em busca de episódios de crise e sua caracterização comportamental e eletrofisiológica, de anormalidades no EEG ou eventos inter-ictais que indicariam um estado patológico. Ainda que o método seja de grande valia no diagnóstico de epilepsia, sua especificidade é prejudicada pelo fato que atividades epileptiformes podem ser detectadas sem epilepsia (CHOWDHURY; NASHEF; ELWES, 2008). Sua sensibilidade também pode ser piorada, pois tais anormalidades no EEG podem ser ausentes (ou não detectáveis) em certos indivíduos com esta patologia, ou ocorrerem em períodos transitórios fora dos períodos registrados por EEG (CHOWDHURY; NASHEF; ELWES, 2008), motivando o monitoramento de pacientes a longo prazo (FRAZEN, 2000).

A prescrição de tratamentos em pacientes erroneamente diagnosticados com epilepsia pode ter consequências sérias. Além de reações adversas decorrentes do uso de remédios antiepiléticos, estes podem levar ao comprometimento do desenvolvimento (sobretudo de crianças), danos psicológicos (em parte devido ao preconceito e fardo social acarretado por esta condição) e socioeconômicos (GIBBS; APPLETON, 1992; CHOWDHURY; NASHEF; ELWES, 2008). Uma pessoa erroneamente

diagnosticada pode ter oferta reduzida de empregos, e ser impossibilitada de dirigir em certos países (como o Reino Unido) (SMITH; DEFALLA; CHADWICK, 1999).

Como visto nesta seção, o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico para epilepsia ainda é uma área com demanda e potencial. Parte deste trabalho envolve uma abordagem para tal fim, e será apresentada em seções adiantes.

1.3. Ictogênese e Epileptogênese

Pesquisas na área de epilepsia buscam identificar anormalidades estruturais, funcionais ou genéticas, que possam explicar como um cérebro se torna epilético (estudo da epileptogênese) e quais os mecanismos envolvidos no início de crises (ictogênese) (JIRUSKA; DE CURTIS; JEFFERYS, 2014).

As mudanças que podem levar um cérebro a se tornar epilético incluem perda neural, alterações metabólicas e imunológicas, gliose (VEZZANI; FRIEDMAN; DINGLEDINE, 2013), mudanças na expressão de canais dependentes de voltagem (BERNARD et al., 2004) e em receptores (EPSZTEIN et al., 2005). Os eventos inter-ictais e ictais resultantes podem ocorrer em regiões sem lesões ou espacialmente distantes (JIRUSKA; DE CURTIS; JEFFERYS, 2014). Assim, o conceito de foco epilético é redefinido, sendo agora caracterizado como a sobreposição de áreas patológicas e fisiopatológicas que geram atividade epileptiforme, como a região de início da crise, a região irritativa (geradora de descargas inter-ictais), lesão e a zona epileptogênica (GELZINIENE et al., 2008; JIRUSKA; DE CURTIS; JEFFERYS, 2014).

Processos de ictogênese são mais rápidos, com duração da ordem de segundos ou minutos, possuindo dinâmica eletrográfica de difícil detecção (BLAUWBLOMME; JIRUSKA; HUBERFELD, 2014). A compreensão de como ocorrem estes processos é importante para o desenvolvimento de métodos de tratamento voltados para a supressão da transição para crises epiléticas. Estes seriam uma alternativa à maioria de medicamentos antiepiléticos, que são voltados para a redução de excitabilidade e neurotransmissores, porém em geral com pouca especificidade, pois afetam outras funções e atividades do cérebro, causando efeitos colaterais indesejados (ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004). Para atuações pontuais que identifiquem e impeçam a transição para

estados ictais, é necessário que padrões associados a estágios pré-ictais sejam identificados. A busca por estes padrões é referida como predição de crises epiléticas, e tem sido um dos desafios mais buscados na área de pesquisa em epilepsia (SCHELTER; TIMMER; SCHULZE-BONHAGE, 2008).

Apesar de estudos relatarem métodos promissores de predição de crises desde a década de 90, recentemente vários destes tiveram sua validade questionada, após a impossibilidade de reprodução de resultados positivos mostrados originalmente (MORMANN et al., 2007; SCHELTER; TIMMER; SCHULZE-BONHAGE, 2008; KALITZIN; VELIS; DA SILVA, 2010). Tais discrepâncias ocorreram principalmente nos métodos que, originalmente foram otimizados e testados em conjuntos de dados específicos, mas falharam em obter desempenhos semelhantes em outros tipos de dados, sobretudo em registros extensos de EEG que reproduziam situações mais “reais” e menos controladas (MORMANN et al., 2007). É concebível que mecanismos de ictogênese sejam distintos para diferentes estruturas do cérebro, ou entre diferentes patologias (KALITZIN et al., 2002; MORMANN et al., 2007). Deste modo, a capacidade de generalização dos algoritmos de predição seria prejudicada, e os melhores métodos de detecção poderiam variar consideravelmente de paciente a paciente (MORMANN et al., 2007).

Enquanto grande parte dos estudos de predição de crises focou no desenvolvimento de algoritmos e técnicas de análise de sinais, pouca atenção era dada aos mecanismos que envolvem a geração de crises (MORMANN et al., 2007). O desenvolvimento de metodologias de predição deve contar com algoritmos cuja análise de sinais leve em conta as interações de circuitos neurais e suas complexas dinâmicas espaço-temporais, ainda que estas não sejam totalmente compreendidas. Em quase todas as teorias comumente aceitas de epileptogênese, hiperexcitabilidade e sincronização neuronal patológica desempenham papéis fundamentais (ENGEL, 1989), de modo que grande parte dos métodos desenvolvidos é baseada na exploração e quantificação dessas características, além da interação destas entre regiões do cérebro (SCHELTER; TIMMER; SCHULZE-BONHAGE, 2008). Outros métodos utilizam medidas de caoticidade, como Expoentes de Lyapunov (CHAOVALITWONGSE

et al., 2005; GULER; UBEYLI; GULER, 2005; IASEMIDIS; SHIAU, 2005; KALITZIN; VELIS; DA SILVA, 2010), motivados por teorias que associam o cérebro epiléptico a um sistema caótico não linear, e crises epiléticas ocorrem devido a falhas no caos espaço-temporal do cérebro (SACKELLARES; IASEMIDIS; SHIAU, 2000).

1.4.Sincronismo e Excitabilidade

No cérebro saudável, processos cognitivos necessitam da correta integração da atividade neural em diferentes escalas espaço-temporais. Porém, embora as estruturas básicas do cérebro e conexões locais entre neurônios sejam relativamente bem compreendidas, ainda não se sabe exatamente como se dá esta integração entre diferentes funções e regiões (BUZSÁKI, 2006). É possível que o mecanismo de Ligação pelo Tempo (Binding by Time) esteja intimamente envolvido com tal função (TASS et al., 1998; ENGEL; SINGER, 2001; LE VAN QUYEN et al., 2001; BUZSÁKI, 2006). A integração por este meio torna possível a comunicação entre as partes de um sistema composto por um número extremamente grande de neurônios, em contrapartida a um modelo puramente baseado em conectividade. Ou seja, não é de interesse somente como grupos de neurônios estão conectados entre si, mas como é feita a codificação temporal de informação entre as partes do sistema. Nesse contexto, a atividade de populações neurais locais seria modulada de acordo com dinâmicas neurais globais, com populações maiores oscilando e sincronizando com frequências mais baixas, enquanto conjuntos menores são ativados em frequências mais altas (BUZSÁKI, 2006). Distúrbios neste sincronismo poderiam ocorrer de várias maneiras e resultar em variedade de doenças e condições neurológicas e psiquiátricas (UHLHAAS; SINGER, 2006; JIRUSKA et al., 2013). No caso de Epilepsia, temos crises que são caracterizadas pelo recrutamento de regiões do cérebro em estados de hipersincronismo (IASEMIDIS, 2003).

Apesar de ter importância fundamental em epilepsia, o conceito de sincronismo nesta patologia é mais complexo do que apresentado na literatura (JIRUSKA et al., 2013). De forma geral, o sincronismo é descrito como o relacionamento estável entre características de dois ou mais sistemas. Porém, tais relacionamentos podem ocorrer por diversos modos e mecanismos. Assim como em

outras áreas, análises de sincronismo podem ser feitas em diversas escalas, desde o nível celular, com sinapses e disparo de grupos de neurônios vizinhos, até o acoplamento de circuitos neurais e comunicações entre diferentes regiões do cérebro (SCHARFMAN, 2007). Logo, é fundamental discernir como ocorrem os processos de sincronização do cérebro e quais análises quantitativas deveriam ser empregadas, de modo a oferecer uma visão mais profunda a respeito do desenvolvimento de crises epiléticas (MORMANN et al., 2000; IASEMIDIS, 2003).

Um tema central em discussões a respeito de crises epiléticas, apesar dos múltiplos mecanismos possíveis para ictogênese, é a perturbação dos mecanismos que regulam inibição e excitabilidade de células ou grupos neurais (SCHARFMAN, 2007). Alguns mecanismos que levam à excitabilidade de substratos neurais podem agir sobre o potencial de repouso de membrana de neurônios, que normalmente estão situados em uma faixa relativa ao limiar do potencial de ação, permitindo o disparo do neurônio quando necessário, mas evitando que este se comporte de modo instável e seja ativado de modo relativamente ininterrupto (SCHELTER; TIMMER; SCHULZE-BONHAGE, 2008). Porém, seja focal ou generalizada, somente disparos excessivos de neurônios não são suficientes para causar uma crise (SCHARFMAN, 2007); é necessário que um grupo ou circuito de neurônios esteja envolvido, e este recrutamento de neurônios disparando de forma anormal envolve necessariamente algum tipo de sincronismo, que pode ocorrer de modos e em escalas diferentes, por diversos mecanismos.

Eventos eletrográficos durante estágios ictais refletem desvios paroxísmicos de despolarização (PDS) síncronos de células corticais piramidais (MATSUMOTO; MARSAN, 1964), resultado de interconexões glutamatérgicas que geram massivos potenciais excitatórios pós-sinápticos (JOHNSTON; BROWN, 1984; SCHARFMAN, 2007). Outro mecanismo que pode promover sincronização é a baixa resistência para correntes intracelulares em junções *Gap* de neurônios corticais, que facilitaria o acoplamento de neurônios vizinhos (TRAUB et al., 2004). O sincronismo de neurônios também pode ser paradoxalmente promovido por mecanismos como inibição, como neurônios principais se recuperando de inibição de forma síncrona (KLAASSEN et al., 2006; JIRUSKA et al., 2013). Visto o grande número de mecanismos e modos de

manifestação de sincronismo neural, é importante associar corretamente métodos de análise de sincronização com a questão e método científico. Estas escolhas vão desde a proposta do protocolo de experimento, como o tipo de resposta desejada, regiões de interesse e relações esperadas de acoplamento, até a escolha do índice de sincronismo recomendado.

Ao analisar sinais de EEG, a presença de ritmos neurais endógenos e presença de ruído dificultam consideravelmente a obtenção de informações de interesse. Os métodos devem também lidar com a variabilidade entre registros em situações semelhantes, de animais distintos ou ao longo de diferentes períodos de tempo em um mesmo animal, decorrentes da plasticidade e caráter de auto-organização de redes neurais. Certas abordagens envolvem o uso de estímulos como modos de sondar o sistema, ressaltando características de interesse do sinal que serão analisadas. Tais estratégias são interessantes especialmente quando análises de sincronismo neural são de interesse. Considerando que o sincronismo de dois ou mais sistemas envolve um relacionamento funcional estável entre as partes, a perturbação destes sistemas neurais é um método útil para avaliar sua estabilidade e seus limiares de sincronismo (FRANCIS; GLUCKMAN; SCHIFF, 2003; JIRUSKA et al., 2013). Este trabalho utiliza um protocolo deste tipo, onde estímulos são apresentados de modo a facilitar a extração de características do sinal relacionadas à excitabilidade e sincronismo.

1.5.Extração de Características de Sinais de EEG e Reconhecimento de Padrões

A combinação de métodos de análise é parte fundamental no progresso em neurociência funcional (BAŞAR, 2013). Como o cérebro é um sistema único e altamente complexo, a análise de seus sinais é marcada por desafios que necessitam de diferentes abordagens para serem solucionados. Assim, no processamento de sinais de EEG, são utilizados métodos provenientes de diversas áreas como Bioengenharia, Engenharia Elétrica, Química, Matemática e Física, além de novos métodos criados para lidar com as particularidades de sinais neurais (IASSEMIDIS, 2003).

De forma geral, métodos de processamento e análise de sinais buscam a extração de informação a respeito do sinal, que esteja relacionada com o fenômeno em questão. Metodologias deste tipo podem ser denominadas como extração de atributos (*features*, parâmetros ou características), nos quais valores quantitativos são obtidos a partir de trechos de interesse do sinal, original ou processado por filtros ou transformadas (como a Transformada de Fourier).

Quando a extração de características de sinais é associada a técnicas de reconhecimento de padrões (ou *machine learning*), é possível a separação de amostras em *clusters*, ou categorização destas em classes. No segundo caso, em geral é necessário que cada amostra esteja associada a um rótulo de classe. Por exemplo, consideramos um conjunto de dados com X amostras de sinais, metade de pacientes com algum tipo de patologia (classe A), outra metade de pacientes saudáveis (classe B). N Parâmetros de interesse com poder de discriminação entre os grupos são extraídos de cada amostra, que são associadas com os respectivos rótulos de classe (Saudável ou patológica, no caso). O método de classificação define então, limites para discriminação entre classes (ou superfícies/linhas de separação), representados no espaço N -dimensional. Logo, o algoritmo treinado faz previsões a respeito da classe das novas amostras a ele submetidas. Para avaliação (ou teste) do algoritmo, novos dados conhecidos (não utilizados no treinamento) são submetidos, e a taxa de acerto e outros parâmetros de desempenho relacionados à taxa de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos são quantificados. Quando trabalhando com conjuntos de dados, é comum a separação de cerca de 70% de amostras para treinamento, e o restante para teste do algoritmo. Para fins ilustrativos, a ideia básica da metodologia é representada na Figura 1, onde sinais rotulados como classe A ou B têm dois atributos extraídos e são separados por um classificador (no caso, uma Máquina de Vetores de Suporte linear - SVM).

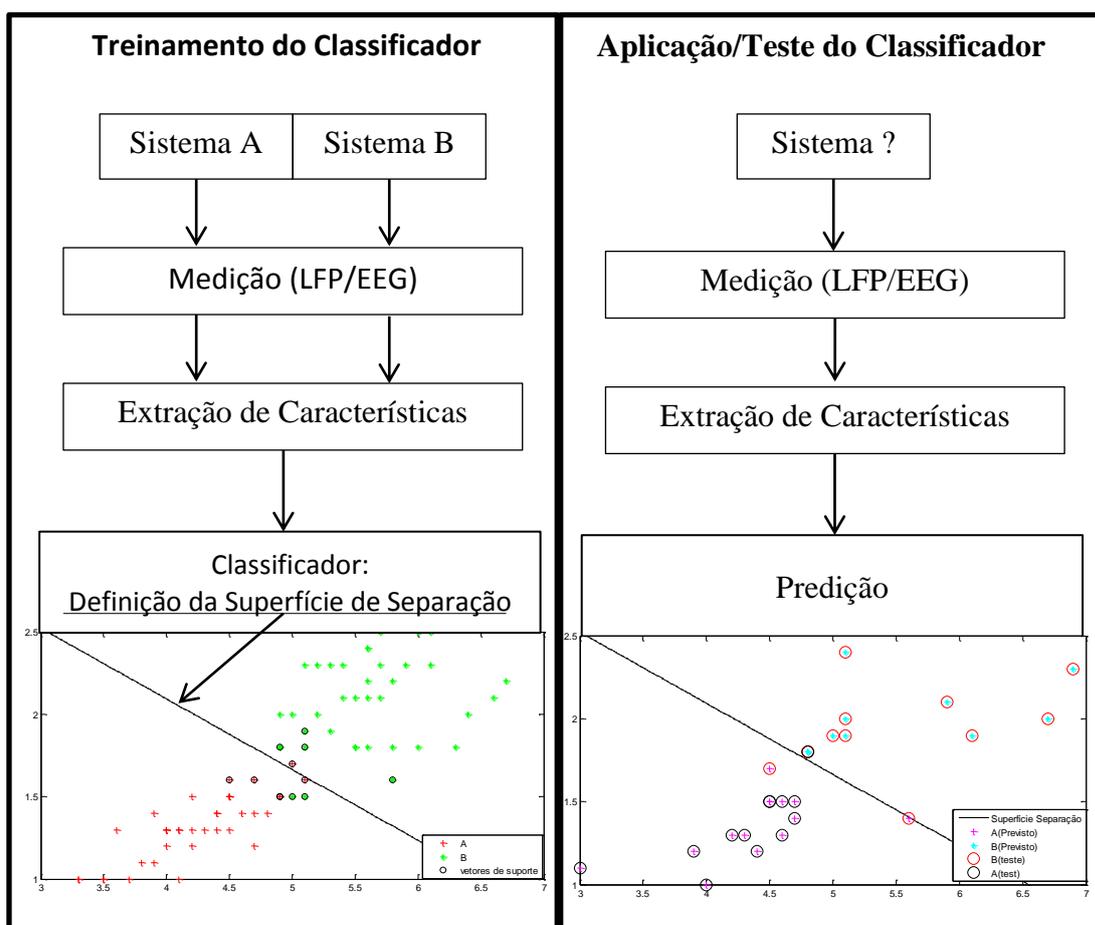


Figura 1: Diagrama representando as etapas de treinamento e teste de um classificador

Esta metodologia geral, de obtenção de características de sinais de um conjunto e reconhecimento dos padrões resultantes, pode ser empregada em diversas maneiras em pesquisas sobre epilepsia. Por exemplo, o diagnóstico de epilepsia por meio do monitoramento por EEG, normalmente feito por inspeção de um neurologista, pode ser auxiliado por algoritmos de reconhecimento de padrões. Funções semelhantes podem envolver diagnósticos pré-cirúrgicos, por meio da identificação automática de padrões anormais de EEG, definindo se estes seriam decorrentes de focos epileptogênicos ou não. Aplicações também são possíveis para detecção de crises, como parte de sistemas de alarme e aviso a parentes próximos. E em o que é provavelmente a tarefa mais difícil, o desenvolvimento de sistemas de predição de crises envolve necessariamente o uso de métodos de extração de atributos e reconhecimento de padrões de sinais biológicos. Em todos os casos, o tipo de abordagem de análise a ser deve levar em conta não só a natureza e as peculiaridades de sinais de EEG ou LFP, mas os mecanismos da patologia em questão.

No caso de crises epiléticas, consideramos características relacionadas a dois fatores que desempenham um papel fundamental em ictogênese: sincronismo e hiperexcitabilidade (MORAES, 1998).

1.6.Sondagem de um Sistema Neural

Apesar de todo esforço em pesquisas visando esclarecer a dinâmica e os fatores que levam à ictogênese e epileptogênese, grande parte das questões ainda se encontra em aberto. Isso se reflete em diagnósticos errôneos (como descrito em seções anteriores) e no mau desempenho dos algoritmos de predição de crises, sobretudo quando estes são confrontados com dados que testam sua robustez, confiança e capacidade de generalização (MORMANN et al., 2007). Isto motiva a busca de caminhos alternativos aos tradicionais, que focam no processamento e análise de sinais, métodos estatísticos e validação em bancos de dados de EEG disponíveis. Como exemplos de tais caminhos alternativos, temos abordagens que envolvem protocolos de experimentos baseados na sondagem de sistemas. Ou seja, pela aplicação contínua ou intermitente de certos estímulos em indivíduos, é possível a extração de características que possibilitem a melhor caracterização de seus estados. Desta forma, os fatores que diferenciam um cérebro com epilepsia de um normal seriam ressaltados, assim como os parâmetros que são alterados durante transições de estados inter-ictais para estados ictais. Isto teria aplicações promissoras nas áreas de caracterização e prospecção de sistemas epileptogênicos e ictogênicos, diagnósticos, análises sobre dinâmicas ictais e predição de crises.

De forma geral, a sondagem é feita aplicando um estímulo controlado ao sistema, e analisando sua resposta. Por exemplo, um impulso pode ser aplicado em um filtro linear, e a resposta ao impulso deste é uma boa representação de seu funcionamento. Em (VALENTÍN et al., 2005), um protocolo deste tipo é utilizado, no qual a resposta a estímulos elétricos intra-corticais é utilizada como biomarcador para identificação de regiões epileptogênicas. Em (KALITZIN; VELIS; DA SILVA, 2010) e (MEDEIROS et al., 2013), a aplicação de pulsos elétricos em regiões do cérebro (hipocampo e complexo amigdalóide, respectivamente) possibilitou o cálculo de índices que evoluíram progressivamente até a ocorrência de crises, e que poderiam ser

usados como marcadores para predição de episódios ictais. Caso seja utilizada para esta finalidade, é importante que os estímulos utilizados não sejam pró-convulsivos, que as crises não sejam agravadas nem causadas pela estimulação (MEDEIROS et al., 2013). Porém, também é possível o desenvolvimento de protocolos onde a estimulação esteja diretamente relacionada com a iniciação e desenvolvimento de crises, de modo a estudar os mecanismos de iniciação e dinâmicas ictais. Nestes casos, podem ser explorados modelos animais de crises ou modelos de epilepsia reflexa, com a aplicação dos respectivos estímulos que desencadeiam as crises. E em protocolos onde estas não são induzidas (com estímulos de baixa intensidade, por exemplo), é possível que a prospecção seja útil na identificação de sistemas ictogênicos. A Figura 2 representa, de forma geral, a prospecção de um sistema para obtenção de informações a seu respeito.

Protocolo de Sondagem

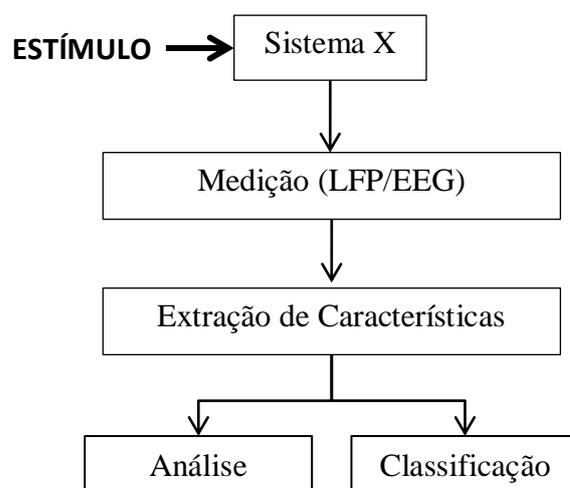


Figura 2: Diagrama mostrando a sondagem de um sistema e subsequente extração de informações para análise ou classificação.

Na sondagem de circuitos neurais, certos estímulos podem resultar em Potências Evocados (PE). PEs são o surgimento de atividades elétricas de resposta do cérebro a estímulos externos, e análises de suas características podem revelar informações importantes a respeito do estado do sistema. Como exemplo, PEs são comumente utilizados em ambiente clínico para avaliação de integridade de redes neurais somato-sensórias (CHIAPPA, 1997).

Considerando que a epilepsia é caracterizada pelo funcionamento anormal de grupos de neurônios do cérebro, é possível utilizar protocolos de estimulação e análise dos respectivos PEs como prospecção de circuitos neurais, identificando os parâmetros que caracterizam um sistema como patológico e auxiliando em seu diagnóstico. Para epilepsia, esta caracterização seria mais evidente (mas não restrita) em protocolos que envolvessem estímulos diretamente relacionados com a geração de crises. Assim, sistemas ictogênicos podem ter suas características ressaltadas e analisadas por meio de protocolos que envolvam a correta combinação de: (1) tipo de estímulo e resposta evocada, (2) modelo utilizado, (3) tipo e região dos sinais medidos e (4) métodos de processamento e análise de tais sinais. Nas seções a seguir, são mostrados, em linhas gerais, a combinação dos métodos utilizados neste trabalho e sua motivação.

1.7. Tipo de estímulo

A princípio, são buscados tipos de estímulo que desencadeiam episódios ictais em algum modelo animal de crises ou de epilepsia. Além disso, é desejável que o estímulo em questão possibilite análises de duas características intimamente relacionadas com ictogênese: sincronismo e hiperexcitabilidade. Uma possibilidade é a utilização de estímulos auditivos em modelos de crise audiogênica.

Quando um sujeito é submetido a um estímulo sonoro, atividades elétricas da ordem de dezenas de μV são evocadas ao longo de estruturas que fazem parte da via auditiva (SILVA; NIEDERMEYER, 2010). Estas respostas são denominadas Potenciais Evocados Auditivos (PEA), e podem ser divididas em dois tipos: Potenciais Evocados Auditivos Transitórios (PEAt) (PICTON et al., 1974) e Potenciais Evocados Auditivos de Regime Permanente (PEArp ou ASSR – Auditory Steady State Response) (PICTON et al., 2003). No primeiro caso, os estímulos são de curta duração (como cliques ou *bursts* de tons) e apresentados a uma taxa que permite que um PEA (a atividade elétrica decorrente do estímulo sonoro) termine antes que o próximo estímulo seja apresentado. Nestes casos, em geral, são utilizadas técnicas de média coerente para a análise dos sinais de EEG, onde a média de janelas sincronizadas com os estímulos (*trials*) é calculada, de modo a cancelar atividades neurais aleatórias (correspondendo a ruídos ou atividades endógenas) e ressaltar a resposta evocada. Já no caso de ASSR,

estímulos contínuos são aplicados, de forma a evocar respostas sustentadas, com aplicações na avaliação de limiares auditivos e monitoramento de estados durante anestesia (PICTON et al., 2003). Estes estímulos podem ser gerados por meio de tons modulados em amplitude (AM), onde uma frequência alta f_c (portadora) é envelopada por uma frequência menor f_m (moduladora). No caso de ASSR, f_m está relacionada com a frequência de ativação de grupos de neurônios recrutados por f_c . Ou seja, um estímulo composto por uma portadora de 10 kHz e moduladora de 30 Hz resultaria na ativação síncrona de grupos de neurônios que respondem a 10 kHz, na forma de oscilações de 30 Hz.

A amplitude do sinal medido em um protocolo ASSR de estimulação por sons AM é um importante indicador de excitabilidade neural, de grande valia para a avaliação de circuitos potencialmente ictogênicos (ODA, 2014). Outros parâmetros de interesse para esse fim estão relacionados com as dinâmicas de sincronismo neural, que também podem ser sondadas por meio de tons AM de um protocolo ASSR, já que a ASSR é uma resposta essencialmente oscilatória, que acompanha a componente moduladora do estímulo. Medidas quantitativas deste tipo podem caracterizar graus de coerência e variação da fase relativa entre os sinais, além de revelar possíveis dinâmicas direcionais, onde os sinais são caracterizados por relações *driver-responder* (KREUZ et al., 2007). Algumas destas medidas independem de relações de amplitude entre os sinais, sendo úteis para a avaliação independente do hipersincronismo em relação à hiperexcitabilidade, ainda que possível que estes estejam intimamente relacionados em certas escalas espaço-temporais (SCHARFMAN, 2007; MEDEIROS; MORAES, 2014).

Alterações de potência e sincronismo da ASSR podem ser utilizadas como biomarcadores de patologias neurais como esquizofrenia (O'DONNELL et al., 2013). Neste trabalho, características da ASSR são utilizadas como biomarcadores da propensão a crises epilépticas, além de esclarecer possíveis mecanismos de ictogênese.

1.8. Modelo animal

O uso de modelos animais abre novas possibilidades para o estudo de epilepsia e ictogênese, por meio do desenvolvimento de diferentes protocolos de experimento. Estes podem ser agudos, onde uma crise pode ser induzida pela aplicação única de um estímulo específico, ou crônicos, onde a estimulação sucessiva permite o estudo da evolução de crises em diversas escalas de tempo (MORAES, 1998). Um dos modelos de crises agudas que pode ser associado com estímulos sonoros, que possibilite análises tanto da dinâmica ictal quanto de sondagem de circuitos neurais, é o modelo de crises tônico-clônicas Audiogênicas (CAs), desencadeadas em ratos da linhagem “Wistar Audiogenic Wars” (WARs). Esta linhagem foi obtida por meio de seleção genética, que resultou em animais com predisposição a crises convulsivas em vários substratos neurais (SCARLATELLI-LIMA et al., 2003; PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006). Estes animais sofrem crises generalizadas tônico-clônicas quando submetidos a estímulos sonoros de alta intensidade (~110 dB), além de possuírem maior sensibilidade a certos indutores de crises, como eletrochoque e certas drogas (Pentilenotetrazol e Pilocarpina) (SCARLATELLI-LIMA et al., 2003). Assim, temos a combinação entre estimulação sonora e modelo animal, possibilitando a sondagem de substratos neurais em busca dos mecanismos de ictogênese. Em seguida, é necessário definir qual tipo de sinal será medido, representando atividade neural de interesse, e em qual região do cérebro.

1.9. Região de interesse e LFP

Dois substratos neurais desempenham papel fundamental para o desencadeamento de crises audiogênicas e límbicas; O Colículo Inferior (CI) (MORAES et al., 2000) e a Amígdala (DUTRA MORAES; GALVIS-ALONSO; GARCIA-CAIRASCO, 2000). Acredita-se que as vias epilépticas de tronco encefálico e prosencefálica interagem na amígdala (DUTRA MORAES; GALVIS-ALONSO; GARCIA-CAIRASCO, 2000). Já o CI é um substrato essencial da via auditiva, situado em seus primeiros estágios (OLIVER et al., 1991). O CI também possui funções de integração multissensorial, com conexões para o sistema límbico, motor e sensorial (WINER; SCHREINER, 2005). Devido

à sua posição na via auditiva, tons AM evocam ASSRs evidentes no CI, com oscilações presentes na frequência de modulação (f_m) do som. Deste modo, a ASSR funciona como marcador eletrográfico da capacidade de processamento auditivo primário (ROSS; HERDMAN; PANTEV, 2005). Com isto, é possível avaliar como esta função está envolvida na propensão a crises de animais WAR, assim como seu papel em CAs; uma CA é um sistema reverberante, no qual um circuito de resposta auditiva recruta outros circuitos em um estado hipersíncrono, ou este age apenas como “gatilho” da via ictogênica?

Ponderando as limitações práticas e motivações fisiológicas, decidiu-se que as análises deste trabalho seriam feitas em sinais provenientes do CI, em experimentos envolvendo a apresentação de estímulos sonoros acima e abaixo dos limiares para desencadeamento de crises em WARs.

Para a estimação de atividade neural no CI, recorreremos à implantação de microeletrodos nesta estrutura, a fim de medir potenciais elétricos extracelulares (no caso, o Potencial de Campo Local, ou LFP). Estes potenciais medidos resultam da sobreposição de correntes transmembranares, originadas por diferentes eventos iônicos. Para variações significativas no potencial, esta sobreposição ocorre mais facilmente para eventos relativamente lentos, como atividades sinápticas, que constituem as fontes mais significativas para fluxos de corrente extracelulares que influenciam o LFP (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012). Outros eventos podem influenciar o LFP medido, como Potenciais de ação rápidos (Na^+), *Spikes* de Cálcio (KAMONDI; ACSÁDY; BUZSÁKI, 1998), correntes intrínsecas (SILVA; AMITAI; CONNORS, 1991), efeitos efáticos (OZEN et al., 2010), junções *Gap* e interações neurônio-*glia* (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012). Assim, interações entre populações de neurônios são quantificadas indiretamente pelo LFP medido (JIRUSKA et al., 2013), revelando características de circuitos neurais em diversas bandas de frequência, além de componentes oscilatórias específicas como a ASSR evocada por um som AM. A alta resolução temporal de sinais de LFP e a melhor resolução espacial (em relação a registros de EEG de escalpo) tornam o uso deste método interessante para o estudo de sincronismo e dinâmicas de osciladores neurais.

1.10. Análise dos Sinais

Sinais de EEG e LFP também podem ser vistos como medições da atividade de conjuntos de osciladores que geram atividade rítmica, em geral aleatória, em diversas faixas de frequência (BAŞAR, 2013). Porém, estímulos sensoriais podem ser utilizados para acoplar tais osciladores, fazendo-os agir de forma coerente e resultando em potenciais evocados. Neste trabalho, um protocolo ASSR é utilizado de modo a realçar informações a respeito do sistema, que estejam relacionadas com ictogênese. Ou seja, características do sistema, inicialmente contidas na atividade aparentemente desordenada de neurônios, podem ser transformadas por meio de ASSR em um estado ordenado e mais simples de extrair características. Embora os parâmetros relacionados à ASSR sejam de maior interesse neste trabalho, a análise dos sinais não é restrita aos potenciais evocados, mas também inclui a dinâmica de ritmos neurais endógenos durante a apresentação de estímulos e ao longo de episódios ictais.

Dos sinais de LFP medidos, temos interesse em características relacionadas a dois fatores fundamentais para o desenvolvimento de crises (MORAES, 1998): excitabilidade (ou nível de atividade neural) e sincronismo. A excitabilidade é vista na própria amplitude do sinal (embora esta esteja relacionada indiretamente com o sincronismo entre neurônios de grupos locais). Porém, os sinais de LFP possuem diversos componentes e são não-estacionários em sua maioria (dependendo do período e região analisada, além do estado do animal). Como o ASSR tem uma frequência específica (definida por f_m), e os ritmos cerebrais também possuem diferentes faixas de interesse (delta, theta, alpha, beta, gamma), é de interesse o cálculo das potências em bandas de frequências específicas, de modo a avaliar efeitos da estimulação em osciladores endógenos. Para isso, é possível a utilização de métodos de análise tempo-frequência, como a Transformada de Fourier de Tempo Curto (STFT – *Short Time Fourier Transform*) e Wavelets, ou por meio da filtragem dos sinais nas bandas desejadas seguida pela estimação de envelopes e cálculo de amplitude e potência.

Outras características de interesse estão relacionadas com o vago conceito de sincronização em epilepsia (IASSEMIDIS, 2003). Em geral, o sincronismo é caracterizado

pela dinâmica das interações temporais entre componentes, podendo se manifestar de diversas formas e motivando o desenvolvimento de diversas medidas (KREUZ et al., 2007). Como exemplos de manifestações, temos o acoplamento entre dois sinais, onde determinada característica de um sinal rege a dinâmica de outro parâmetro do sinal acoplado. Diversas interações deste tipo são mostradas na Figura 3.

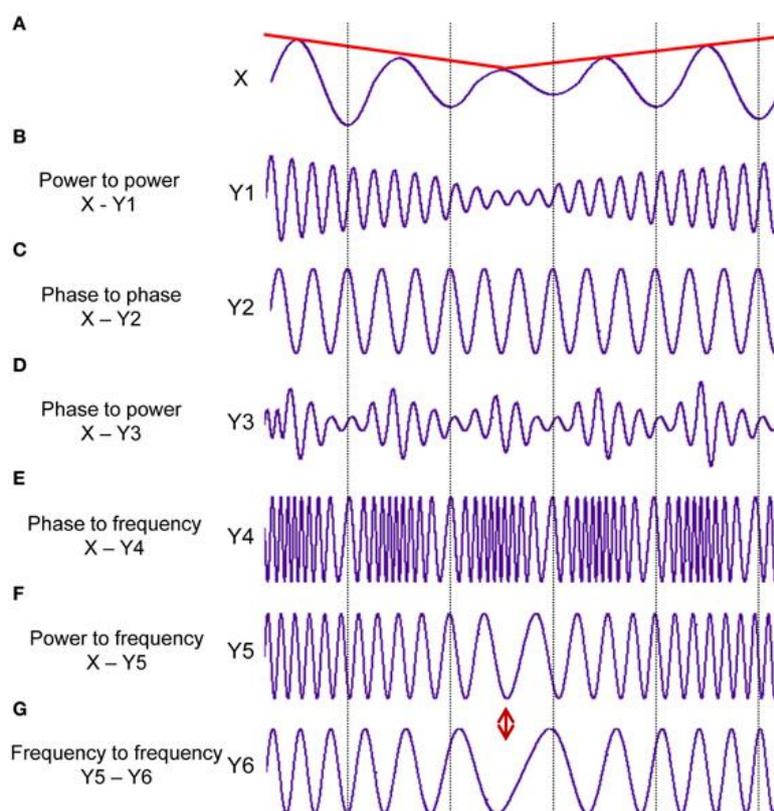


Figura 3: Exemplos de acoplamento entre X e Y. (a) sinal X e seu envelope (em vermelho) (b) Acoplamento Amplitude¹-Amplitude (c) Acoplamento de fase n:m – a cada ciclo de X, temos 4 ciclos de Y2. (d) Acoplamento fase-amplitude, ou PAC (Phase-Amplitude Coupling). (e) Fase de X modulando a frequência de Y4. (f) Amplitude de X modulando a frequência de Y5 (g) Acoplamento Frequência-Frequência (JENSEN; COLGIN, 2007)

Estes tipos não são mutuamente exclusivos (JENSEN; COLGIN, 2007), de modo que uma característica de X pode estar relacionada com mais de uma característica de Y. Entre os tipos de acoplamento de interesse deste trabalho, destacamos a modulação entre fase e amplitude (PAC - Phase Amplitude Coupling, Figura 3.d) e o acoplamento de fase n:m (Figura 3.c).

O tipo de sincronismo analisado neste trabalho é caracterizado pelas relações temporais entre o estímulo sonoro e a ASSR. Ou seja, além de analisar a amplitude da

¹ Neste caso, amplitude = *power*, sendo relacionada com a magnitude do envelope do sinal (em vermelho, na Figura 3)

resposta neural em f_m , o quanto esta está acoplada com a forma de onda do som aplicado? Como a fase é a única característica variante na componente **moduladora** do estímulo sonoro (já que a frequência f_m e amplitude são constantes), é de interesse a estimativa do acoplamento de fase n:m. Ou seja, o quanto a ASSR é capaz de “seguir” o estímulo. Detalhes a respeito dos métodos utilizados são apresentados na seção 2.3.3.

1.11. Objetivos e Hipóteses

Este trabalho é focado no estudo de sincronismo e hiperexcitabilidade em um modelo animal de crises epiléticas, visando esclarecer mecanismos de ictogênese, além da avaliação de um método de identificação de animais propensos a crises, com possíveis aplicações diagnósticas.

O processamento auditivo de animais propensos a crises audiogênicas é analisado em termos de excitabilidade e sincronismo, por meio de experimentos envolvendo a sondagem da circuitaria neural por estimulação acústica. Hipóteses são propostas a respeito do papel destes fatores em ictogênese, descritas a seguir:

- I. Os WAR apresentam um processamento da informação sensorial auditiva diferente de animais saudáveis.
 - i. Isto não seria visível na atividade basal, mas seria evidente pela ASSR evocada pela ativação da via auditiva por um som modulado em amplitude.
 - ii. Isto seria visível, em menor grau, na atividade diferenciada de osciladores endógenos de WARs, durante a aplicação de estímulos sonoros.
- II. Circuitos neurais do CI de animais WAR são propensos a sincronizar mais facilmente com estímulos externos.
- III. Utilizando atributos de energia (ASSR e outras bandas) e PLV, é possível treinar um classificador que identifique se determinada amostra é de um animal WAR (propenso a CAs) ou Wistar.

- IV. O processamento de informações sensoriais auditivas em WARs é alterado na iminência de uma crise audiogênica, e se torna comprometido nos períodos ictal e pós-ictal.

1.12. Estrutura do Texto

A dissertação é organizada do seguinte modo:

- Capítulo 2: O protocolo de estimulação sonora em um modelo de crises audiogênicas é descrito. Atributos relacionados à excitabilidade neural e sincronismo são extraídos dos sinais de EEG obtidos pelo protocolo, para avaliação das hipóteses I, II e III.
- Capítulo 3: A hipótese IV é testada, utilizando métodos de análise semelhantes ao capítulo anterior e estimulação sonora de alta intensidade (110 dB, suficiente para desencadear crises em animais sensíveis).
- Capítulo 4: Conclusões e sugestões de trabalhos futuros.

2. Protocolo de Sondagem por Estimulação Sonora Sublimiar

2.1.Introdução

Neste capítulo, um protocolo de sondagem por estimulação sonora é utilizado para avaliar hipóteses que envolvem a hiperexcitabilidade e sincronismo de substratos neurais da via auditiva em animais suscetíveis a CAs. Estas características seriam evidentes na ASSR, que pode ser considerada como uma assinatura eletrográfica da via sensorial primária que é recrutada durante a estimulação de tons AM. Assim, espera-se auxiliar na compreensão a respeito das anormalidades do processamento auditivo em animais suscetíveis a CAs, e qual papel circuitos de resposta auditiva desempenham no desencadeamento de crises.

Por meio da quantificação da Potência da ASSR no CI de animais WAR (grupo experimental) e Wistar (controle), submetidos a um protocolo de estimulação acústica, é avaliada a hipótese (I) que o processamento auditivo em WARs é diferente de animais Wistar. O grupo experimental teria amplitudes da ASSR maiores que o grupo controle, devido à hiperexcitabilidade dos substratos neurais que estariam envolvidos, direta ou indiretamente, com a via ictogênica. Como sub-hipótese, é proposto que a potência basal (das bandas *delta*, *theta*, *alpha*, *beta*, *gamma* e ao redor de f_m) dos dois grupos não seria diferente, de modo que a ativação da via por estimulação acústica seria necessária para ressaltar a diferença.

Considerando que hipersincronismo é outro fator envolvido em ictogênese, foi proposta a hipótese (II) que a resposta de animais WAR possui maior grau de acoplamento com estímulos externos. Para avaliar esta hipótese, foi utilizado o mesmo protocolo de estimulação sonora, com eletrodos no CI. Porém, ao invés da potência da ASSR, é quantificado o grau de sincronismo de fase entre a ASSR e a componente f_m do som aplicado, por meio do índice de Phase Locking Value (PLV).

Em seguida, é apresentada a hipótese III, no qual os métodos utilizados para avaliação das hipóteses anteriores são empregados no desenvolvimento de um

algoritmo que, por meio de sinais de EEG obtidos durante estimulação sonora, identifica parâmetros para diferenciar animais suscetíveis a crises de animais saudáveis. Esta hipótese tem como motivação o desenvolvimento de uma ferramenta diagnóstica auxiliar, visto que diagnósticos errôneos de epilepsia ainda são um problema. O monitoramento por EEG durante longos períodos, além de trabalhoso, não garante a detecção de episódios ictais e inter-ictais (ou eventos fisiológicos podem ser interpretados como patológicos). Além disso, um diagnóstico positivo errôneo devido à identificação de anomalias no EEG não decorrentes de epilepsia, que resulte na administração desnecessária de medicamentos, pode ter consequências catastróficas na vida e desenvolvimento do paciente, sobretudo se este for uma criança. Um protocolo de diagnóstico baseado na sondagem de sistemas neurais seria uma ferramenta auxiliar dentro do conjunto de exames de diagnóstico para epilepsia, com o diferencial de que os sinais são obtidos com a prospecção do sistema, de modo a ressaltar características no sinal inerentes à ictogênese. Estas seriam representadas de modo esparsos, relativamente separadas das componentes geradas por ritmos endógenos do cérebro. As seções a seguir descrevem a metodologia do protocolo de experimento, seguido pelos métodos de análise dos sinais obtidos.

2.2. Protocolo de Estimulação

Os protocolos deste capítulo e do Capítulo 3 utilizam os mesmos animais e equipamentos, variando a disposição dos períodos de estimulação (*trials*) e a intensidade do estímulo sonoro. Enquanto nesta seção a estimulação é feita somente como sondagem do sistema, com diferentes frequências e intensidade sublimar para CAs, no Capítulo 3 a estimulação de alta intensidade serve tanto para prospecção do sistema, quanto como desencadeadora das crises em ratos WAR.

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Neurociências (NNC), mas não fazem parte do escopo deste trabalho, que é focado na análise dos sinais adquiridos. Porém, os protocolos serão brevemente aqui descritos para referência e esclarecimento de como os dados foram obtidos. Para mais detalhes a respeito de como foram conduzidos os experimentos, conferir (PEREIRA, 2014).

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) - número de processo 24/2013 (ver Anexo I).

2.2.1. Animais

Foram utilizados oito ratos WAR, uma linhagem obtida por seleção genética no qual os animais sofrem crises generalizadas tônico-clônicas, seguidas por espasmos clônicos, quando submetidos a estimulações sonoras de alta intensidade (≥ 110 dB). O grupo controle é composto por oito ratos machos da linhagem Wistar. Todos os animais possuíam peso entre 270 e 310 gramas (aproximadamente oito semanas de idade) e foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CeBIO-ICB/UFMG).

Para inclusão nos protocolos experimentais, cada animal deveria se adequar aos critérios de; (1) *Screening* Audiogênico, para determinar a sensibilidade aos estímulos acústicos e (2) Confirmação do posicionamento do eletrodo de registro, por meio de verificação histológica.

2.2.2. Cirurgia

Alguns pontos a respeito do procedimento cirúrgico são mostrados abaixo:

- Anestesia: Solução de quetamina (30mg/kg) e xilazina (5mg/kg), de acordo com as recomendações do comitê de ética no uso de animais da UFMG (CEUA-UFMG). Se necessário, era fornecido ao animal um reforço anestésico de 0,1 mL de quetamina (10g/100 mL) intraperitonealmente.
- Posicionamento do animal: Feito em aparelho estereotáxico (Stoelting Co.), com o animal fixado por meio de barras auriculares maciças.
- Coordenadas: As coordenadas para trepanação e posicionamento do eletrodo são definidas utilizando o bregma como referencial (PAXINOS; WATSON, 1998) para implantação do eletrodo de registro, que era fixado do lado direito do crânio com o auxílio da substância cimento de zinco.

- Conectores: Os três eletrodos (terra, referência e ativo) foram soldados ao conector RJ-11 de 4 pinos, cobrindo-se logo em seguida a ferida cirúrgica com acrílico odontológico.

Para mais detalhes, conferir em (PEREIRA, 2014).

2.2.3. Estimulação Acústica

As formas de onda dos estímulos auditivos foram geradas pelo programa *Adobe Audition* (Adobe Systems Inc., 3.0). Os sinais eram compostos por uma portadora com frequência $f_c = 10\text{kHz}$, modulada em amplitude por f_m de 53,71 Hz ou 92,77, formando *trials* de 30s intercalados por períodos de silêncio (30s). O valor de f_c foi definido como um bom custo-benefício, considerando capacidade de resposta auditiva nos animais utilizados no trabalho e a capacidade dos alto-falantes usados. As frequências de f_m foram escolhidas por possuírem uma menor variação na dispersão de fase e maior estabilidade da ASSR entre os grupos analisados, em um protocolo de varredura de frequências (PEREIRA, 2014).

Como o objetivo a princípio é somente a prospecção do sistema, a intensidade do som foi definida como 85 dB, abaixo do limiar de crise dos WAR. A Figura 4 ilustra o protocolo de estimulação audiogênica deste capítulo, aplicado uma vez para cada rato.

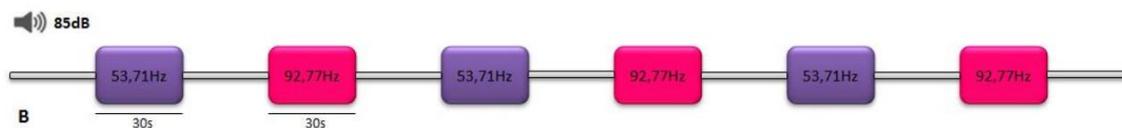


Figura 4: Representação do Protocolo de Estimulação sublimiar de 85 dB. Ao longo do registro, são intercalados períodos com som (*trials*) e trechos sem som (*basal*). São 6 *trials* de 30s, com valores de f_m 53.71Hz ou 92.77Hz.

Assim, são sete trechos sem som, que foram considerados como períodos de atividade basal nas análises, e seis trechos com som (*trials*), dos quais três são com uma moduladora de 53,71Hz, e três com $f_m = 92,77\text{Hz}$.

Todas as trilhas sonoras utilizadas foram geradas contendo dois canais. O primeiro consistia em uma onda senoidal nas mesmas frequência e fase da componente moduladora, servindo como canal de referência para análises das relações de fase entre estímulo e LFP. O segundo canal consistia no sinal da trilha a ser reproduzida - em um tom de 10.000Hz com amplitudes moduladas em 53,71 Hz ou

92,77 Hz. As trilhas sonoras foram reproduzidas por um tocador de CD (Panasonic, SL-S140) de modo que o primeiro canal fosse registrado como um sinal pelo condicionador analógico de sinais e o segundo canal fosse reproduzido pelo sistema de reprodução de som. A saída do segundo canal foi, então, conectada a um amplificador automotivo (MXR 2250 – 500 watts), que por sua vez se conectava a um alto falante (Selenium T-40). O alto falante foi acondicionado em uma caixa metálica, para blindagem eletromagnética, forrada internamente com espuma acústica. O estímulo sonoro foi então conduzido por um tubo de borracha até o topo da caixa de acrílico e a intensidade do som no interior da caixa foi calibrada (Brüel & Kjær, Type 2236) antes de cada sessão experimental para 85 dBA SPL no centro da caixa.

Os sinais foram registrados em dois canais. O primeiro contém a onda moduladora f_m , servindo como referência para análises de relações temporais entre estímulo e ASSR. Este sinal não contém a componente correspondente à portadora, pois esta não está presente na resposta evocada no CI, que oscila de acordo com as variações de amplitude do som (f_c), enquanto a componente de f_c está presente somente em estágios iniciais da via auditiva (uma vez que neurônios não disparam a 10kHz). O segundo canal registra o LFP por meio de um eletrodo monopolar ativo no CI (fios entrelaçados de aço 0,005", revestido por TeflonTM, alcançando uma espessura final de 0,007", #7915, A-M Systems) e referência no osso nasal.

Na aquisição, ambos os sinais são filtrados na banda de 1 – 2000 Hz e amplificados 10.000x por um condicionador analógico de sinais (Axon Instruments, Cyberamp 320). Após o processamento analógico, os sinais foram digitalizados a uma taxa de amostragem de 20.000Hz (National Instruments®, NI-DAQ 6023E) e visualizados pelo software Kananda®. Os protocolos também foram registrados em vídeo (TVnPC P6), para comparação entre características eletrofisiológicas e comportamento.

Os valores exatos de f_m foram escolhidos considerando o fato de alguns métodos de análise tempo-frequência necessitarem da segmentação do sinal em janelas com número de amostras igual a potências de 2. É desejável que a componente senoidal dentro de uma janela possua um número inteiro de ciclos, de modo a

diminuir os efeitos do “Vazamento Espectral”. Quando isto ocorre, um sinal composto por um som puro pode ter um espectro onde os coeficientes são espalhados ao redor da frequência central da senóide, ao invés de serem concentrados apenas nesta frequência. Assim, para garantir um número inteiro de oscilações (L) de uma senóide com f_m , em uma janela com N amostras e frequência de amostragem F_s , temos (JIANGTAO XI; CHICHARO, 1996):

$$\frac{F_s}{f_m} = \frac{N}{L} \quad (1)$$

Com $F_s = 20000$ e N é potência de 2 (2^{15} inicialmente), precisamos definir dois valores para f_m (um ao redor de 53 Hz, outro ao redor de 92 Hz) que resultem em L inteiro. 53,7109 e 92,7734 são valores que satisfazem a esta condição com grau de precisão satisfatória, pois com $N = 2^{15}$ temos $L = 87,999$ e $L = 151,999$, respectivamente.

2.3.Extração de Características e Classificação

Características foram extraídas de cada trecho do sinal, associando atributos a cada um, como PLV e potências das bandas. Trechos são separados em *trials*, que são os períodos de 30s com apresentação do som AM, e períodos sem som, definidos como trechos *basais*. Os *trials* de $f_m = 53,71$ e $f_m = 92,77$ são analisados separadamente. As características extraídas são usadas para avaliação de hipóteses; excitabilidade perante estímulo (I), sincronismo da ASSR com a componente moduladora do som (II), e classificação (III). Subconjuntos de amostras e atributos são selecionados de acordo com a hipótese a ser avaliada (a hipótese II utiliza somente o PLV de *trials*, por exemplo) ou problema de classificação.

Os scripts utilizados neste e no próximo capítulo foram desenvolvidos em MATLAB (R2013b). Parte das análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 6.

2.3.1. Potência das bandas e ASSR

Um dos modos de quantificar excitabilidade neural é através do cálculo da potência de bandas de frequência específicas. Estas podem estar na faixa de frequência da ASSR, ou em ritmos oscilatórios onde a estimulação sonora influencia indiretamente. Em geral, a potência de uma banda pode ser obtida por meio de análises espectrais como a Transformada de Fourier e suas variantes. Como os registros de EEG/LFP deste trabalho são relativamente longos e marcados por não-estacionariedade e oscilações transitórias, foi utilizada a Transformada de Fourier de Tempo Curto (STFT).

2.3.1.1. Potência Espectral por STFT

A Transformada Rápida de Fourier (FFT – Fast Fourier Transform) é um dos algoritmos mais tradicionais para análise espectral de sinais. Porém, seu uso em sinais de LFP e EEG deve levar em conta fatores como a baixa resolução temporal e suposição de estacionariedade deste método. Além disso, é de interesse a quantificação da evolução de diferentes componentes de frequência ao longo do tempo. A Transformada de Fourier de Tempo Curto (STFT – Short Time Fourier Transform) é uma adaptação da Transformada de Fourier que lida com essas limitações, por meio da segmentação e janelamento do sinal.

Na Transformada de Fourier, temos a decomposição do sinal como uma soma ponderada de senos e cossenos:

$$\frac{1}{2\pi} x(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} X(\omega) e^{j\omega t} d\omega \stackrel{\mathcal{F}}{\Leftrightarrow} X(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{-j\omega t} dt \quad (2)$$

Quando multiplicamos o sinal por uma janela de suporte compacto deslizante no tempo e aplicamos a Transformada de Fourier em cada segmento, temos a STFT:

$$X(\omega, \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} [x(t)w(t - \tau)] e^{-j\omega t} dt = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t, \tau) e^{-j\omega t} dt \quad (3)$$

Sob outra perspectiva, podemos ver a STFT como o produto interno entre o sinal e um conjunto de funções de oscilação de suporte compacto – átomos.

$$X(\omega, \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t)[w(t - \tau)e^{-j\omega t}]dt = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t, \tau)e^{-j\omega t}dt \quad (4)$$

Um importante parâmetro da STFT é o tamanho da janela utilizada. Isto influencia diretamente o número de pontos da transformada nos eixos de tempo e frequência. Para uma mesma frequência de amostragem F_s , quanto maior o número de amostras da janela, maior a resolução na frequência (pois esta conterá maior número de oscilações) e menor a resolução no tempo, sobretudo para frequências menores. Já em janelas menores, são bem definidos os instantes em que uma oscilação tem início (maior resolução temporal), porém a janela irá conter menor número de oscilações, podendo resultar em menor resolução espectral. Logo, a escolha de uma janela ideal é uma relação de custo-benefício entre resoluções temporais e de frequência, que irá depender de características do sinal e objetivo da aplicação. Nesta seção, utilizamos janelas com 32768 (2^{15}) amostras, equivalendo a 1,63 segundos com $F_s = 20kHz$. A magnitude dos coeficientes calculados pela STFT de um registro é representada por um espectrograma, mostrado na Figura 5.

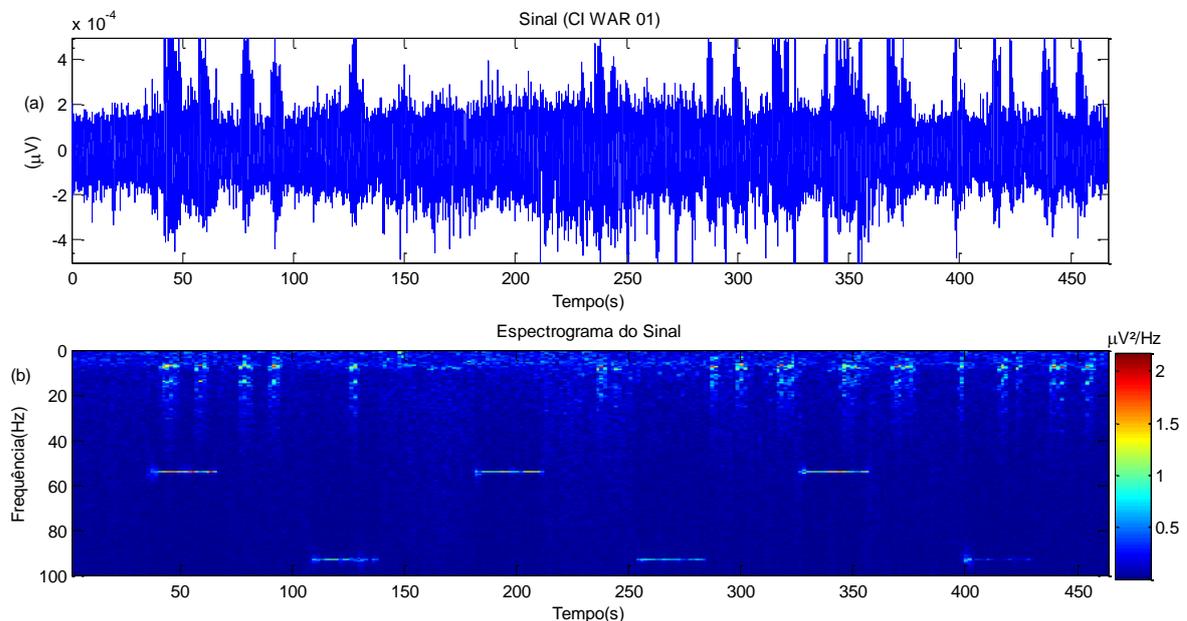


Figura 5: Exemplo de um sinal (CI do WAR02) e seu respectivo espectrograma– (a) e (b), respectivamente. São representadas as dinâmicas de diferentes componentes de frequência ao longo do tempo. A ASSR de cada *trial* é evidente, com componentes em 53,71Hz ou 92,77Hz.

Na análise de sinais de EEG, motivadas pela hipótese que redes neurais ao longo do cérebro se comunicam através do mesmo conjunto de códigos de frequência

por meio de oscilações (BAŞAR, 2013), é comum a divisão de bandas de frequência específicas. Neste trabalho, as bandas foram definidas de acordo com (BUZSÁKI; WATSON, 2012) e ajustadas de acordo com os valores de frequência de cada *bin* da STFT obtida com janelas de 2^{15} amostras;

- *delta* (1.2 – 3.7Hz)
- *theta* (4.2 – 9.8Hz)
- *alpha* (10.3 – 15.8Hz)
- *beta* (17.0 – 30.0Hz)
- *gamma* (31.1 – 100Hz)

Para a ASSR, uma assinatura eletrográfica na forma de oscilações é presente na componente moduladora f_m , de modo que o sinal também é analisado de $f_m - \frac{ASSR_{BW}}{2}$ até $f_m + \frac{ASSR_{BW}}{2}$, onde $ASSR_{BW}$ é a largura de banda ASSR. A escolha deste valor depende da aplicação; para características relativas à modulação em amplitude e dinâmica da ASSR, valores maiores são desejáveis, por exemplo. Nesta seção, como é de interesse a potência da banda da ASSR, refletindo o grau de excitabilidade neural, e não variações de amplitudes decorrentes de processos de modulação, definimos $ASSR_{BW} = 0.6Hz$.

Para o cálculo de potência de cada banda (*delta*, *theta*, *alpha*, *beta*, *gamma* e ASSR), a STFT de cada trecho de interesse é calculada, e os coeficientes de cada faixa de frequência de interesse são somados (resultando num vetor que representa a energia de determinada banda ao longo do tempo). No caso da banda *gamma*, os coeficientes ao redor da frequência da ASSR são eliminados ($53,71$ ou $92,77 \pm 5Hz$). É calculada então a média de energia de cada vetor (de energia de banda ao longo do tempo), resultando em 6 valores de potência por STFT, um para cada banda de frequência. Isto é feito de modo que cada trecho de interesse (*trials* com som, ou sem som) seja uma amostra, com 6 atributos de potência. Caso determinado trecho possua partes com artefatos consideráveis, seus atributos serão obtidos pela média dos valores calculados de seus segmentos válidos (sem ruído). Como é analisada a resposta perante um estímulo, é de interesse a normalização destes valores pelos respectivos valores basais de cada animal, para compensar eventuais diferenças do LFP medido de

diferentes animais. Os valores basais são obtidos pelas médias dos valores calculados para os trechos sem som. Assim, são extraídos 12 amostras de cada registro, das quais 6 correspondem a trechos **com som** (3 *trials* de 53,71Hz e 3 *trials* de 92,77Hz) e 6 trechos **sem som**, e cada uma possui 6 atributos de potência (*delta, theta, alpha, beta, gamma e ASSR*). Estes podem ser ou não normalizados pelos respectivos valores basais, de acordo com a análise necessária. O subconjunto de amostras e as respectivas características a serem comparadas também irão depender do propósito da análise em questão. De forma geral, serão comparados:

- Trechos sem som WAR x Trechos sem som Wistar
- Trechos com som (normalizados) WAR x Trechos com som (normalizados) Wistar
- Trechos sem som WAR/Wistar x Trechos com som WAR/Wistar

2.3.2. Transformada de Hilbert

Características como a fase e amplitude de um sinal de banda limitada podem ser obtidas por meio da representação analítica do sinal $s(t)$, proposta por (GABOR, 1946), definida por:

$$\zeta(t) = s(t) + is_H(t) = A(t)e^{i\phi(t)} \quad (5)$$

Onde $s_H(t)$ é a Transformada de Hilbert de $s(t)$,

$$s_H(t) = \frac{1}{\pi} P.V \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{s(\tau)}{t - \tau} d\tau \quad (6)$$

E P.V é o valor principal de Cauchy. A amplitude instantânea do sinal é dada por $A(t)$, e a fase instantânea por $\phi(t)$.

A transformada de Hilbert pode ser vista como uma defasagem de $-\frac{\pi}{2}$ na fase de cada componente espectral de $s(t)$. Assim, o sinal analítico é análogo à representação de um oscilador harmônico $s(t) = B\cos(\omega t)$, representado na forma complexa por $B\cos(\omega t) + iB\sin(\omega t)$. Como exemplo, temos um sinal $s(t)$ composto por uma senóide de 53,71Hz modulado em amplitude por 6Hz, $s(t) = \frac{\pi}{2}(1 + \sin(2\pi 6t)) * \sin(2\pi 53,71t)$, e a respectiva Transformada de Hilbert $s_H(t)$:

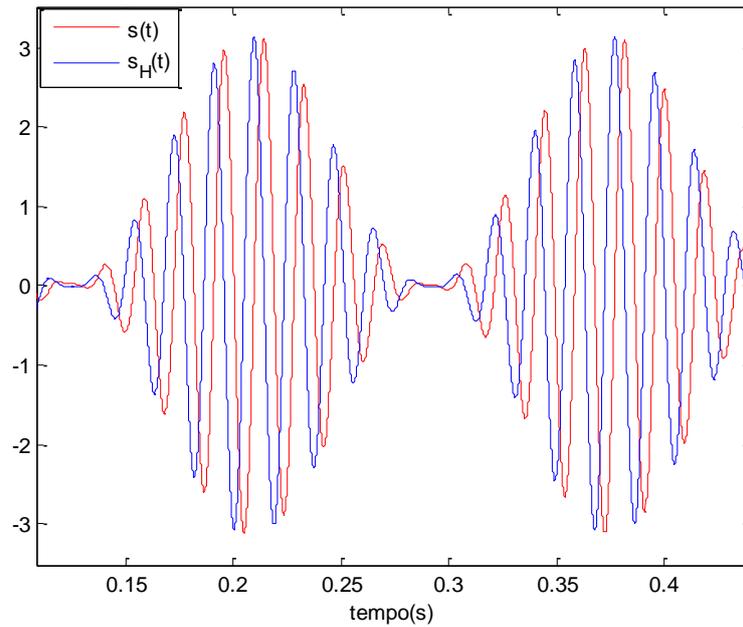


Figura 6: Sinal AM $s(t)$ e respectiva Transformada de Hilbert, $s_H(t)$. É notável o defasamento ($\pi/2$) de $s_H(t)$ em relação à $s(t)$. Ou seja, quando $s(t)$ atinge um pico ou um vale, $s_H(t) = 0$, e vice-versa.

$A(t)$ pode ser representado por $A(t) = \sqrt{s^2(t) + s_H^2(t)}$ e $\phi(t) = \text{atan}(s_H(t)/s(t))$, equivalendo ao raio e ângulo em uma representação polar, respectivamente - $A(t)e^{i\phi(t)}$. Assim, representando $s(t)$ com $A(t)$ e $\phi(t)$, e a respectiva representação polar, temos a Figura 7.

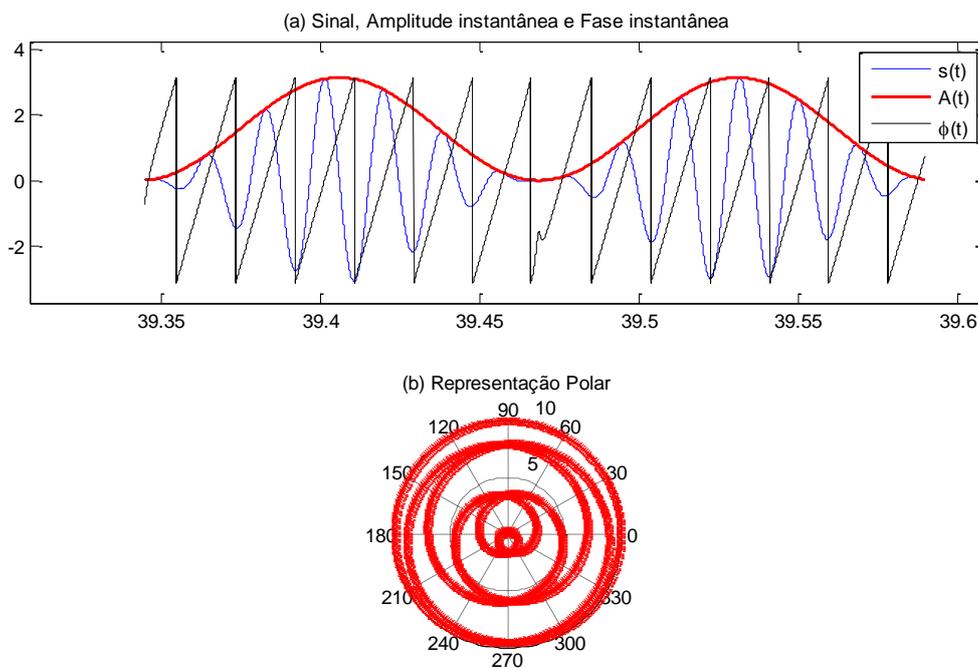


Figura 7: Representação do sinal AM $s(t)$ e respectivas séries de amplitude $A(t)$ e fase $\phi(t)$ instantâneas, em (a). Em (b), é mostrado a trajetória deste trecho, em uma representação polar.

A transformada de Hilbert é uma ferramenta útil para análises envolvendo diferentes tipos de acoplamento entre sinais. Por exemplo, séries de fase instantânea podem ser utilizadas para quantificação do sincronismo de fase entre dois canais, por meio do índice de Phase Locking Value (PLV), apresentado a seguir.

2.3.3. Phase Locking Value

Para avaliação de hipóteses envolvendo sincronismo e extração de atributos para classificação, é necessário um método de quantificação do grau de acoplamento entre estímulo e resposta. Para tal, foi utilizado o índice de PLV (Phase Locking Value) (TASS et al., 1998; LACHAUX; RODRIGUEZ, 1999; KREUZ et al., 2007). Ao contrário de métodos tradicionais como coerência espectral, o cálculo do PLV separa os componentes de fase e de amplitude do sinal, podendo ser diretamente interpretado no âmbito da integração neuronal (LACHAUX; RODRIGUEZ, 1999). Neste trabalho, o PLV é calculado entre a componente f_m do som (canal 1) e a ASSR (canal 2) dos trechos de interesse. A extração deste índice é feita de acordo com os passos a seguir.

Primeiramente, os dois sinais/canais são filtrados (f_m) com um filtro FIR com frequências de corte ao redor da ASSR ($53,71/92,77 \pm 5Hz$) e ordem igual a 3 comprimentos de onda da banda de corte inferior. O filtro é aplicado em direções opostas para eliminar distorções de fase (*zero phase filtering*). Por meio da Transformada de Hilbert, são calculadas as séries de fase instantânea ($\phi_1(t)$ e $\phi_2(t)$) de cada sinal filtrado, que após serem “desenroladas” (*unwrapped*) e subtraídas entre si, resultam na série de fase relativa $\phi_{1,2}(t) = \phi_{1_{unwr}}(t) - \phi_{2_{unwr}}(t)$. De $\phi_{1,2}(t)$, calculamos a fase cíclica relativa $\psi_{1,2}(t)$, limitada em $[0 2\pi]$:

$$\psi_{1,2}(t) = \phi_{1,2}(t) \bmod(2\pi) \quad (7)$$

Além da transformada de Hilbert, as séries de fase de cada sinal podem ser extraídas por Wavelets (LACHAUX; RODRIGUEZ, 1999). O desempenho de ambos os métodos é avaliado como semelhante em (LE VAN QUYEN et al., 2001), mas em (KREUZ et al., 2007), a fase por Hilbert resulta em desempenhos ligeiramente superiores. Na Figura 8, são mostrados dois sinais (som e de um eletrodo no CI de um

Wistar) e suas respectivas séries de fase, além da fase relativa cíclica resultante $\psi_{1,2}(t)$.

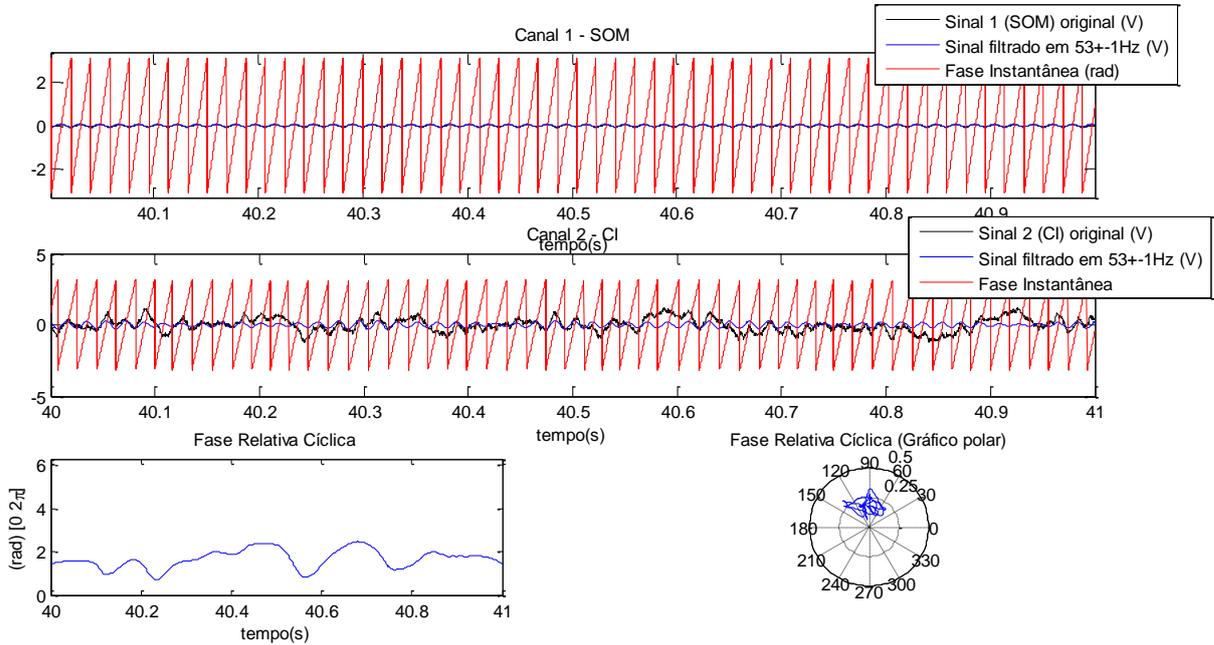


Figura 8: Fase Relativa de dois sinais. (a) Sinal de estímulo (azul) e respectiva série de Fase instantânea em vermelho (b) Sinal de EEG (CI) original, sinal filtrado e respectiva série de Fase instantânea (c) Fase Relativa cíclica, mostrando o acoplamento relativo entre as componentes (d) Representação polar da fase relativa. Caso não houvesse acoplamento, a distribuição dos valores seria próxima do uniforme ao longo do círculo polar.

Com $\psi_{1,2}(t)$, é possível analisar o grau de acoplamento (inversamente relacionado à dispersão dos valores de fase) por:

$$PLV_{raw} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N e^{i\psi_{1,2}(t_j)} = 1 - VC \quad (8)$$

Onde N é o número total de amostras de $\psi_{1,2}(t)$. Este índice é relacionado com a variância circular (VC) da distribuição da fase relativa cíclica. Outras medidas desta dispersão incluem entropia de Shannon e probabilidade condicional da distribuição de $\psi_{1,2}$ (TASS et al., 1998).

Para evitar índices de acoplamento espúrios devido a ruído e distribuições de fase individuais não-uniformes, é comum a utilização de índices validados estatisticamente por meio de séries substitutas (*surrogates*). Estas são geradas ao “embaralhar” uma das séries de fase, preservando as características de sua distribuição, mas destruindo sua relação temporal com a outra série. Assim, vários índices substitutos são obtidos “embaralhando” uma série de fase ϕ_1 e calculando o

respectivo índice PLV_{surr} a cada iteração. O índice normalizado de PLV é então calculado (KREUZ et al., 2007):

$$PLV_{norm} = \begin{cases} 0, & \text{se } PLV_{raw} < \overline{PLV_{surr}} \\ \frac{PLV_{raw} - \overline{PLV_{surr}}}{1 - \overline{PLV_{surr}}} & \end{cases} \quad (9)$$

Onde $\overline{PLV_{surr}}$ é a média dos valores substitutos de PLV. Os valores de PLV_{norm} são limitados de 0 (ausência de acoplamento) até 1 (fases totalmente acopladas).

Neste trabalho, ao invés da permutação e análise de distribuição da fase relativa entre *trials*, como ocorre em (LACHAUX; RODRIGUEZ, 1999), os valores de PLV são obtidos de acordo com a distribuição de fase ao longo do tempo em cada *trial*, e séries substitutas são geradas permutando a ordem das amostras de cada sinal individual, de modo semelhante ao empregado em (TASS et al., 1998) e (KREUZ et al., 2007). Esta metodologia foi preferida pelo fato da 1ª opção necessitar de um grande número de *trials*, além da suposição de estacionariedade entre estes, o que não é o caso para os protocolos de ASSR aqui utilizados.

Antes da aplicação do método PLV, é importante definir a escala de tempo desejada para análise de sincronismo. Por exemplo, é possível que uma resposta esteja fortemente acoplada ao estímulo, mas com a lenta adição de atrasos ao longo do tempo. Neste caso, a fase relativa seria estável em trechos menores (alto PLV), mas sua “deriva” resultaria em menores valores de PLV se grandes trechos fossem selecionados. Para os propósitos deste trabalho, é de interesse a quantificação do sincronismo de fase entre estímulo e resposta em escalas menores, de modo que o valor de PLV de cada *trial* é dado pela média dos PLVs calculados em janelas deslizantes (de 2 segundos) de cada trecho com som.

2.4. Avaliando a Hipótese I

De modo a auxiliar na compreensão do modelo de CAs de animais WAR, foram propostas hipóteses a respeito do processamento auditivo no CI de animais propensos a CAs. A primeira hipótese (I) é relativa a estímulos sublimiares ao gatilhamento de CAs, propondo que este substrato em WARs é hiperexcitável. Isto não seria visível no

EEG basal destes animais, mas poderia ser evidenciada na ASSR evocada por um som modulado em amplitude.

Primeiramente, a potência normalizada da ASSR de cada *trial* é calculada e comparada entre os grupos WAR e Wistar. Estes valores são indicadores da excitabilidade perante estímulo (ou capacidade de resposta) de cada animal. Em seguida, são comparados os valores de potência sem normalização (ao redor de f_m e das bandas *delta*, *theta*, *alpha*, *beta*, *gamma*) de cada grupo, dos períodos sem som e com som. Assim, são avaliados três fatores; se a resposta evocada é realmente diferente do nível basal, se os valores basais são diferentes entre WAR e Wistar, e se os grupos são diferentes em relação à potência evocada pela ASSR. Os valores de potência são calculados por STFT (seção 2.3.1.1), considerando coeficientes ao redor de $f_m \pm 0.61$.

A segunda parte desta hipótese avalia os efeitos de estímulos auditivos (sons AM) em osciladores endógenos de animais WAR, ao invés de utilizar a ASSR como marcador. Assim, a potência normalizada de cada ritmo (*delta*, *theta*, *alpha*, *beta*, *gamma*) é calculada e comparada entre os grupos WAR e Wistar.

2.5. Avaliando a Hipótese II

Embora a análise envolvida na hipótese II possa ser estendida para a hipótese I, pois o sincronismo da ASSR com resposta pode ser interpretado como marcador de processamento sensorial, esta hipótese se trata de uma abordagem para investigar o sincronismo do substrato neural em questão. Espera-se que circuitos neurais do CI sejam propensos ao hipersincronismo, que seria um dos fatores envolvidos na ictogênese. Por meio da sondagem do sistema com estímulos acústicos AM de 85 dB, é possível analisar a capacidade de sincronismo destes circuitos com estímulos externos, por meio do cálculo do PLV entre ASSR e componente moduladora do som. Trechos com som são segmentados em janelas de 2 segundos, de modo que PLV de cada *trial* é dado pela média dos valores de PLV_{norm} de cada segmento do respectivo *trial*. Deste modo, o índice de acoplamento calculado não é afetado por “pulos” nem por atrasos incrementais da fase relativa. Apesar de estas dinâmicas serem potencialmente de

interesse em outras análises, esta hipótese envolve a capacidade da ASSR de “seguir” o estímulo, em níveis menores de escala temporal. Assim, a separação dos *trials* em segmentos para cálculo do PLV busca dar ênfase na quantificação entre o *jitter* entre estímulo e ASSR, e desconsiderar eventuais tendências lentas da fase relativa entre estas duas componentes. Os índices calculados são então comparados entre os grupos WAR e Wistar, refutando ou confirmando a hipótese proposta.

2.6. Avaliando a Hipótese III

Nas seções anteriores, foram mostrados diferentes métodos de extração de atributos que poderiam ser utilizados como entradas em classificadores para prever a qual classe pertence determinada amostra (trecho de EEG). Assim, a avaliação da hipótese III envolve testes de desempenho de classificadores utilizando diferentes características. O problema de classificação aqui abordado é feito considerando o protocolo de estimulação (de 85 dB) mostrado neste capítulo.

2.6.1. Classificadores

São consideradas duas classes possíveis; uma classe positiva (1), representando animais suscetíveis a crises (WAR), e uma classe negativa (2), de animais saudáveis ou controle (Wistar). Dois tipos de classificadores foram utilizados: *Bagging* aplicado a uma árvore de decisões, e uma Máquina de Vetores de Suporte (SVM) (CORTES; VAPNIK, 1995).

O método de *Bagging* (de *Bootstrap Aggregation*), proposto em (BREIMAN, 1996), consiste basicamente na obtenção de novas amostras, dado um único conjunto de amostras de treinamento, de modo a reduzir a variância e evitar a sobreparametrização do modelo. A árvore de decisões, por sua vez, prevê respostas para determinadas amostras, de acordo com regras de decisão. Estas regras vão desde a raiz (início) até nós terminais ou folhas, que contém a decisão sobre a classe pertencente à determinada amostra.

O método SVM possui fortes bases teóricas que resultam em certas garantias de desempenho. De modo geral, um classificador SVM define um hiperplano ótimo

para separação entre classes, por meio de um problema de otimização quadrática que busca maximizar a margem entre hiperplano e vetores de suporte, como mostrado no exemplo simples da Figura 9:

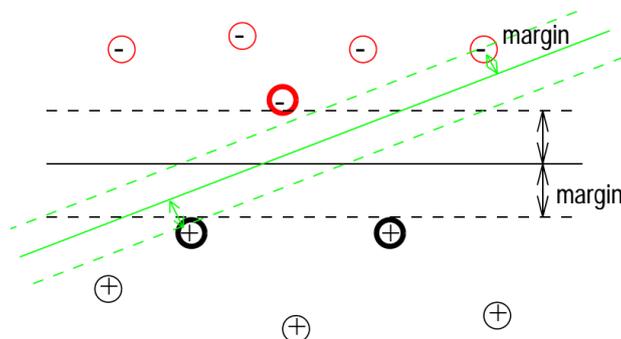


Figura 9: Exemplo simples mostrando a maximização da margem entre separador e vetores de suporte (amostras próximas da margem) (WATSON, 2011)

Neste trabalho, utilizamos um tipo de SVM cujo hiperplano é quadrático, definido por meio de um *kernel*. Para mais detalhes a respeito de métodos SVM, conferir em (CORTES; VAPNIK, 1995; BURGES, 1997)

Na avaliação dos classificadores foram feitas 100 iterações, utilizando validação cruzada por k -dobras ($k = 10$). Ou seja, o conjunto de dados de cada análise é dividido em k subconjuntos com o mesmo tamanho e mutualmente exclusivos. Um destes subconjuntos é utilizado como teste, avaliando exatidão (*Acc*), sensibilidade (*SE*) e especificidade (*SP*) do classificador treinado com os $k - 1$ subconjuntos restantes. Este processo é feito k vezes, variando o conjunto de teste escolhido, com o resultado final igual à média dos valores (de *Acc*, *SE* e *SP*) encontrados para cada iteração. Deste modo, a capacidade de generalização do classificador é melhor avaliada, e não somente sua capacidade de se ajustar aos dados (*overfitting*).

Foram feitos diferentes testes de desempenho, utilizando diferentes subconjuntos de características:

- a. Potência normalizada da ASSR (1 atributo)
- b. Potência normalizada da ASSR + PLV (2 atributos)
- c. Potência normalizada (*trial*) das bandas *delta-gamma* (5 atributos)
- d. PLV, Potências normalizadas de ASSR e bandas *delta-gamma* durante *trial* (7 atributos)
- e. Potência **basal** das bandas *delta-gamma* (5 atributos)

Nos testes (a) e (b), somente atributos relacionados com a resposta evocada foram utilizados, de modo a provar a eficiência do protocolo de estimulação sonora para identificação de indivíduos suscetíveis a crises. O teste (c) é feito de modo a simular o desempenho do classificador em casos onde a ASSR não estaria disponível (ou não seria tão evidente). No teste (d), são utilizados atributos diretamente relacionados à ASSR e a potência normalizadas das bandas *delta* até *gamma* (combinação de *b* e *c*). Por fim, no teste (e) é feita a classificação utilizando trechos sem apresentação do som, para esclarecer se a estimulação sonora realmente é necessária para classificação, ou se somente o EEG basal é suficiente para identificar animais propensos a crises. Outros atributos poderiam ser considerados (especialmente os relacionados com a ASSR), mas como veremos a seguir, somente a energia da ASSR é suficiente para total discriminação entre classes.

Assim como nas seções anteriores, os desempenhos são avaliados separadamente para os trials de $f_m = 53,71$ e $f_m = 92,77$.

2.7.Descarte de Segmentos

De modo a caracterizar e diferenciar diferentes indivíduos e amostras, nas análises quantitativas são extraídos atributos de cada trecho de 30s de estimulação (cada trecho = 1 trial). Como o número de animais é relativamente pequeno (8 de cada classe ou grupo) para avaliação de classificadores, mas cada animal possui 6 trials (3 para cada f_m), consideramos cada *trial* como uma amostra, com seus respectivos rótulos de classe (WAR ou Wistar) e atributos (Potência de bandas, PLV, etc). Para a extração destes atributos de forma confiável, é necessária a inspeção dos registros e trechos de cada *trial*, em busca de artefatos no sinal que poderiam influenciar os resultados.

Nos registros dos animais WAR, observou-se a presença de espículas de alta amplitude, inicialmente de origem desconhecida. Um registro de um animal WAR é mostrado na Figura 10, assim como seu respectivo espectrograma (STFT) e um trecho destacado de um episódio deste tipo.

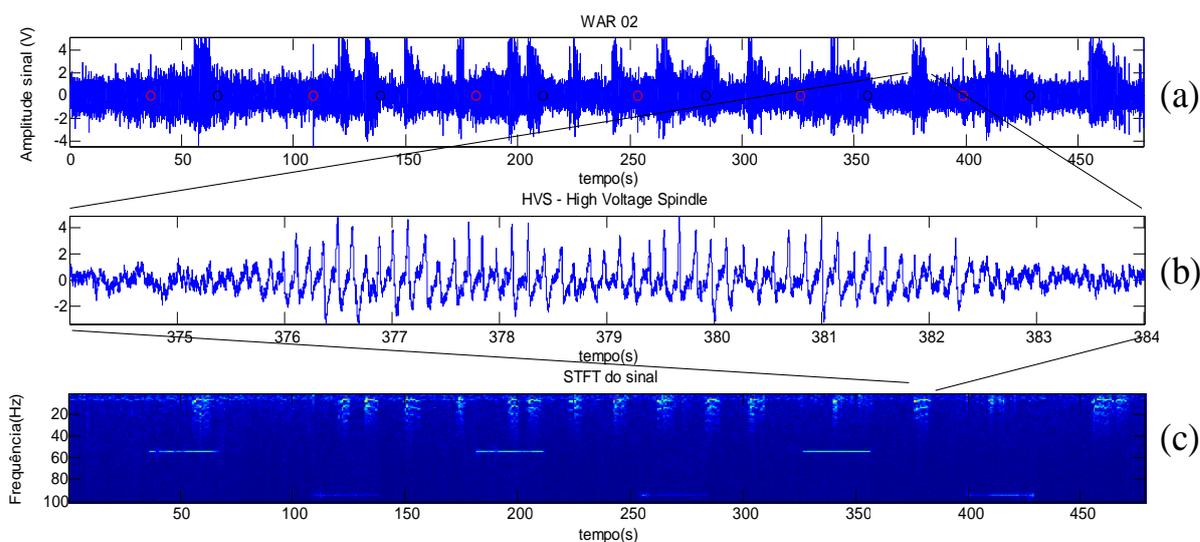


Figura 10: Exemplos de HVS no sinal. (a) Registro de um WAR (com amplificação de 10000x e seu respectivo espectrograma (c)). Trecho de fuso/HVS em destaque em (b).

A princípio, tais espículas foram interpretadas como artefatos de mastigação. Porém, além das formas de onda encontradas possuírem uma frequência característica ($\sim 7\text{Hz}$) levemente superior à frequência de mastigação de ratos encontrada na literatura ($\sim 5\text{Hz}$) (WESTNEAT; HAL, 1992), a inspeção do vídeo-EEG não evidenciou comportamentos deste tipo associado a estes eventos eletrográficos. Ademais, estes períodos eram caracterizados pela imobilidade momentânea dos animais. Considerando este padrão comportamental e características eletrográficas destes eventos, concluímos que estes seriam espículas correspondendo a Fusos de Alta Amplitude (HVS, ou *High Voltage Spindles*), presentes tanto em ratos saudáveis (BUZSAKI et al., 1988; BUZSÁKI et al., 1988), quanto em WARs (MORAES, 1998). Porém, no caso de WARs, a frequência de ocorrência destes eventos é significativamente maior, enquanto em Wistars a ocorrência de HVS estaria relacionada a transições de estado vigília-sono (SAKATA; YAMAMORI; SAKURAI, 2005), não sendo observados nos registros deste trabalho.

Apesar de estes episódios possuírem origem neural e investigações a respeito de suas causas e origem sejam válidas, isto está fora do escopo deste trabalho. Assim, os trechos com presença de HVS foram demarcados manualmente (analisando o sinal e seu espectrograma), e somente segmentos sem HVS, com duração mínima de 2 segundos, tiveram características extraídas. Para manter o número de amostras de

cada classe, é calculada a média dos valores encontrados de todos os segmentos válidos em cada *trial*. Ou seja, um *trial* com 3 segmentos válidos equivale a uma amostra, cujos atributos (Potência de cada banda, PLV, etc) são as respectivas médias calculadas ao longo dos 3 segmentos.

2.8. Resultados e Discussão

Os resultados são divididos de acordo com as hipóteses avaliadas, seguidas pelo problema de classificação. As análises foram feitas separando os trials de 53 Hz e os de 92 Hz, descartando os períodos com a presença de HVS ou artefatos nos registros WAR e Wistar. Assim, temos 192 amostras totais: 96 para cada classe (WAR ou WIS), das quais 48 são de trechos com silêncio e 48 são trechos com som (*trials*). Destes, cada metade corresponde aos *trials* ou de 53 Hz, ou de 92 Hz.

2.8.1. Hipótese I - Resultados

Um registro de cada grupo é mostrado na Figura 11, seguido pelos respectivos espectrogramas (tempo-frequência por STFT). Nestes, é evidente o aparecimento de componentes de frequência específicas durante os *trials*, nas respectivas frequências de modulação f_m , representando a ASSR.

Após o espectrograma, são mostradas as energias ao redor da banda ASSR ao longo do tempo, para $f_m = 53,71 \text{ Hz}$ (Figuras 11.g e 11.h) e $f_m = 92,77 \text{ Hz}$. Percebe-se que o registro do WAR possui maiores valores de energia de ASSR. Para avaliar estatisticamente a diferença entre WARs e Wistars, a potência normalizada de cada *trial* (trecho com som) de todos animais é calculada. As distribuições de cada grupo não foram rejeitadas por testes de normalidade (*Kolmogorov–Smirnov* e *Shapiro-Wilk*), sendo posteriormente comparadas entre si por *Teste T*, como mostrado pela Figura 12.

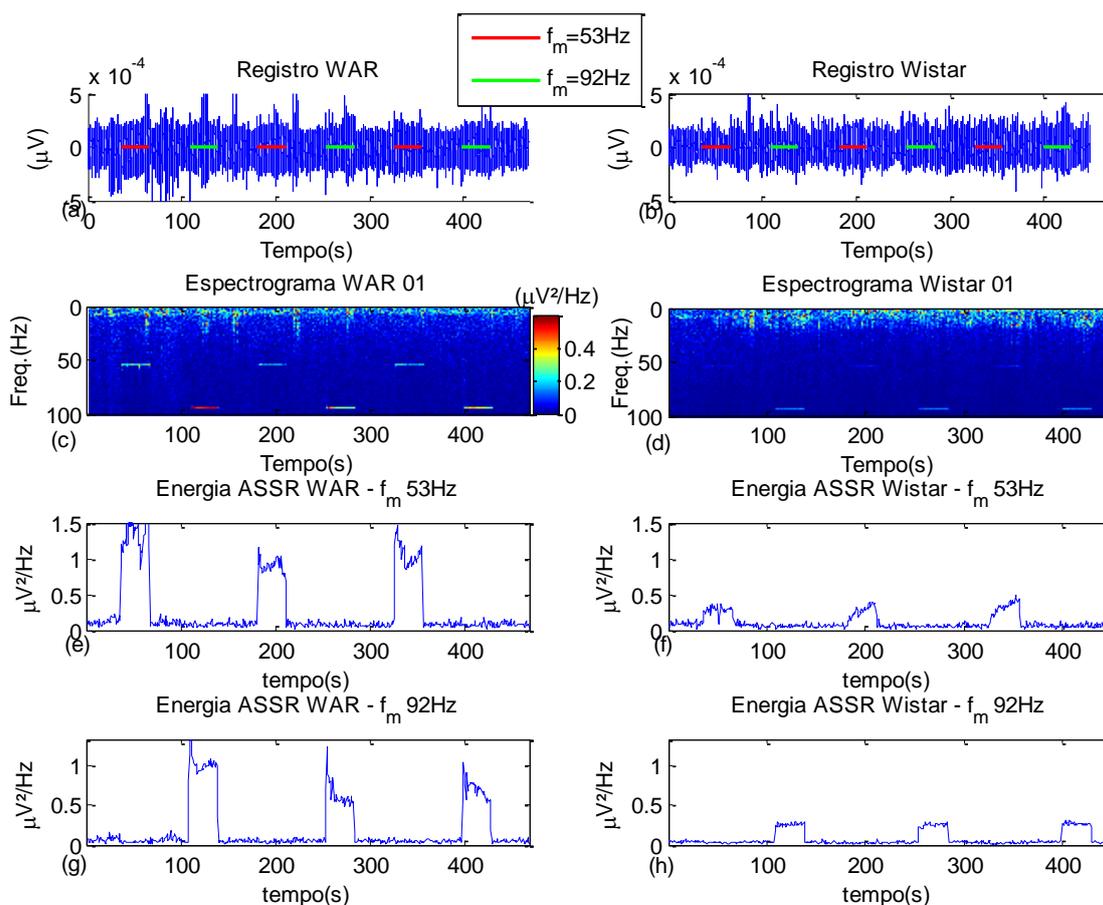


Figura 11: Espectrograma e ASSR de dois registros. Registros de um WAR (a) e Wistar (b), com os períodos de aplicação de estímulo sonoro marcados. (c) e (d) mostram o espectrograma de cada sinal (janela de 32768 amostras), representando a evolução da magnitude de diferentes componentes de frequência ao longo do tempo. É evidente a ASSR durante a aplicação do som. Abaixo, são mostradas as energias das respectivas ASSRs ao longo do tempo, por meio da soma dos coeficientes ao redor de f_m ; 53.01Hz até 54.32Hz para (e) e (f), e 92.12 até 93.37Hz para (g) e (h).

Independentemente do f_m utilizado, a amplitude da ASSR é significativamente maior em animais WAR, indicando que o CI destes animais é mais responsivo a estímulos auditivos. Ou seja, para estímulos de mesma intensidade, animais WAR, suscetíveis a CAs, respondem com maior amplitude relativa ao nível basal. Isto confirma parte da 1ª hipótese. Na Figura 13, é avaliado se a potência “pura” (sem normalização basal) ao redor da respectiva banda da ASSR ($f_m \pm 0.61$) é diferente somente durante períodos com estimulação (*trials*), ou também em trechos basais (sem som).

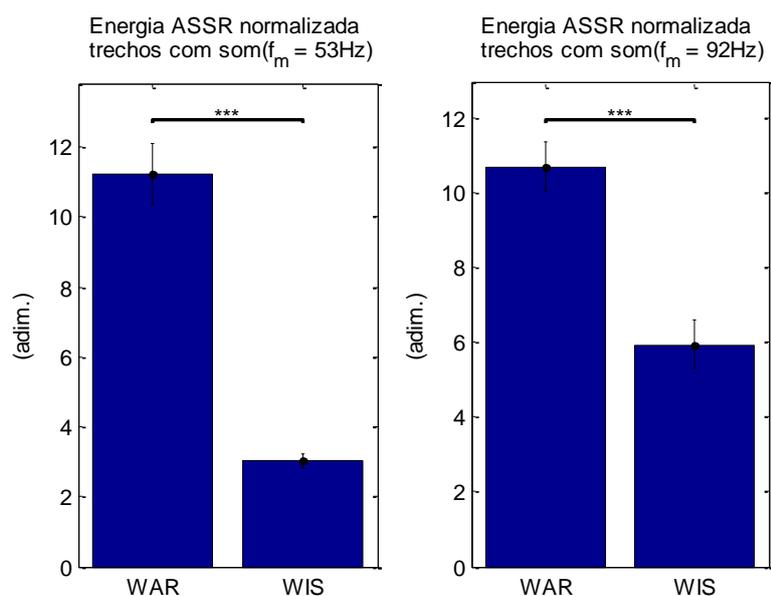


Figura 12: Potências ASSR normalizadas pelo basal, grupos WAR x Wistar. Em (a), $f_m = 53.71\text{Hz}$ e (b) $f_m = 92.77\text{Hz}$. Resultados mostrados como média + EPM. Diferenças significativas (teste T) encontradas em ambos os casos; *** $p < 0.001$.

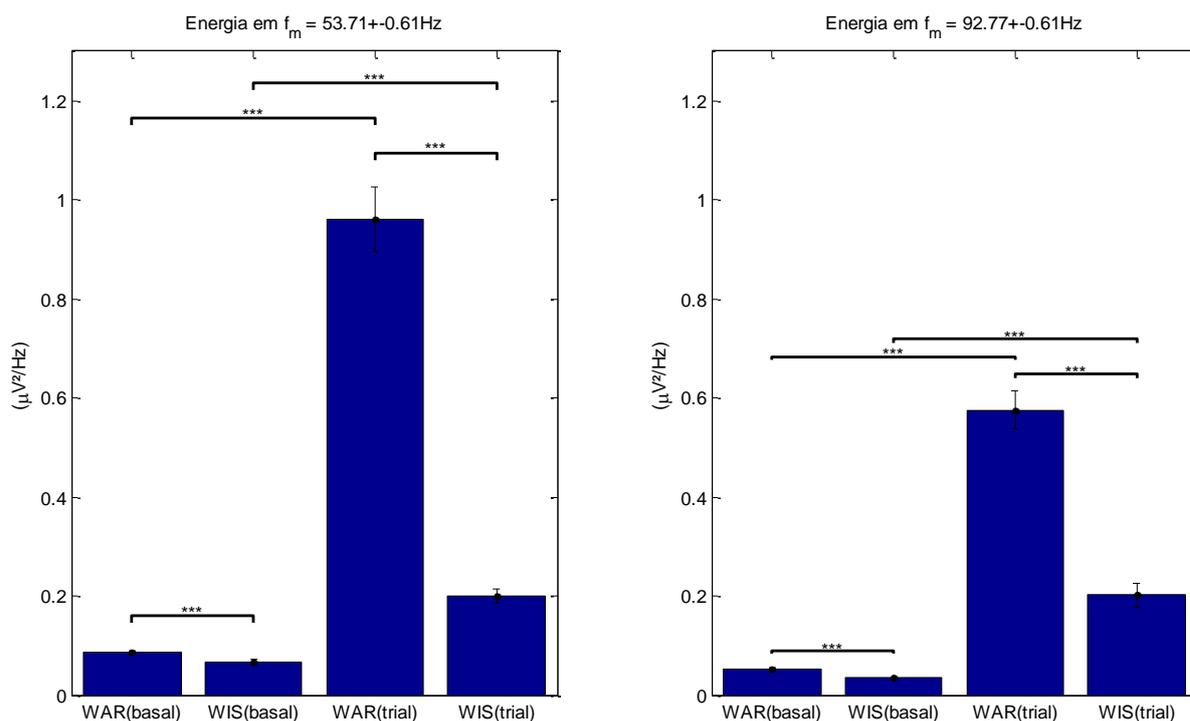


Figura 13: Potências ao redor da moduladora ($f_m \pm 0.61$), em trechos sem som (basal) e com som (trial), dos grupos WAR e Wistar. $f_m = 53.71\text{Hz}$, à esquerda, e $f_m = 92.77\text{Hz}$ à direita. Resultados mostrados como média + EPM. RM-Anova1 foi utilizado para comparar Basal x Trial, do respectivo grupo de animais. Para comparações entre Basal (WAR) e Basal (WIS), foi utilizado teste T. *** $p < 0.001$.

Na Figura 13, é evidente a diferença dos *trials* em relação ao basal do respectivo grupo, devido à ASSR evocada pelo som. Além disso, é confirmado que a potência da ASSR nos *trials* de animais WAR é maior que em animais Wistar. Porém, ao

contrário do proposto na hipótese, há uma diferença também nos níveis basais, onde WARs apresentam maior potência em $53,71 \pm 0.61$ e em $92,77 \pm 0.61$, frequências que estão inseridas na banda *gamma*. Comparando os níveis basais de diferentes ritmos (*delta* até *gamma*) entre WAR e Wistar por teste T, temos a Figura 14.

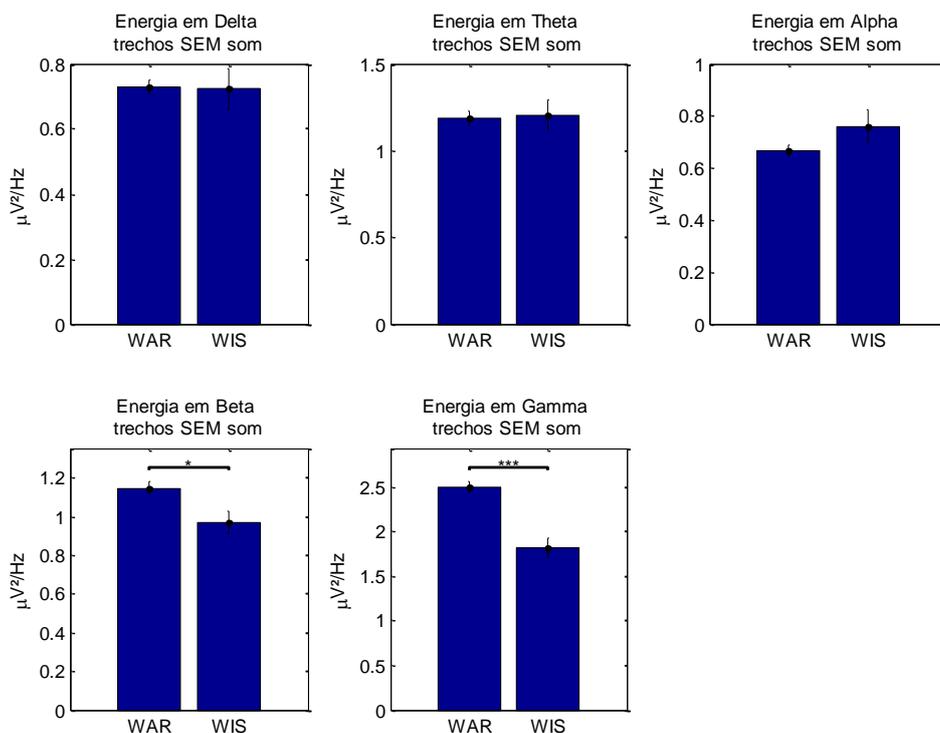


Figura 14: Potências dos ritmos *Delta*, *Theta*, *Alpha*, *Beta* e *Gamma*, em trechos sem som (definidos como atividade basal). Resultados mostrados como média + EPM.. Diferenças significativas são mostradas por asteriscos (teste T). * $p < 0.05$ * $p < 0.001$**

Estes resultados indicam que, mesmo em períodos sem estímulos sonoros, o EEG de WARs possui maior potência nas bandas *Gamma* e *Beta*. Assim, o EEG basal destes animais suscetíveis a CAs, além da presença de episódios de HVS (cujos trechos são excluídos destas análises), possui maior nível de atividade em circuitos neurais de alta frequência, comumente relacionados a dinâmicas locais (BUZSÁKI, 2006). Um fator que poderia ser relacionado com este resultado é a aparente maior resistência extracelular do mesencéfalo de animais WAR (MORAES, 1998), que facilitaria a sincronização entre neurônios vizinhos por meio de um mecanismo de transmissão efática (BUZSÁKI; ANASTASSIOU; KOCH, 2012). A geração de um fluxo de corrente iônica extracelular pela ativação de um neurônio poderia ser conduzida, cada vez mais, pelo meio intracelular de neurônios vizinhos, diminuindo seus potenciais de membranas. Isto seria um modo de aumentar excitabilidade destes neurônios e

promover o sincronismo entre seus disparos, que poderia ser um fator envolvido no aumento de atividade de circuitos locais, indicado pelo aumento nas potências em *Gamma* desta seção. Porém, os experimentos deste trabalho são insuficientes para avaliar tal hipótese. Para tal, seriam necessários registros multi-unitários, assim como a confirmação de que o mecanismo de transmissão efática é favorecido em certos substratos neurais de animais WAR.

Oscilações em *gamma* também podem estar relacionadas com armazenamento e recuperação de informações (LISMAN, 1999), mecanismos de inibição (BARTOS; VIDA; JONAS, 2007), ou servir como referência para codificação temporal (BUZSAKI; CHROBAK, 1995). Alterações neste ritmo também podem levar a distúrbios psiquiátricos como esquizofrenia (SPENCER et al., 2003). Porém, novamente os experimentos deste trabalho não são suficientes para avaliar a relação de possíveis mecanismos de oscilações *gamma* com a maior potência deste ritmo encontrada em WARs, e qual o papel disto na ictogênese e outras particularidades em animais desta linhagem.

Por fim, é avaliada a sub-hipótese que diz respeito à influencia de estímulos sonoros em osciladores endógenos do CI de animais WAR. Assim, potências normalizadas pelos respectivos níveis basais, das bandas *Delta* até *Gamma*, são calculadas para ambos os grupos, de modo a avaliar se a apresentação de estímulos altera os níveis basais de modo diferente em animais suscetíveis a CAs. Os resultados são mostrados na Figura 15.

Novamente, as bandas *Beta* e *Gamma* apresentam diferenças entre os grupos. Porém, agora que são considerados os trechos com som, e normalizando pelos respectivos valores basais, animais WAR apresentam menores valores. Ou seja, houve uma queda significativa em relação aos níveis basais de animais WAR, em relação a Wistars, nas duas bandas de frequências mencionadas. Isto confirma a subhipótese (ii), que o som produz efeitos em osciladores endógenos em WARs. Ademais, a queda nos valores normalizados em *Gamma* poderia ser decorrente do recrutamento de circuitos deste ritmo pela ASSR (uma vez que a resposta está inserida no ritmo *Gamma*), que poderia ser um dos fatores envolvidos na maior amplitude de resposta de WARs.

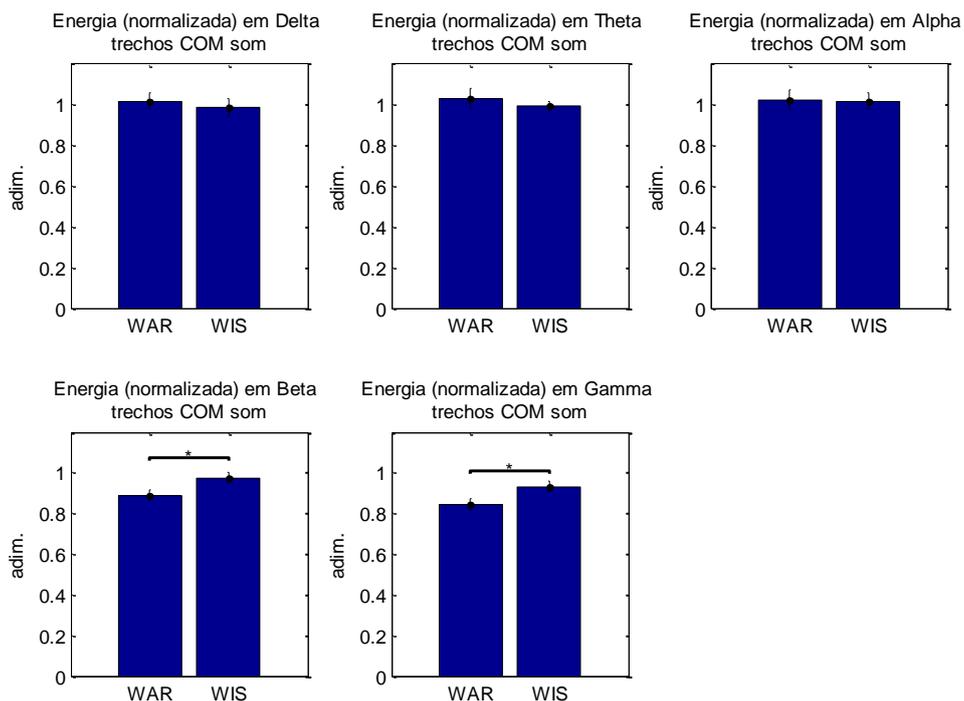


Figura 15: Potências normalizadas pelos respectivos níveis basais, das bandas *Delta*, *Theta*, *Alpha*, *Beta* e *Gamma*, durante trechos com som (*trials*). Resultados mostrados como média + EPM. Diferenças significativas são mostradas por asteriscos (teste T). * $p < 0.05$

2.8.2. Hipótese II: Sincronismo de fase

Na Figura 16, os índices de PLV ao longo do tempo são mostrados para dois registros, um de cada grupo.

Quando não há estímulo em 53,71 Hz, não há acoplamento entre os canais de som e do CI, confirmado pelos baixos valores de PLV. Durante os *trials* de 53 Hz, o acoplamento entre ASSR e estímulo auditivo é evidente pelo aumento do PLV. Neste caso, o animal WAR apresentou maior índice. Também é aparente que a presença de HVS em animais WAR não prejudica o sincronismo da ASSR com a resposta. Parte disso se deve ao fato que esses episódios de alta amplitude possuem componentes de frequência de no máximo 45Hz, não afetando a componente da ASSR.

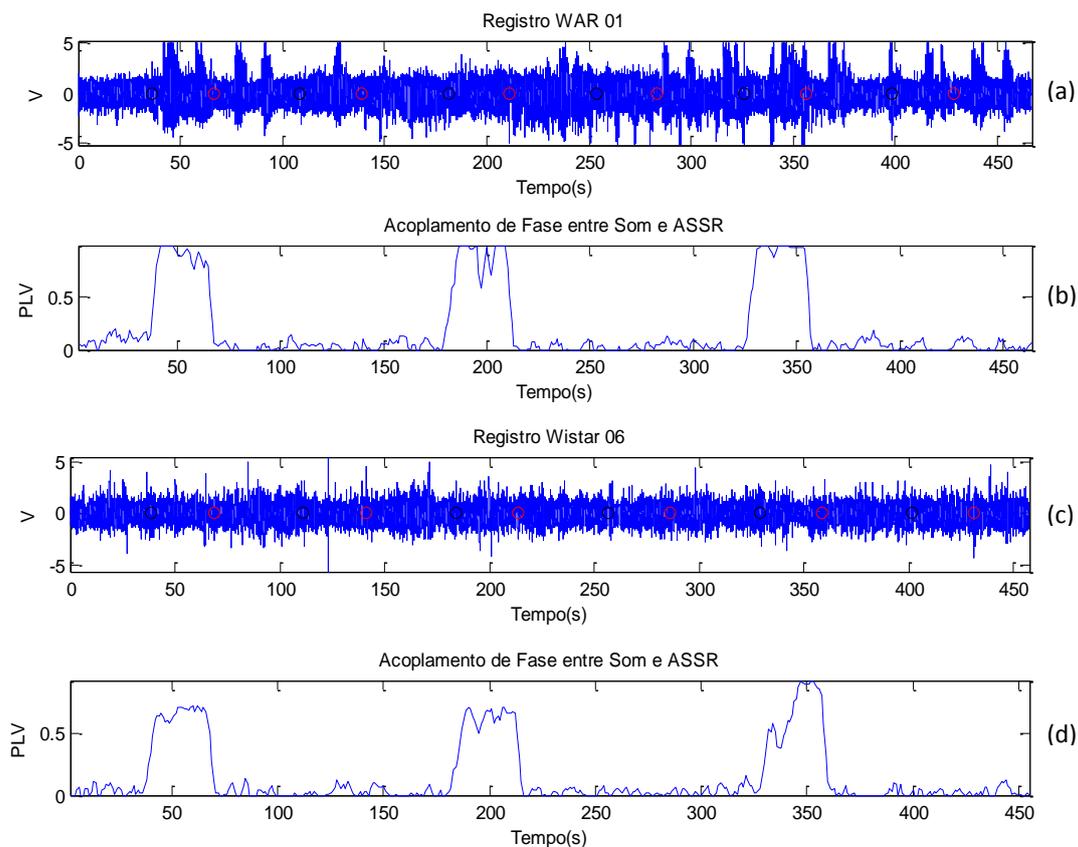


Figura 16: Registros e seus respectivos valores de PLV ao longo do tempo. Os índices PLV são calculados entre registro e som, na banda de $53.71 \pm 5\text{Hz}$ e em janelas deslizantes de 4 segundos, com 75% de overlap. (a) Registro de um WAR (com amplificação de 10.000 vezes) e em (b) seus respectivos valores de PLV ao longo do tempo. (c) Registro de um Wistar (com amplificação de 10.000 vezes) e PLV ao longo do tempo em (d). Durante os *trials* de 53 Hz (demarcados pelos círculos pretos e vermelhos), a ASSR é acoplada com o estímulo auditivo, resultando no aumento do PLV.

Considerando todos os registros e calculando a média dos valores de PLV em janelas deslizantes de 2 segundos, para todos *trials* (de 53 Hz e 92 Hz), temos a Figura 17. Como as distribuições dos índices de PLV de WARs não passaram nos testes de normalidade de *Kolmogorov–Smirnov* e *Shapiro-Wilk*, foi utilizado um teste não paramétrico para comparação entre os grupos (*Wilcoxon Rank Sum test*).

Animais WAR apresentaram maior índice de PLV que animais Wistar, em ambos os casos (53 Hz ou 92 Hz). Com $f_m = 92,77\text{Hz}$, a diferença entre WAR e Wistar é reduzida (em relação a 53 Hz), pois enquanto o PLV WAR está perto do valor máximo em ambos os casos, o PLV de animais WISTAR aumenta de $f_m = 53,71\text{Hz}$ para $f_m = 92,77\text{Hz}$. Isso é relacionado com parte dos resultados da Hipótese I, onde a potência normalizada da ASSR de animais Wistar dos *trials* de 92 Hz é maior que nos *trials* de 53 Hz. O aumento no PLV poderia ser decorrente tanto de uma melhor

relação sinal/ruído (causada pelo aumento do sinal), quanto de um efetivo aumento na capacidade de acoplamento com um estímulo externo.

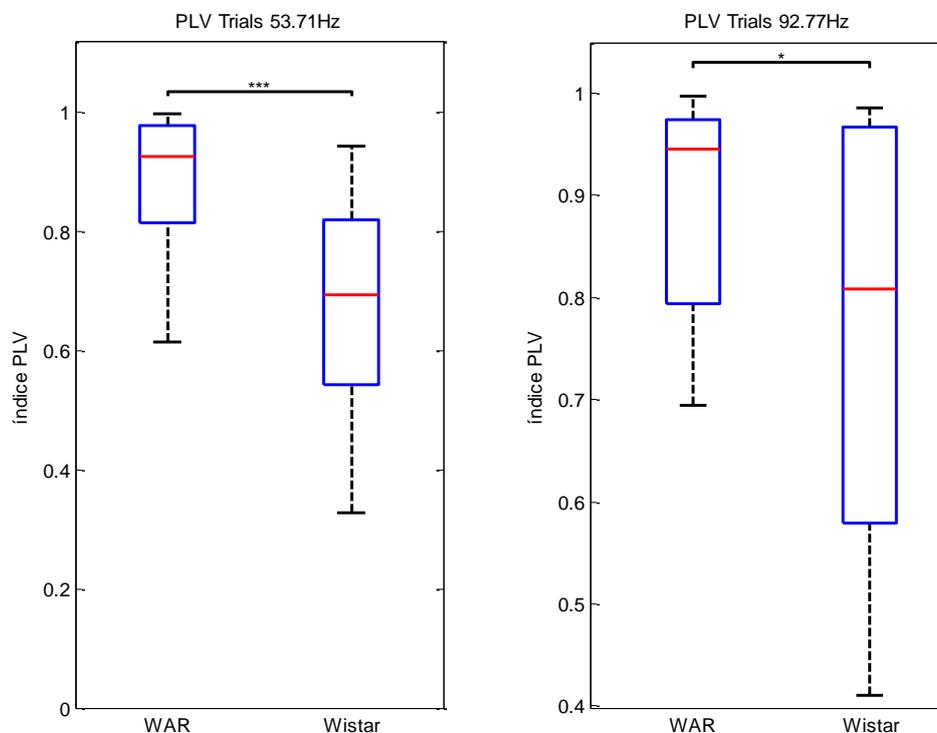


Figura 17: PLV, protocolo de 85 dB. Índices PLV de cada grupo (WAR ou WIS), nos trials de 53 Hz (à esquerda) e 92 Hz (à direita). Resultados mostrados como boxplots; mediana em vermelho, e os limites da caixa são os percentis de 50% e 75%. Diferenças significativas (*Wilcoxon Rank Sum*) encontradas em ambos os casos; * $p < 0.05$, * $p < 0.001$.**

Um fator que poderia invalidar as conclusões desta análise seria que as diferenças de PLV observadas poderiam ser decorrentes apenas de diferenças na relação sinal/ruído, causadas pelo aumento de ruído nos sinais do grupo controle. Ou seja, o PLV de animais WAR poderia ser maior não porque a ASSR está acoplada com o som, mas devido a uma melhor relação sinal/ruído decorrente de uma menor atividade aleatória em *Gamma* (ao redor de f_m). Porém, os resultados na Figura 14 mostram que a potência basal em *Gamma* e ao redor de f_m de animais é maior. Além disso, a ordem de amplitude da ASSR em relação aos níveis basais é alta, de tal modo que diferenças significativas no PLV decorrentes de ligeiros aumentos na atividade basal seriam improváveis.

Assim, as diferenças encontradas entre os grupos validam a hipótese proposta, que circuitos neurais do CI de animais WAR sincronizam mais facilmente com estímulos externos. Isto estaria relacionado com a propensão destes animais a CAs,

onde o hipersincronismo circuitos neurais locais e distantes estaria envolvido na ictogênese. Porém, o protocolo experimental utilizado é limitado quanto a estas e outras questões de interesse; este sincronismo elevado é constante ao longo da via auditiva? Outros circuitos neurais se acoplam de modo anormal com este estímulo? Como é a dinâmica do acoplamento da ASSR com o estímulo, na iminência e durante uma CA? Esta última pergunta será tratada no próximo capítulo.

2.9.Hipótese III - Classificação

O desempenho dos classificadores é avaliado por três índices: Exatidão (Acc), Sensibilidade (SE) e Especificidade (SP). A Exatidão é a taxa de acertos dos dados de teste (após o treinamento). A porcentagem de WARs (definida como classe positiva) que é corretamente classificada é dada pela Sensibilidade, ou verdadeiros positivos (VP). Já a Especificidade é a taxa de Wistars (classe negativa) que é corretamente classificada (Verdadeiro Negativo - VN).

Os parâmetros dos classificadores (bagging e SVM) foram os mesmos para todos os testes da Tabela 1. Melhores desempenhos seriam possíveis com o ajuste de parâmetros em cada caso. Porém, visto que o número de amostras é relativamente pequeno, tais melhoras poderiam ser decorrentes de *overfitting*, de modo que se optou pela padronização das configurações dos classificadores. Além disso, o objetivo central desta seção não é somente a obtenção dos melhores valores de exatidão, mas a avaliação do poder preditivo da ASSR e comparação de desempenho dos diferentes subconjuntos.

Diferentes testes de desempenho foram feitos, variando os conjuntos de atributos utilizados como entradas de dois classificadores (SVM e Bagging). A Tabela 1 mostra o desempenho dos diversos testes, separados pelos respectivos *trials* (de 53 Hz ou 92 Hz, ou períodos basais), tipo de classificador (SVM ou Bagging) e atributos utilizados.

Tabela 1: Resultados de Classificação – Desempenho de diferentes classificadores (SVM e bagging), em *trials* (de 53 Hz ou 92 Hz) e trechos sem som, utilizando os atributos; PLV entre ASSR e estímulo, potência da ASSR e das bandas delta até gamma. Diferentes subconjuntos são testados; todos 7 atributos (7), somente potência da ASSR (1), potência ASSR + PLV (2), potências normalizadas de delta/theta/alpha/beta/gamma, em *trials* (5), potências de trechos sem som, das 5 bandas (5)

<i>Trecho</i>	Atributos	Classificador	Acc(%)	SE(%)	SP(%)	
Trials 53 Hz	7	SVM	88,8%	88,0%	89,6%	
		Bag	96,1%	96,2%	95,9%	
	1	SVM	95,6%	91,2%	100,0%	
		Bag	96,1%	96,0%	96,2%	
	2	SVM	95,0%	90,0%	100,0%	
		Bag	96,4%	96,3%	96,5%	
	5	SVM	73,7%	72,7%	74,8%	
		Bag	68,7%	73,2%	64,1%	
	Trials 92 Hz	7	SVM	85,6%	84,4%	86,8%
			Bag	86,8%	85,6%	88,0%
1		SVM	76,2%	83,3%	69,0%	
		Bag	80,4%	75,3%	85,5%	
2		SVM	81,7%	88,5%	75,0%	
		Bag	81,7%	78,5%	84,8%	
5		SVM	67,7%	66,2%	69,3%	
		Bag	75,3%	72,4%	78,2%	
BASAL		5	SVM	77,4%	80,9%	73,9%
			Bag	77,3%	77,7%	76,9%

Nos testes de *trials*, os seguintes atributos são utilizados:

- 7 Atributos: PLV, Potências normalizadas de ASSR e bandas *delta-gamma* durante *trial*.
- 1 Atributo: Potência normalizada da ASSR.
- 2 Atributos: Potência normalizada da ASSR + PLV
- 5 Atributos: Potência normalizada das bandas *delta-gamma*

Nos trechos basais, são utilizados os atributos de potência (sem normalização) das 5 bandas (*delta-gamma*).

Nos trials de 53 Hz, somente o cálculo da potência normalizada da ASSR é suficiente para prever corretamente cerca de 96% das amostras, mostrando seu alto poder preditivo. Neste caso, o uso de mais atributos (PLV ou potência de *delta-gamma*) é desaconselhável, pois estes podem ser redundantes ou inclusive piorarem o desempenho. Já nos trials de 92 Hz, o poder preditivo da potência da ASSR é significativamente diminuído, classificando cerca de 76 – 80% das amostras corretamente. Neste caso, o uso de mais atributos é interessante para a melhora de desempenho (~80% com adição de PLV, e ~85% com adição de PLV + potências *delta-gamma*). A piora na capacidade de discriminação da ASSR nos trials de 92 Hz pode ser explicada pelas Figuras 12 e 13. Enquanto nos dois grupos (WAR e WIS) há uma queda na potência basal na banda de $92,77 \pm 0.6\text{Hz}$ em relação a $53,71 \pm 0.6\text{Hz}$ (esperado, pois o espectro de sinais de EEG segue uma distribuição $1/f$ (BUZSÁKI, 2006)), a potência “pura” (não normalizada pelo basal) da ASSR não é alterada nos animais Wistar, enquanto há uma diminuição (de 92 Hz em relação a 53 Hz) em animais WAR. Isso resulta em um aumento da potência normalizada da ASSR de $f_m = 92,77\text{Hz}$ em relação a $f_m = 53,71\text{Hz}$ em animais Wistar, enquanto em animais WAR os valores são semelhantes independentemente da f_m escolhida. Logo, a capacidade de discriminação entre as classes WAR e Wistar é diminuída para a ASSR dos trials de 92 Hz.

Utilizando somente as potências normalizadas das 5 bandas (*delta-gamma*) em trials, 66 – 75% das amostras são corretamente identificadas. Apesar da queda considerável em relação aos classificadores que utilizam informações da ASSR, estes valores mostram que tais atributos ainda possuem capacidade de discriminação entre WAR e Wistar. Isto é reforçado pelo melhor desempenho quando foram utilizados 7 atributos nos trials de 92 Hz, em comparação com os atributos da ASSR somente (melhora de ~81% para ~86% de exatidão).

Os resultados utilizando os 5 atributos de potência basal (~77%) são ligeiramente melhores que os obtidos com 5 atributos de potência normalizada nos trials. Ou seja, a estimulação sonora não é útil se considerarmos somente o nível de atividade neural de ritmos endógenos. Porém, quando associados com a ASSR, o

protocolo de estimulação possibilita ganhos consideráveis na performance dos classificadores.

Como visto anteriormente, o EEG basal de animais WAR possui características diferentes de animais Wistar. Utilizando somente as potências basais das bandas *delta-gamma*, é possível a classificação correta de cerca de 77% das amostras. Este desempenho pode ser melhorado, sobretudo se forem extraídos atributos relativos aos HVS (citados na seção 2.7) de animais WAR. Porém, a motivação desta parte do trabalho não é a simples diferenciação entre registros de animais WAR e Wistar (que pode ser feita de diversas maneiras), mas a avaliação da eficiência do protocolo de sondagem por estimulação acústica para obtenção de atributos que permitam um modo robusto de identificação de sistemas ictogênicos. Os resultados mostram o poder de discriminação da ASSR; o simples cálculo de sua potência é suficiente para diferenciar uma classe da outra, nos trials de 53 Hz. Além de representar informações de modo esparsas (devido à concentração em uma banda limitada em frequência), as oscilações da ASSR estão em bandas de frequência relativamente altas, mais separadas dos ritmos endógenos de maior amplitude do EEG e de diferentes tipos de ruído. Estes fatores contribuem para a robustez e eficiência de classificadores que utilizem a ASSR para identificação de sistemas ictogênicos.

Na interpretação dos resultados e extensão do método como ferramenta diagnóstica, deve-se considerar que o protocolo ASSR aqui utilizado envolve a combinação de um estímulo sonoro, modelo de CA e eletrodo no CI, que faz parte da via auditiva. Outros trabalhos podem tratar do quanto este método pode ser estendido a testes clínicos e quais adaptações serão necessárias. Entre os principais desafios para o uso de um protocolo semelhante em ambiente clínico para diagnóstico de epilepsia, temos a capacidade de generalização para diferentes tipos de epilepsia. Além disso, os sinais obtidos serão, em sua grande maioria, de EEG de escalpo, com pior relação sinal/ruído que os sinais de LFP aqui utilizados. Entre as opções para adaptação, temos a combinação de estímulos diferentes, o uso de mais canais de EEG, possibilitando análises de coerência e acoplamento que possam identificar propensão a crises, e o uso de protocolos de condicionamento em conjunto com a estimulação.

2.10. Conclusão do Capítulo

Neste capítulo, redes ictogênicas foram avaliadas por um paradigma de sondagem neural. Os resultados da seção 2.8.1 confirmam parte da hipótese I, de que o processamento auditivo de WARs é diferenciado (no caso, hiperexcitável), evidenciado pela maior amplitude da ASSR evocada por sons AM. Estes valores maiores seriam, em parte, devido ao maior recrutamento de circuitos locais, resultando na ligeira diminuição de atividade nas bandas *Beta* e *Gamma* destes animais. Efeitos do som em osciladores endógenos nas bandas também foram detectados, com a diminuição da atividade nas bandas *Gamma* e *Beta*. Porém, ao contrário do proposto inicialmente, WARs e Wistars possuem diferenças nos níveis de atividade neural basal (além da presença de HVS), pois WARs apresentaram maior potência nas bandas *Beta* e *Gamma*, em trechos sem a apresentação do som.

Calculando o índice de PLV médio durante trechos com a apresentação do som, a hipótese II foi confirmada. Ou seja, WARs apresentaram maiores índices de acoplamento de fase entre ASSR e estímulo, indicando que o hipsincronismo de substratos neurais (neste caso, do CI) pode ser mais um dentre os fatores envolvidos na suscetibilidade de WARs a crises.

Por fim, a hipótese III foi testada e confirmada, mostrando que características extraídas de registros obtidos por meio do protocolo de estimulação sonora sublimiar (de 85 dB) são eficientes na discriminação entre as classes WAR e Wistar. Ainda que a simples classificação de amostras de sinais provenientes de animais WAR fosse uma tarefa relativamente simples, devido aos episódios de ondas de alta amplitude (HVS, descritas na seção 2.7) presentes na maioria destes animais, os métodos de análise não utilizaram informações destes eventos, mas somente de atributos relacionados, direta ou indiretamente, ao estímulo em questão. Ou seja, os resultados mostram que os Atributos da ASSR possuem alto poder preditivo, refletindo seu papel como marcador eletrográfico do processamento sensorial auditivo de cada animal. Isto revela uma circuitaria hiperexcitável em animais suscetíveis a CAs, que poderia ser utilizada no desenvolvimento de biomarcadores e como ferramenta diagnóstica em outras configurações.

3. Processamento Auditivo ao Longo de Crises Audiogênicas

No capítulo anterior, características extraídas de sinais de LFP de um protocolo de sondagem por estimulação sonora de 85 dB foram utilizadas para avaliação de hipóteses e na classificação de sistemas ictogênicos. Neste capítulo, os mesmos atributos são extraídos dos sinais de LFP, porém estes são decorrentes de experimentos onde o estímulo sonoro (de 110 dB) é utilizado para desencadear crises tônico-clônicas em animais WAR. A dinâmica dos atributos ao longo dos estágios pré-ictal, ictal e pós-ictal é analisada, de modo a avaliar hipóteses e auxiliar na compreensão dos mecanismos de ictogênese.

3.1. Protocolo de estimulação a 110 dB

Os protocolos de experimento deste capítulo são semelhantes aos do capítulo anterior. As diferenças incluem a duração e número de *trials*; ao invés de 6 *trials* de 30 segundos, é utilizado somente 1 *trial* de 60 segundos. A frequência de modulação f_m do *trial* é igual a 53,71 Hz, e a intensidade do som é de 110 dB (ao invés de 85 dB), o suficiente para desencadear crises tônico-clônicas nos animais WAR. Além disso, o sinal é amplificado em 2.000 vezes, e não 10.000 como no protocolo de 85 dB.

3.2. Hipótese IV – dinâmica ictal

As análises deste capítulo têm o objetivo de avaliar a hipótese de que o processamento sonoro de WARs é afetado antes, durante e após a ocorrência de uma crise audiogênica. Esta hipótese foi proposta como sequência às propostas no capítulo anterior; se o CI de WARs é marcado por hiperexcitabilidade, e crises são desencadeadas com estímulos de alta intensidade, é de se esperar que circuitos responsáveis pela resposta auditiva do CI façam parte da via ictogênica. Na iminência de uma CA, estes circuitos (normalmente responsáveis pelo processamento auditivo) perderiam sua capacidade funcional, com o crescente recrutamento de circuitos reverberantes pelo foco ictal. Isto seria agravado de tal modo durante a crise, que o

processamento sensorial auditivo seria incapacitado. No período pós ictal, o processamento continuaria prejudicado, pois os circuitos envolvidos na crise estariam em período hipoexcitável (ou refratário), devido ao esgotamento metabólico ou algum mecanismo que levou à interrupção de atividade neural hipsíncrona.

Para a avaliação da hipótese, atributos dos estágios pré-ictal, ictal e pós-ictal foram extraídos em cada registro de animais WAR e Wistar. Os trechos foram segmentados de acordo com a inspeção visual do vídeo-EEG. Foram consideradas principalmente características comportamentais, com pequenos ajustes de acordo com os respectivos sinais e espectrogramas.

Apesar dos Wistars não apresentarem CAs perante a estimulação, trechos com mesma duração e posição em relação ao início do estímulo são segmentados neste grupo, de acordo com os valores demarcados de início e fim de cada estágio em animais WAR. Assim, comparações com o grupo controle (Wistar) podem ser feitas, livres de eventuais discrepâncias devido aos tamanhos diferentes dos segmentos de cada grupo. Outro tipo de comparação com grupo controle considera os resultados obtidos no protocolo de 85 dB em WARs. Ou seja, os valores em cada estágio patológico (pré-ictal, ictal e pós-ictal) do protocolo de 110 dB são comparados com animais saudáveis (Wistars) e com animais patológicos (WARs) em situações “normais” (estímulo de 85 dB, sem CAs). Por fim, comparações são feitas entre os próprios três estágios, de modo a compreender a dinâmica envolvida ao longo da CA. Ou seja, determinado atributo permanece constante ao longo dos três períodos, ou muda em algum destes?

Considerando a ASSR como marcador eletrográfico de processamento sensorial auditivo do CI, a capacidade de resposta a estímulos sonoros ao longo da crise é feita utilizando os mesmos métodos de extração de atributos do capítulo anterior; A amplitude da ASSR é calculada por meio da STFT (coeficientes ao redor da banda f_m), e o sincronismo da resposta com o estímulo é calculado por PLV. Efeitos em osciladores endógenos são quantificados pelo cálculo da potência em cada banda (*Delta, Theta, Alpha, Beta, Gamma*).

3.3. Resultados e Discussão

Dois animais, um de cada grupo (WAR e Wistar), não foram incluídos neste protocolo (PEREIRA, 2014). Todos os animais, cerca de 5 segundos após o início do som, apresentaram comportamento de corrida, seguido por crises tônico clônicas. Dos sete animais WAR, dois apresentaram CAs com Índice de Severidade (IS) (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996) igual a 1 (máximo), e os demais tiveram CAs com $IS = 0,95$. Os trechos ao fim da CA e após são caracterizados por apnéia e depressão pós-ictal.

O registro de um WAR e sua respectiva representação tempo-frequência (STFT) são mostrados na Figura 18, destacando os diferentes estágios da crise.

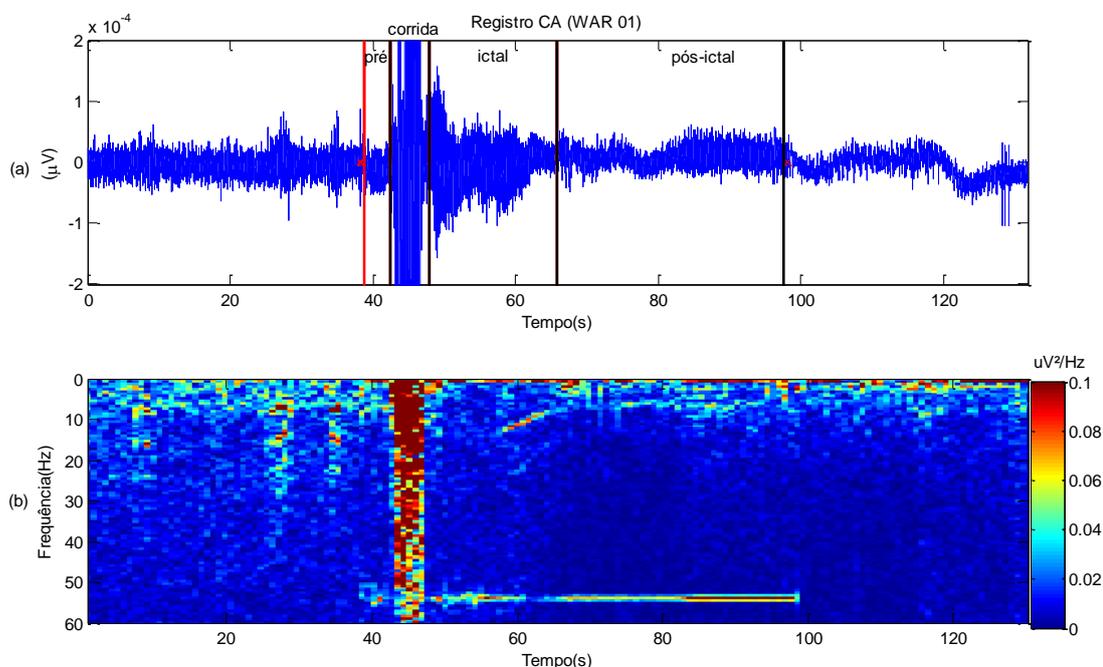


Figura 18: Registro CI do WAR 01, protocolo 110 dB, e o respectivo espectrograma. Em destaque, acima, os 4 estágios segmentados (1) pré-ictal (2) corrida (3) ictal (4) pós-ictal. (b) mostra o Espectrograma do sinal.

A Figura 19 mostra os valores de potência ASSR, normalizada pelo respectivo basal, de animais WAR. Os trechos são comparados entre si, para avaliar a dinâmica ao longo dos estágios da CA, e com os valores encontrados no protocolo de 85 dB do capítulo anterior, como controle (RM-Anova de uma via, com *post Hoc de Bonferroni*).

Os resultados da Figura 19 indicam que a amplitude da ASSR evocada não é alterada significativamente antes, durante ou depois da crise, sendo semelhante aos

valores encontrados pelo protocolo anterior, apesar do aumento na intensidade do som (85 dB para 110 dB).

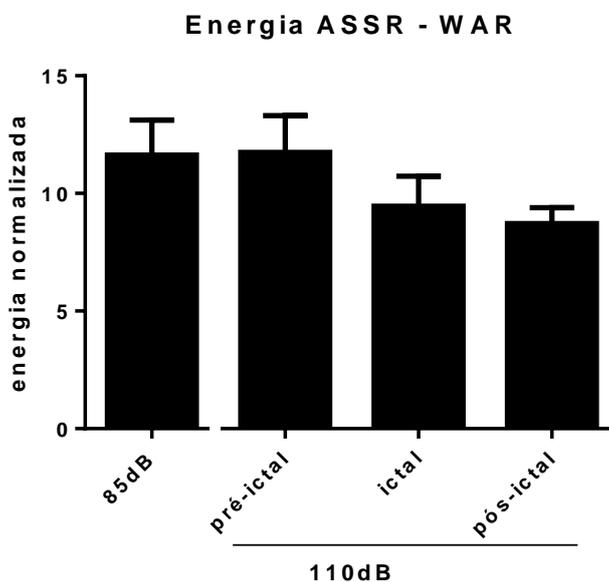


Figura 19: Potência da ASSR, normalizada pelo respectivo basal, de animais WAR ao longo dos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal, do protocolo de 110 dB. Valores do protocolo de 85 dB também são representados e utilizados como controle. Resultados mostrados como média + EPM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Anova de uma via, *post hoc de Bonferroni*).

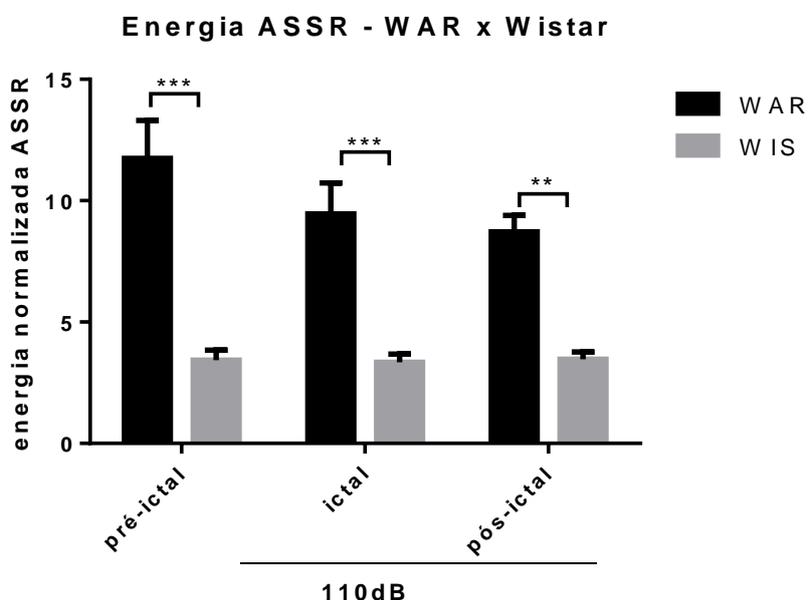


Figura 20: Potência da ASSR, normalizada pelo respectivo basal, de animais WAR e Wistar ao longo dos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal do protocolo de 110dB. Comparações são feitas entre cada grupo de animais, para cada estágio (RM-Anova de duas vias com Correção *Bonferroni*). Resultados mostrados como média + EPM. Como esperado, diferenças significativas foram encontradas nos três casos. ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

A Figura 20 mostra os valores de cada estágio, comparados com os respectivos controles Wistar. Apesar destes não sofrerem CAs nos experimentos, valores são calculados sobre trechos “pré-ictais”, “ictais” e “pós-ictais”, segmentados de acordo com os respectivos períodos de animais WAR.

Os resultados da Figura 19 e 20 mostram que a capacidade de resposta a um estímulo auditivo, quantificada pela amplitude da ASSR, não é afetada significativamente pela CA em animais WAR, nem períodos antes ou após sua ocorrência. Nos três trechos, a ASSR permanece com amplitudes maiores que animais saudáveis (Wistars), evidenciando que animais WAR continuam hiperexcitáveis a estímulos externos, mesmo durante e após uma CA.

Os efeitos da CA em osciladores endógenos do CI são quantificados pelo cálculo da potência normalizada pelo respectivo basal de cada banda (*Delta, Theta, Alpha, Beta, Gamma*), de modo semelhante ao capítulo anterior. Comparações entre os estágios pré-ictal, ictal e pós-ictal são feitas e mostradas na Figura 21, além de testes de cada um com o respectivo controle de 85 dB (RM-Anova de uma via, com *post Hoc de Bonferroni*).

Os resultados da Figura 21 mostram que, apesar da potência da ASSR não ser alterada significativamente em nenhum estágio, outras bandas de potência sofrem alterações consideráveis em diferentes trechos. O período pré-ictal não apresenta variações significativas em relação ao controle de 85 dB. Porém, o período ictal é marcado pelo aumento característico das potências (neste caso, das bandas *Alpha, Beta e Gamma*), decorrentes do crescente recrutamento de circuitos em estados hipsíncronos pelo foco ictal. Após o fim da CA, ocorre uma diminuição drástica nestes valores em relação a todos os períodos, evidenciando um período hipoexcitável dos circuitos recrutados pela crise. Isto pode ser dar pelo esgotamento metabólico, ou como “efeito colateral” de algum mecanismo envolvido na interrupção do período ictal.

Energias Normalizadas - Trechos WAR

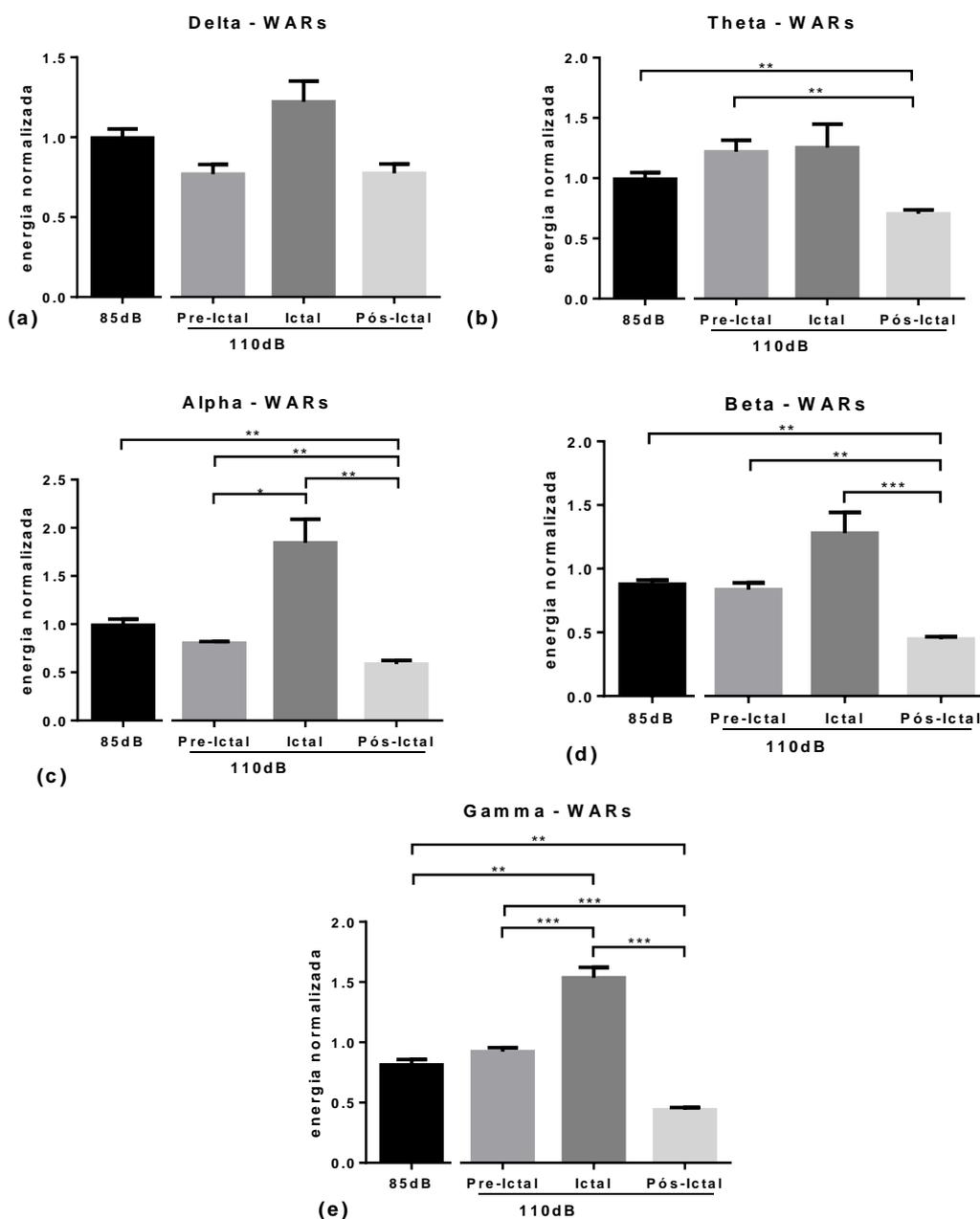


Figura 21: Potências normalizadas de WARs, nos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal, comparados entre si e com o controle de 85 dB. Bandas (a) Delta, (b) Theta, (c) Alpha, (d) Beta e (e) Gamma. Resultados mostrados como média + EPM. (RM-Anova de uma via *post Hoc de Bonferroni*). * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

A Figura 22 compara os valores de potência normalizada de cada estágio de WARs, com os respectivos controles Wistar (RM-Anova de duas vias, com *post Hoc de Bonferroni*).

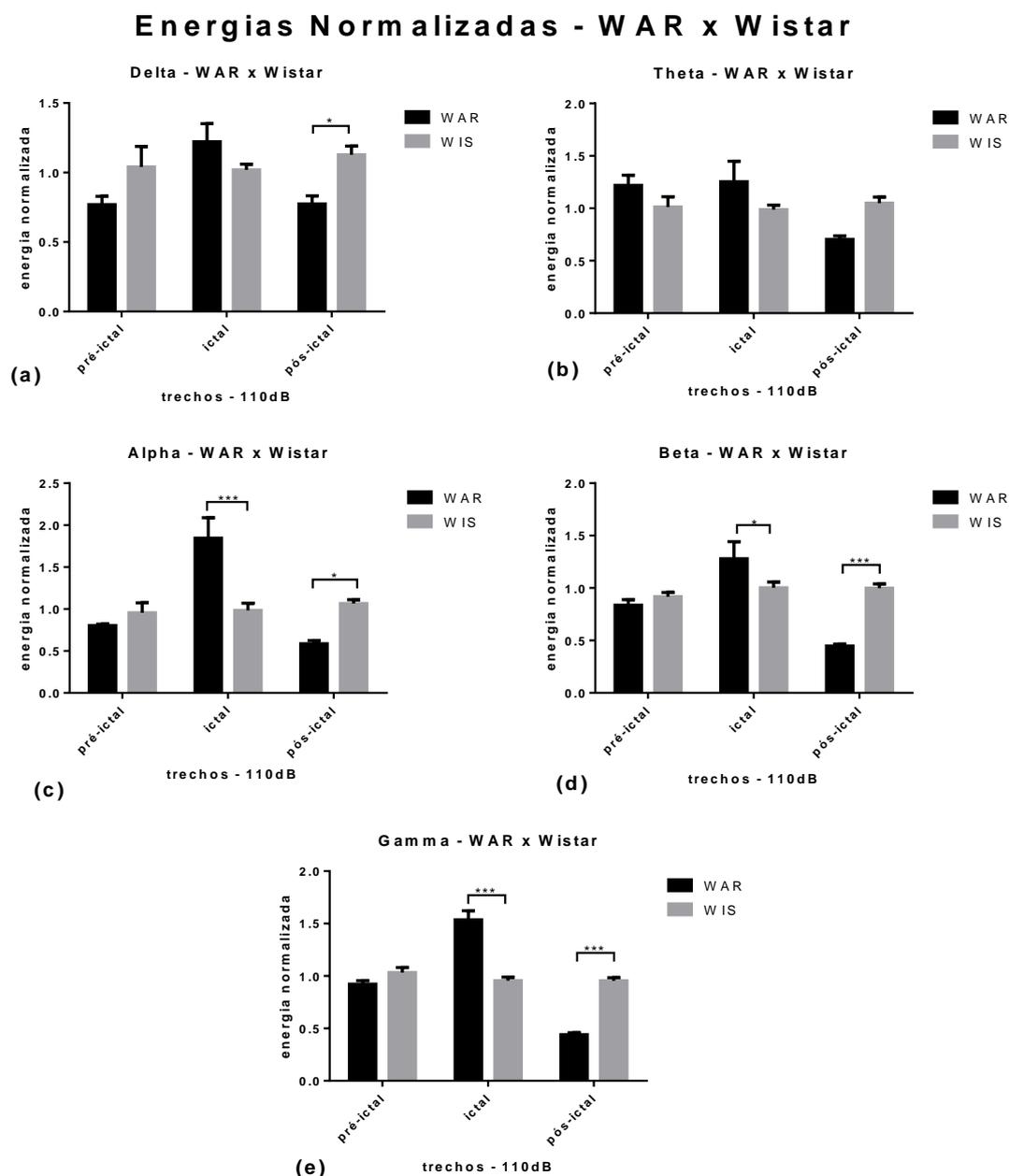


Figura 22: Potências normalizadas das cinco bandas, comparando cada trecho de animais WARs (pré-ictal, ictal e pós-ictal) com os respectivos períodos em animais Wistar. Bandas (a) Delta, (b) Theta, (c) Alpha, (d) Beta e (e) Gamma. Resultados mostrados como média + EPM. (RM-Anova de uma via com Correção Bonferroni). * $p \leq 0.05$ e *** $p \leq 0.001$.

Novamente, alterações significativas são notadas a partir da banda *Alpha*, nos períodos ictal e pós-ictal. Estas são decorrentes do estado hipersíncrono ocasionado pela CA, causando o aumento de potência, seguidas pelo período hipoexcitável pós ictal, com reduzida atividade neural.

A discrepância das dinâmicas da ASSR e demais bandas do EEG no protocolo de 110 dB pode ser uma indicação que circuitos responsáveis pelo processamento auditivo do CI não fariam parte efetivamente da via ictogênica, apesar de estarem intimamente envolvidos em seu gatilhamento. Ou seja, o processamento do som de alta intensidade daria início a um processo de ativação de um foco ictal, que deflagraria uma CA, pelo recrutamento de circuitos em um estado reverberante. Porém, a persistência da ASSR ao longo da CA indica que circuitos de processamento auditivo continuam a desempenhar sua função fisiológica, ao contrário de circuitos que fazem parte do foco ictogênico ou são efetivamente recrutados por ele. Isto contraria a hipótese proposta, que foi feita considerando que o processamento auditivo seria prejudicado seriamente ao longo da crise, pois circuitos responsáveis pelo processamento perderiam sua capacidade de resposta a estímulos, à medida que fossem recrutados pelo foco ictal (ou fossem o próprio circuito ictal), permanecendo em período hipoexcitável no pós-ictal. De fato, é mostrado que a amplitude de potenciais evocados auditivos é reduzida no pós ictal, em eletrodos ipsilaterais ao foco epileptogênico em pacientes com Epilepsia de Lobo Temporal (ABUBAKR; WAMBACQ, 2003). Já em (HARRIS et al., 2013), respostas evocadas sensoriais neurovasculares são reduzidas ipsilateralmente, mas aumentadas na região contralateral ao foco ictogênico. Ou seja, seria esperado que circuitos de processamento sensorial fossem comprometidos quando recrutados pelo foco ictal, mas funcionassem normalmente (ou mais excitáveis, devido a alterações de inibição decorrentes da crise) caso a via sensorial não for recrutada em um estado reverberante. Em contrapartida, é possível que a resposta em circuitos que não são recrutados pelo foco ictal seja aumentada, devido a fatores como o desequilíbrio inibitório (HARRIS et al., 2013).

Outro modo de avaliar o comprometimento do processamento auditivo é a quantificação do grau de acoplamento entre ASSR e estímulo, por meio do índice PLV (apresentado no capítulo anterior). A Figura 23 mostra os valores de PLV calculados para os períodos pré-ictal, ictal e pós-ictal, além da média dos PLVs dos *trials* de 53 Hz de cada animal, do protocolo de 85 dB. Como o conjunto de PLVs de WARs do capítulo anterior (85 dB) foi rejeitado por testes de normalidade, índices de PLV podem não possuir distribuição normal. Assim, novamente são utilizados testes não paramétricos

neste capítulo para este atributo, apesar destes dados (do protocolo de 110 dB) não terem sido rejeitados por testes de normalidade.

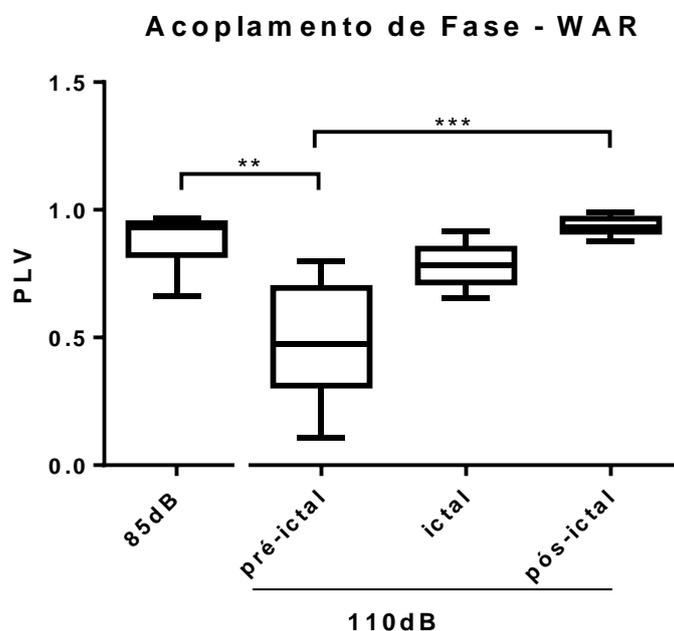


Figura 23: Índices PLV de animais WAR, ao longo dos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal, do protocolo de 110 dB. Valores do protocolo de 85 dB também são representados e utilizados como controle. Resultados mostrados como boxplots (tukey). Diferenças significativas encontradas entre pré-ictal e demais estágios (Teste de *Friedman* com teste *post hoc* de *Dunn*). $**p \leq 0.01$ e $***p \leq 0.001$.

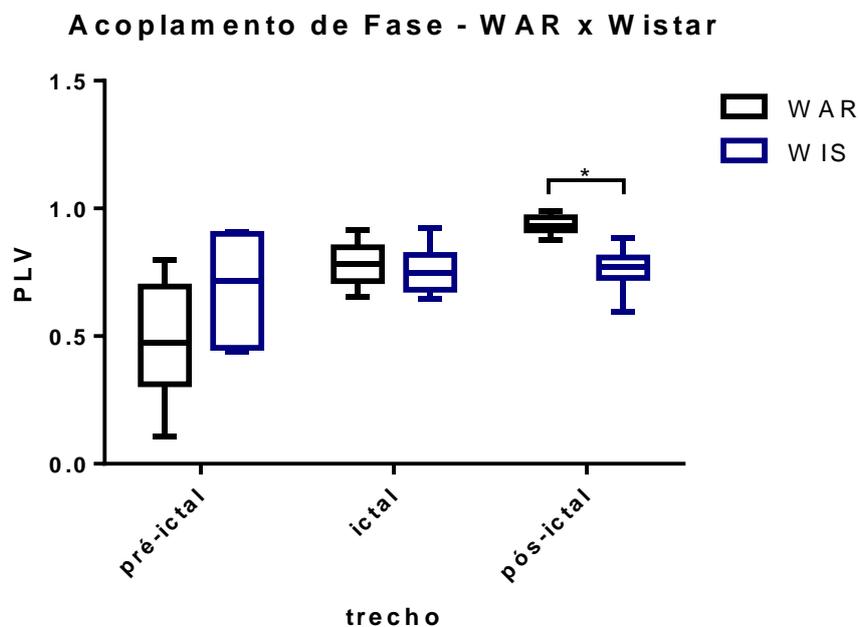


Figura 24: Índices de PLV de animais WAR e Wistar, ao longo dos trechos pré-ictal, ictal e pós-ictal do protocolo de 110 dB. Comparações são feitas entre cada grupo de animais, para cada estágio (Kruskal-Wallis com teste *post hoc* de *Dunn*). Resultados mostrados como boxplots (Tukey). $*p \leq 0.05$

A Figura 24 mostra os valores de PLV de cada estágio da CA, de animais WAR com os respectivos trechos controle de Wistars.

O período pré-ictal possui os menores valores de PLV, significativamente menores que o controle WAR de 85 dB. O índice aumenta ligeiramente no período ictal e no pós-ictal, sendo significativamente maior que o controle de animais Wistar neste caso. Apesar de não terem sido detectadas diferenças pelos testes estatísticos em alguns casos onde estas parecem evidentes, estes foram feitos com correções para comparações múltiplas com poucas amostras (sete animais com um *trial* cada). Assim, certas comparações poderiam ser significativas estatisticamente com mais amostras (pós-ictal com ictal, por exemplo).

Apesar da comparação com o controle de 85 dB não ter resultado em diferenças estatísticas (apesar da maior média e menor variância do pós-ictal), é possível que isto se deva a dois fatores; pequeno número de amostras, e a saturação do índice de PLV, que vai de 0 até 1. Ou seja, após a CA, a capacidade de sincronismo da ASSR não é prejudicada, sendo igual, senão maior ao controle de 85 dB de WARs.

A queda do PLV no pré-ictal poderia ser explicada por, na iminência de ocorrência de uma crise, circuitos neurais responsáveis pelo processamento auditivo (incluindo a ASSR) estariam interagindo com circuitos ictogênicos, prejudicando o sincronismo da resposta perante o estímulo. Isso prejudicaria a capacidade destes grupos neurais produzirem uma ASSR com a plena capacidade de 'seguir' o estímulo sonoro, pois estariam parcialmente ou transientemente acoplados com outros circuitos ictais, ainda que os valores de amplitude da ASSR não sejam alterados significativamente. Isto estaria de acordo com a hipótese que o período pré-ictal seria marcado pela dessincronização de grupos neurais em relação a processos normais (LE VAN QUYEN et al., 2003). No período ictal, o sincronismo da resposta ainda é prejudicado, mas em menor grau, outro possível indício que circuitos do processamento auditivo estão envolvidos no gatilhamento da crise, mas não de sua propagação e manutenção. Com o fim da crise, o PLV atinge seu valor máximo, contrariando novamente parte da hipótese inicial, de que neurônios responsáveis pela ASSR entrariam em período hipoexcitável de mesmo modo que outros circuitos do CI,

prejudicando tanto a Potência ASSR, quando o sincronismo com o estímulo. O que vemos é o contrário; enquanto a potência nas outras bandas é reduzida após a CA, a resposta em amplitude da ASSR não é alterada significativamente, mas a capacidade de acoplamento atinge seu valor máximo com menor variância entre as amostras. Esta tendência a sincronizar mais facilmente com estímulos externos no pós-ictal poderia ser explicada pelo fato que grande parte dos circuitos endógenos está em período hipoexcitável, incluindo os responsáveis por modulações top-down e inibição. Assim, estímulos sonoros evocariam respostas mais síncronas, pelo fato do sistema estar com grande parte dos circuitos em período hipoexcitável, mas responsivo a perturbações ou estímulos externos.

A princípio, os resultados do índice de PLV iriam contra aos encontrados pela potência da ASSR, visto que ambos são marcadores do processamento auditivo no CI. Porém, ainda que estes possuam papéis como marcadores, características distintas são quantificadas por cada um; enquanto a potência da ASSR mede a magnitude da resposta evocada pelo som AM, o PLV quantifica a capacidade da ASSR “seguir” o estímulo, indicando a capacidade de sincronismo de circuitos neurais com estímulos externos. A potência da ASSR não sofre grandes alterações antes, durante e após a CA, mas o sincronismo da resposta com o som AM é prejudicado na iminência da CA. Assim, ainda que os índices de PLV e alterações transientes na amplitude da ASSR confirmem parte da hipótese inicial, de que o processamento auditivo é alterado ao longo da crise, os resultados obtidos refutam parte da sua formulação. Enquanto esperava-se que o processamento seria prejudicado durante e após a CA, mostrou-se o contrário; a capacidade de resposta a estímulos auditivos é ligeiramente prejudicada durante a crise, principalmente devido a transientes no início e final, mas permanece hiperexcitável no pós-ictal (inclusive quando comparado com o controle Wistar).

Análises mais detalhadas da dinâmica (mostrando a ASSR ao longo do tempo) podem mostrar se ocorrem transientes na amplitude ou acoplamento de fase da ASSR, que podem ser causados pela crise, ou serem marcadores de sua iminência. As figuras a seguir são mostradas para avaliar a presença de tais dinâmicas transitórias dos marcadores de processamento auditivo (potência da ASSR e PLV), por meio do cálculo

destes valores em uma janela deslizante ao longo do tempo. A Figura 25 mostra a CA de um animal WAR, com informações de fase relativa, PLV e potência da ASSR, em janelas deslizantes de 1 segundo, com 75% de sobreposição. Os períodos de transição entre os estados pré-ictal, corrida, ictal e pós-ictal são demarcados por linhas, de acordo com os trechos definidos manualmente, após análise do vídeo-EEG de cada animal. A Figura 26 usa a mesma metodologia, para um animal Wistar (apesar deste não sofrer uma CA, os períodos são demarcados para referência, utilizando os valores de um registro WAR).

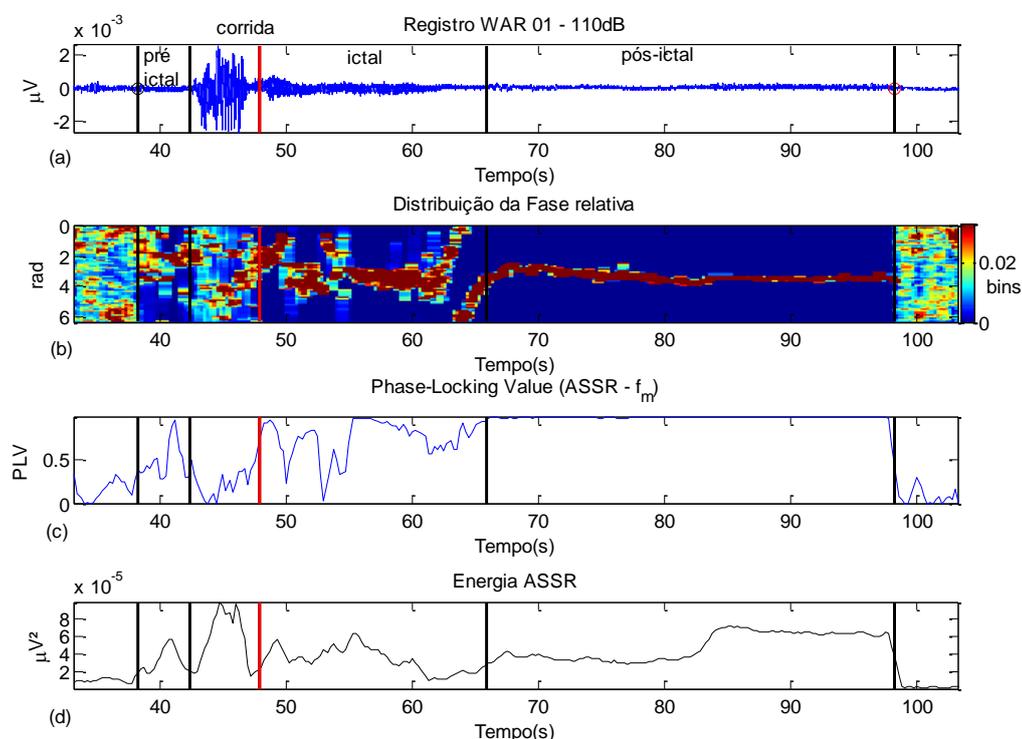


Figura 25: Dinâmica de uma Crise Audiogênica em um WAR. Em (a), é mostrado o registro do animal, 5 segundos antes do início do som de 110 dB, até 5s após o fim do som. Os 4 estágios, pré-ictal, corrida, ictal e pós-ictal, são demarcados por linhas verticais (a vermelha marca o início da CA). Os valores em (b), (c) e (d) são calculados em janelas deslizantes de 1 segundo, com 75% de sobreposição. (b) mostra a distribuição da fase relativa cíclica entre ASSR e a componente f_m do som, de cada segmento de 1 segundo. Distribuições uniformes indicam ausência de acoplamento, enquanto a concentração dos valores em ângulos específicos resulta em altos índices de PLV, como mostrado em (c). A energia da ASSR ao longo do tempo é mostrada em (d). Esta série foi obtida com a filtragem do registro em $53.71 \pm 3Hz$, seguida pelo cálculo da média da série de Amplitude Instantânea deste sinal filtrado da ASSR ($\overline{A_{ASSR}}(\hat{t})$), em cada janela de 1 segundo.

Na Figura 25, é notada uma dinâmica do PLV ao longo da CA que é semelhante nos 7 animais. No pré ictal, o PLV começa baixo (~ 0.5), seguido por um ou mais períodos transitórios altos ($\geq \sim 0.8$), e queda antes do período de corrida. Este período não é analisado, devido à grande quantidade de artefatos de movimento do sinal. Na Crise Audiogênica, há períodos com alto grau de acoplamento, com transitórios de

queda brusca (que nem sempre estão associados à queda de energia da ASSR). O final da CA de todos os animais é caracterizado pela queda no PLV (brusca em alguns, ligeira em outros) e na energia da ASSR, seguido pelo aumento significativo do PLV no pós-ictal. Também neste período, a ASSR de quase todos os animais permanece relativamente constante; porém, no animal mostrado na Figura 25, há um aumento na energia da ASSR na metade do trecho pós-ictal.

A Figura 26 mostra menores valores de PLV e energia da ASSR de um Wistar. A dinâmica dos valores destes animais, apesar de mais “ruidosa”, não apresenta dinâmicas temporais lentas consideráveis.

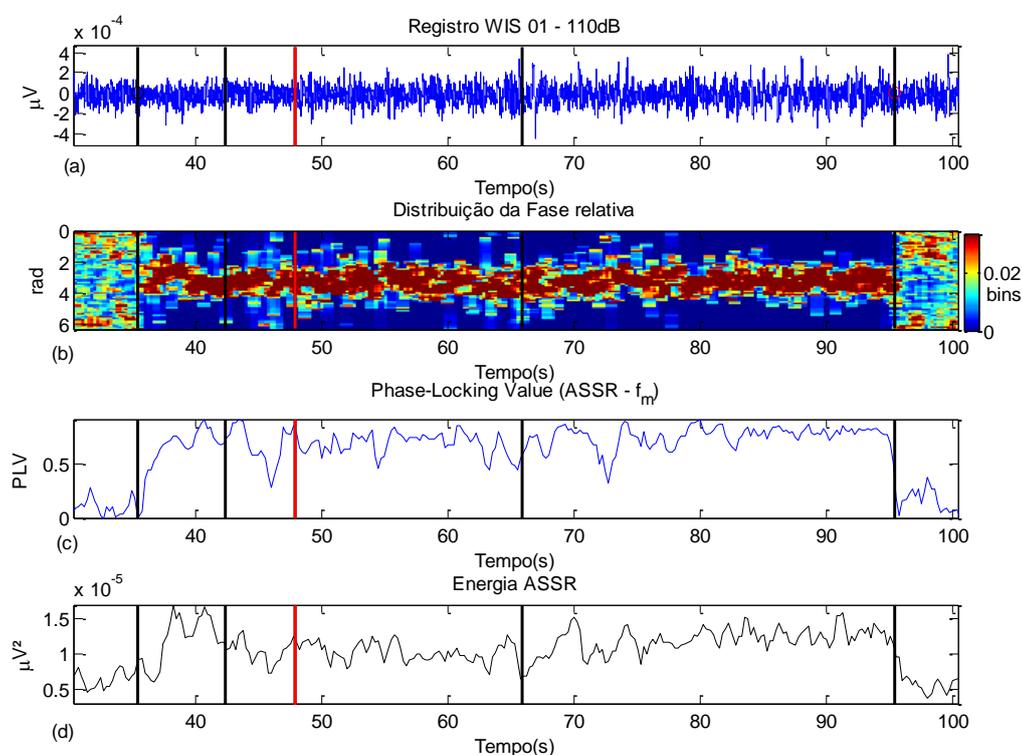


Figura 26: Dinâmica do *trial* do protocolo de 110 dB, em um Wistar. (a) Registro, (b) Distribuição da fase relativa entre ASSR e som e (c) PLV resultante de cada janela. (d) energia da ASSR ao longo do tempo.

Estes resultados são uma adição aos obtidos nas seções anteriores, para a avaliação da hipótese deste capítulo. Eles mostram que a amplitude da ASSR, apesar de não ser alterada significativamente em cada estágio, possui alterações transitórias nos períodos pré-ictal e ictal. O índice PLV, possui mudanças transitórias mais bruscas antes e durante a crise. Isto indica que o processamento auditivo de WARs é comprometido em certos momentos da CA. Porém, como estas alterações ocorrem

somente em períodos transitórios, e após a CA o circuito continua responsivo (talvez até mais) ao estímulo, a sugestão de que grupos de neurônios de resposta auditiva do CI não são efetivamente recrutados (nem fazem parte) pela via ictogênica não é descartada. Porém, essas alterações transitórias indicam que interações entre estes circuitos podem ocorrer, sobretudo no início e final da crise. A confirmação da hipótese que a circuitos de iniciação da crise seriam diferentes dos responsáveis por sua manutenção teria implicações no tratamento de epilepsia, sobretudo em intervenções cirúrgicas. Ou seja, a remoção de uma região responsável pelo gatilhamento da crise, e não da via ictogênica específica, poderia resolver o problema de forma temporária, mas crises poderiam voltar a ser recorrentes caso outro circuito ative a via ictogênica.

3.4. Conclusão do Capítulo

Considerando a amplitude da ASSR como um biomarcador da resposta a estímulos auditivos do CI, mostrou-se que a capacidade de resposta de circuitos responsáveis pelo processamento auditivo não é prejudicada significativamente por episódios ictais, refutando a hipótese inicial. Em geral, o recrutamento de circuitos pelo foco ictal é marcado por um aumento de atividade (e conseqüentemente, na potência do respectivo ritmo) durante a CA, seguido por um período hipoexcitável com decréscimo de potência do sinal. Porém, a ausência de tal dinâmica na ASSR sugere que circuitos que fazem parte do processamento auditivo, apesar de estarem envolvidos no processo que leva a uma CA, podem não fazer parte efetivamente de circuitos da via ictogênica responsáveis pelo recrutamento de neurônios e sua manutenção em estados reverberantes.

A análise de sincronismo de fase por PLV mostra que no período pré-ictal, a capacidade de acoplamento da ASSR com um estímulo externo é ligeiramente prejudicada, possivelmente por interações de circuitos responsáveis pela resposta com grupos do foco ictal. Isto não afetaria a amplitude da resposta, mas comprometeria a capacidade da resposta “seguir” o estímulo. Durante a CA, esta capacidade é prejudicada somente em períodos transitórios (no início e final da crise, em sua maioria). Após a CA, a capacidade de acoplamento da ASSR com o estímulo atinge

valores próximos do máximo, indicando que apesar de grande parte do sistema estar em estado hipoexcitável (evidenciado pela queda de potência em várias bandas), este ainda é responsivo a um guia (ou *drive*) externo, com alta capacidade de acoplamento.

4. Conclusão

Este trabalho avaliou hipóteses a respeito de ictogênese em um modelo animal, por meio da extração de características de registros eletroencefalográficos em um protocolo de estimulação acústica. De forma geral, os objetivos propostos foram atingidos, provendo indícios que auxiliam na compreensão dos complexos mecanismos de ictogênese, além da proposição e avaliação de um método de diagnóstico com possíveis aplicações clínicas.

A elevada ASSR evocada pelo protocolo de estimulação em WARs confirma a hipótese (I) que o processamento de informações auditivas em animais ictogênicos é feita de modo diferente, sendo caracterizada por sua hiperexcitabilidade. Parte da hipótese foi refutada, quando foi mostrado que WARs possuem atividade basal diferenciada em neurônios do CI. Além da presença de fusos de alta amplitude (HVS), a potência em bandas de frequências mais altas (*Gamma* e *Beta*) é elevada nestes animais, um possível indicador de maior atividade em circuitos neurais locais. O efeito do som em osciladores neurais endógenos é diferenciado em WARs, onde a apresentação de sons AM causou a diminuição de atividade nas bandas *Gamma* e *Beta*. Em seguida, utilizando o índice PLV como marcador da capacidade de acoplamento da ASSR com a componente moduladora do som, foi confirmada a hipótese (II) de que WARs possuem propensão à hipsincronização com estímulos externos. As características utilizadas para validação das hipóteses anteriores e caracterização de animais WAR foram então empregadas em classificadores para identificação de amostras de sistemas ictogênicos. Índices de exatidão de 86% a 96% foram obtidos, com a potência da ASSR possuindo maior poder preditivo (especialmente com a moduladora do som de 53 Hz), mas outros atributos de potência e PLV possibilitaram melhoras no desempenho.

A análise da dinâmica do processamento auditivo ao longo de CAs refutou a hipótese inicial, que o processamento auditivo de WARs seria severamente prejudicado durante e após uma CA. Ao contrário dos circuitos que normalmente são recrutados pelo foco, que entram em um estado reverberante durante a crise e em um

estado hipoexcitável após o fim desta, a energia da ASSR ao longo dos estágios pré-ictal, ictal e pós-ictal não sofre alterações significativas, apesar de esta sofrer ligeiras alterações transientes antes e durante a CA. Já o índice de acoplamento da ASSR com o estímulo é ligeiramente prejudicado antes e durante a CA, mas atinge níveis máximos no pós-ictal. Estes resultados sugerem que, embora circuitos de processamento auditivo do CI estejam envolvidos no gatilhamento de CAs, estes não fariam parte efetivamente do foco ictal. Isto teria implicações em abordagens de intervenções cirúrgicas para tratamento de epilepsia, além de esclarecer parte dos mecanismos de ictogênese e epileptogênese.

4.1. Trabalhos Futuros

Como é comum em qualquer projeto científico, a avaliação das hipóteses apresentadas resultou em mais questões a serem propostas, sobretudo nos resultados que não eram esperados. Quais os fatores que levam à hiperexcitabilidade do CI de WARs? Os maiores valores da ASSR em WARs seriam devido à maior área recrutada, ao maior sincronismo de disparos entre neurônios vizinhos ou por alterações nos mecanismos de inibição? Os maiores índices de sincronismo de fase seriam encontrados com outros estímulos sensoriais, ou somente em auditivos, visto que este é um modelo audiogênico? Por que o processamento auditivo em WARs é prejudicado somente em períodos transitórios durante a crise? Os bons resultados do protocolo de sondagem por estimulação acústica seriam reprodutíveis em um ambiente clínico, com diferentes tipos de epilepsia? O mesmo princípio poderia ser utilizado como um novo método para predição de crises, baseado na análise da resposta do sistema a um estímulo, ao invés de métodos clássicos que somente utilizam alterações em ritmos endógenos do cérebro?

Algumas das questões apresentadas podem ser respondidas com novos protocolos de experimentos, não muito diferentes dos apresentados aqui. O uso de eletrodos em diferentes áreas seria um método interessante para avaliar dinâmicas de acoplamento entre regiões. Isto também poderia prover indícios a respeito da origem e natureza dos episódios de HVS encontrados em WARs, e se estes possuem um papel na epileptogênese destes animais. Registros multiunitários também possibilitariam

análises de sincronismo em diferentes escala espaço-temporais. A confirmação de que circuitos de gatilhamento da crise não seriam necessariamente circuitos ictogênicos teria profundas implicações em métodos de intervenção cirúrgica, com a possível redefinição de zonas epileptogênicas e ictogênicas.

Outras opções incluem o aumento incremental da intensidade do som, de modo a caracterizar a transição de estados aparentemente normais de animais WAR, para episódios de crise. Isto também possibilitaria a avaliação do uso de estímulos sonoros como marcadores surrogados para predição de crises.

5. Referências

ABUBAKR, A.; WAMBACQ, I. The localizing value of auditory event-related potentials (P300) in patients with medically intractable temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 4, n. 6, p. 692–701, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505003002336>>.

ACHARYA, U. R.; SREE, S. V.; ALVIN, A. P. C.; YANTI, R.; SURI, J. S. Application of non-linear and wavelet based features for the automated identification of epileptic EEG signals. **International journal of neural systems**, v. 22, n. 2, p. 1250002, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23627588>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

ADELI, H.; ZHOU, Z.; DADMEHR, N. Analysis of EEG records in an epileptic patient using wavelet transform. **Journal of neuroscience methods**, v. 123, n. 1, p. 69–87, 15 fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581851>>.

ANDRZEJAK, R.; LEHNERTZ, K.; MORMANN, F.; RIEKE, C.; DAVID, P.; ELGER, C. Indications of nonlinear deterministic and finite-dimensional structures in time series of brain electrical activity: Dependence on recording region and brain state. **Physical Review E**, v. 64, n. 6, p. 061907, nov. 2001. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.64.061907>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

ARU, J.; PRIESEMAN, V.; WIBRAL, M. Untangling cross-frequency coupling in neuroscience. **arXiv preprint arXiv: ...**, 2014. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1405.7965>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

BAJAJ, V.; PACHORI, R. Classification of Seizure and Non-seizure EEG Signals using Empirical Mode Decomposition. **IEEE journal of biomedical and health informatics**, v. 16, n. 6, p. 1135–1142, 22 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203720>>.

BAJAJ, V.; PACHORI, R. B. Epileptic seizure detection based on the instantaneous area of analytic intrinsic mode functions of EEG signals. **Biomedical Engineering Letters**, v. 3, n. 1, p. 17–21, 14 abr. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13534-013-0084-0>>. Acesso em: 6 nov. 2013.

BARTOS, M.; VIDA, I.; JONAS, P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 45–56, 2007.

BAŞAR, E. Brain oscillations in neuropsychiatric disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 291–300, 2013.

BELLUSCIO, M. a.; MIZUSEKI, K.; SCHMIDT, R.; KEMPTER, R.; BUZSAKI, G. Cross-Frequency Phase-Phase Coupling between Theta and Gamma Oscillations in the Hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 2, p. 423–435, 2012.

BERG, A. T.; BERKOVIC, S. F.; BRODIE, M. J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J. H.; VAN EMDE BOAS, W.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T. a.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.;

NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I. E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676–685, 2010.

BERNARD, C.; ANDERSON, A.; BECKER, A.; POOLOS, N. P.; BECK, H.; JOHNSTON, D. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5683, p. 532–5, 23 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273397>>. Acesso em: 3 dez. 2015.

BLAUWBLOMME, T.; JIRUSKA, P.; HUBERFELD, G. Mechanisms of Ictogenesis. In: [s.l.: s.n.]p. 155–185.

BREIMAN, L. Bagging predictors. **Machine learning**, n. 421, 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00058655>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

BURGES, C. J. C. A Tutorial on Support Vector Machines for Pattern Recognition. v. 43, p. 1–43, 1997.

BUZSÁKI, G. **Rhythms of the brain**. [s.l.] Oxford University Press, 2006. v. 1

BUZSÁKI, G.; ANASTASSIOU, C. a.; KOCH, C. The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 407–420, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3241>>.

BUZSÁKI, G.; BICKFORD, R. G.; ARMSTRONG, D. M.; PONOMAREFF, G.; CHEN, K. S.; RUIZ, R.; THAL, L. J.; GAGE, F. H. Electric activity in the neocortex of freely moving young and aged rats. **Neuroscience**, v. 26, n. 3, p. 735–44, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3200427>>.

BUZSAKI, G.; BICKFORD, R. G.; PONOMAREFF, G.; THAL, L. J.; MANDEL, R.; GAGE, F. H. Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 4007–4026, 1988.

BUZSAKI, G.; CHROBAK, J. J. Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: A role for interneuronal networks. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 4, p. 504–510, 1995.

BUZSÁKI, G.; WATSON, B. O. Brain rhythms and neural syntax: Implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 345–367, 2012.

CANOLTY, R. T.; EDWARDS, E.; DALAL, S. S.; SOLTANI, M.; NAGARAJAN, S. S.; KIRSCH, H. E.; BERGER, M. S.; BARBARO, N. M.; KNIGHT, R. T. High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex - SUPPLEMENTARY MATERIAL. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5793, p. 1626–8, 15 set. 2006a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2628289&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

CANOLTY, R. T.; EDWARDS, E.; DALAL, S. S.; SOLTANI, M.; NAGARAJAN, S. S.; KIRSCH, H. E.; BERGER, M. S.; BARBARO, N. M.; KNIGHT, R. T. High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5793, p.

1626–8, 15 set. 2006b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2628289&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

CHAOVALITWONGSE, W.; IASEMIDIS, L. D.; PARDALOS, P. M.; CARNEY, P. R.; SHIAU, D.-S.; SACKELLARES, J. C. Performance of a seizure warning algorithm based on the dynamics of intracranial EEG. **Epilepsy research**, v. 64, n. 3, p. 93–113, maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961284>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

CHIAPPA, K. H. **Evoked potentials in clinical medicine**. Third ed. [s.l.] LWW, 1997.

CHOWDHURY, F. a.; NASHEF, L.; ELWES, R. D. C. Misdiagnosis in epilepsy: A review and recognition of diagnostic uncertainty. **European Journal of Neurology**, v. 15, n. 10, p. 1034–1042, 2008.

COHEN, L.; LEE, C. Instantaneous Bandwidth for Signals and Spectrogram. **International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing**, p. 2451–2454, 1990. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/articleDetails.jsp?arnumber=116086>>. Acesso em: 6 maio. 2015.

COHEN, M. X. Assessing transient cross-frequency coupling in EEG data. **Journal of neuroscience methods**, v. 168, n. 2, p. 494–9, 15 mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18061683>>. Acesso em: 1 dez. 2014.

CORTES, C.; VAPNIK, V. Support-vector networks. **Machine Learning**, v. 20, n. 3, p. 273–297, set. 1995. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00994018>>.

DAUBECHIES, I. **Ten lectures on wavelets**. [s.l.] Society for Industrial and Applied Mathematics, 1992.

DREIFUSS, F. E. Juvenile myoclonic epilepsy: characteristics of a primary generalized epilepsy. **Epilepsia**, v. 30 Suppl 4, p. S1–S7; discussion S24–S27, 1989.

DUTRA MORAES, M. F.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic Kindling in the Wistar Rat: A Potential Model for Recruitment of Limbic Structures. **Epilepsy Research**, v. 39, n. 3, p. 251–259, 5 maio 2000. Disponível em: <<http://www.epires-journal.com/article/S0920121100001078/fulltext>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

ENGEL, A. K.; SINGER, W. Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 5, n. 1, p. 16–25, 2001.

ENGEL, J. Seizures and epilepsy. **Annals of Neurology**, v. 28, n. 3, p. 398–398, set. 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410280323>>. Acesso em: 29 nov. 2013.

EPSZTEIN, J.; REPRESA, A.; JORQUERA, I.; BEN-ARI, Y.; CRÉPEL, V. Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 36, p. 8229–39, 7 set. 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148230>>. Acesso em: 9 nov. 2015.

FAUST, O.; ACHARYA, U. R.; MIN, L. C.; SPUTH, B. H. C. Automatic identification of epileptic and background EEG signals using frequency domain parameters. **International journal of neural systems**, v. 20, n. 2, p. 159–76, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20411598>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

FISHER, R. The use of multiple measurements in taxonomic problems. **Annals of eugenics**, 1936. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-1809.1936.tb02137.x/full>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; ENGEL, J.; FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D. C.; LEE, B. I.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I. E.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/epi.12550>>.

FRANCIS, J. T.; GLUCKMAN, B. J.; SCHIFF, S. J. Sensitivity of neurons to weak electric fields. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 19, p. 7255–7261, 2003.

FRAZEN, N. Seizures and epilepsy: hope through research. **Bethesda, MD: NINDS**, 2000. Disponível em: <<http://doc146.minbooks.org/natalie-frazin-PDF-1462414.pdf>>. Acesso em: 6 nov. 2013.

GABOR, D. Theory of communication. Part 1: The analysis of information. **Electrical Engineers - Part III: Radio and Communication Engineering, Journal of the Institution of**, v. 93, n. 26, p. 429–441, 1946. Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5298517>.

GARCIA-CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; OLIVEIRA, J. A.; GOMES, E. L.; DEL BEL, E. A.; MELLO, L. E. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy research**, v. 26, n. 1, p. 177–92, dez. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985699>>. Acesso em: 26 ago. 2015.

GELZINIENE, G.; ENDZINIENE, M.; VAICIENE, N.; MAGISTRIS, M. R.; SEECK, M. Presurgical evaluation of epilepsy patients. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, p. 1683–1700, 2008.

GHOSH-DASTIDAR, S.; ADELI, H. A new supervised learning algorithm for multiple spiking neural networks with application in epilepsy and seizure detection. **Neural networks: the official journal of the International Neural Network Society**, v. 22, n. 10, p. 1419–31, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0893608009000653>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

GIBBS, J.; APPLETON, R. E. False diagnosis of epilepsy in children. **Seizure: the journal of the British Epilepsy Association**, v. 1, n. 1, p. 15–18, 1992.

GILLES, J. Empirical Wavelet Transform. **IEEE Transactions on Signal Processing**, v. 61,

n. 16, p. 3999–4010, ago. 2013. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6522142>>.

GULER, N.; UBEYLI, E.; GULER, I. Recurrent neural networks employing Lyapunov exponents for EEG signals classification. **Expert Systems with Applications**, v. 29, n. 3, p. 506–514, out. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0957417405000679>>. Acesso em: 28 nov. 2013.

HARRIS, S.; BRUYNS-HAYLETT, M.; KENNERLEY, A.; BOORMAN, L.; OVERTON, P. G.; MA, H.; ZHAO, M.; SCHWARTZ, T. H.; BERWICK, J. The effects of focal epileptic activity on regional sensory-evoked neurovascular coupling and postictal modulation of bilateral sensory processing. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, n. 10, p. 1595–604, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2013.115>>.

HUANG, N. E.; SHEN, Z.; LONG, S. R.; WU, M. C.; SHIH, H. H.; ZHENG, Q.; YEN, N.-C.; TUNG, C. C.; LIU, H. H. The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 454, n. 1971, p. 903–995, 8 mar. 1998. Disponível em: <<http://rspa.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspa.1998.0193>>. Acesso em: 8 ago. 2013.

IASEMIDIS, L. D. Epileptic seizure prediction and control. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 50, n. 5, p. 549–58, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769431>>.

IASEMIDIS, L.; SHIAU, D.-S. Long-term prospective on-line real-time seizure prediction. **Clinical ...**, v. 116, n. 3, p. 532–44, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721067>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

JENSEN, O.; COLGIN, L. L. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. **Trends in cognitive sciences**, v. 11, n. 7, p. 267–9, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548233>>.

JIANGTAO XI; CHICHARO, J. F. A New Algorithm for Improving the Accuracy of Periodic Signal Analysis. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, v. 45, n. 4, p. 827–831, 1996. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/articleDetails.jsp?arnumber=517004>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

JIRUSKA, P.; DE CURTIS, M.; JEFFERYS, J. G. R. Modern Concepts of Focal Epileptic Networks. In: [s.l: s.n.]p. 1–7.

JIRUSKA, P.; DE CURTIS, M.; JEFFERYS, J. G. R.; SCHEVON, C. a; SCHIFF, S. J.; SCHINDLER, K. Synchronization and desynchronization in epilepsy: controversies and hypotheses. **The Journal of physiology**, v. 591, n. Pt 4, p. 787–97, 15 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3591697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

JOHNSTON, D.; BROWN, T. H. The synaptic nature of the paroxysmal depolarizing shift in hippocampal neurons. **Annals of neurology**, v. 16 Suppl, p. S65–71, jan. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6095744>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

KALITZIN, S. N.; VELIS, D. N.; DA SILVA, F. H. L. Stimulation-based anticipation and control of state transitions in the epileptic brain. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 17, n. 3, p. 310–23, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20163993>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

KALITZIN, S.; PARRA, J.; VELIS, D. N.; LOPES DA SILVA, F. H. Enhancement of phase clustering in the EEG/MEG gamma frequency band anticipates transitions to paroxysmal epileptiform activity in epileptic patients with known visual sensitivity. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 49, n. 11, p. 1279–86, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450358>>.

KAMONDI, A.; ACSÁDY, L.; BUZSÁKI, G. Dendritic spikes are enhanced by cooperative network activity in the intact hippocampus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 3919–28, 15 maio 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570819>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

KIRA, K.; RENDELL, L. A practical approach to feature selection. **Proceedings of the ninth international workshop on ...**, 1992. Disponível em: <<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=656966>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

KLAASSEN, A.; GLYKYS, J.; MAGUIRE, J.; LABARCA, C.; MODY, I.; BOULTER, J. Seizures and enhanced cortical GABAergic inhibition in two mouse models of human autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 50, p. 19152–19157, 2006.

KONONENKO, I.; ŠIMEC, E.; ROBNIK-ŠIKONJA, M. Overcoming the Myopia of Inductive Learning Algorithms with RELIEFF. **Applied Intelligence**, v. 7, n. 1, p. 39–55, 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1008280620621>>. Acesso em: 31 maio. 2015.

KREUZ, T.; MORMANN, F.; ANDRZEJAK, R. G.; KRASKOV, A.; LEHNERTZ, K.; GRASSBERGER, P. Measuring synchronization in coupled model systems: A comparison of different approaches. **Physica D: Nonlinear Phenomena**, v. 225, n. 1, p. 29–42, jan. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167278906003836>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

LACHAUX, J.; RODRIGUEZ, E. Measuring phase synchrony in brain signals. **Human brain ...**, v. 208, p. 194–208, 1999. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/2499461_Measuring_Phase_Synchrony_in_Brain_Signals/file/60b7d52baa8c9a792b.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2014.

LE VAN QUYEN, M.; FOUCHER, J.; LACHAUX, J.; RODRIGUEZ, E.; LUTZ, a; MARTINERIE, J.; VARELA, F. J. Comparison of Hilbert transform and wavelet methods for the analysis of neuronal synchrony. **Journal of neuroscience methods**, v. 111, n. 2, p. 83–98, 2001.

- LE VAN QUYEN, M.; NAVARRO, V.; MARTINERIE, J.; BAULAC, M.; VARELA, F. J. Toward a neurodynamical understanding of ictogenesis. **Epilepsia**, v. 44 Suppl 1, p. 30–43, 2003.
- LISMAN, J. E. Relating Hippocampal Circuitry to Function. **Neuron**, v. 22, n. 2, p. 233–242, fev. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627300810855>>.
- MARTIS, R. J.; ACHARYA, U. R.; TAN, J. H.; PETZNICK, A.; YANTI, R.; CHUA, C. K.; NG, E. Y. K.; TONG, L. Application of empirical mode decomposition (emd) for automated detection of epilepsy using EEG signals. **International journal of neural systems**, v. 22, n. 6, p. 1250027, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23186276>>. Acesso em: 6 nov. 2013.
- MATSUMOTO, H.; MARSAN, C. Cortical Cellular Epilepsy : Phenomena in Experimental Ictal Manifestations. **Exp. Neurol.**, v. 326, p. 305–326, 1964.
- MEDEIROS, D. C.; OLIVEIRA, L. B.; MOURÃO, F. A. G.; BASTOS, C. P.; CAIRASCO, N. G.; PEREIRA, G. S.; MENDES, E. M. A. M.; MORAES, M. F. D. Temporal Rearrangement of Pre-ictal PTZ Induced Spike Discharges by Low Frequency Electrical Stimulation to the Amygdaloid Complex. **Brain stimulation**, p. 1–9, 25 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332185>>. Acesso em: 22 dez. 2013.
- MEDEIROS, D. D. C.; MORAES, M. F. D. Focus on desynchronization rather than excitability: A new strategy for intraencephalic electrical stimulation. **Epilepsy & behavior : E&B**, 25 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472684>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
- MORAES, M. F. D. **Epilepsia experimental: estudos eletrofisiológicos e comportamentais em modelos animais de crises convulsivas audiogênicas**. 1998. Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1998.
- MORAES, M. F. D.; DEL VECCHIO, F.; TERRA, V. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Time evolution of acoustic “information” processing in the mesencephalon of Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 284, n. 1-2, p. 13–16, 2000.
- MORMANN, F.; ANDRZEJAK, R. G.; ELGER, C. E.; LEHNERTZ, K. Seizure prediction: the long and winding road. **Brain : a journal of neurology**, v. 130, n. Pt 2, p. 314–33, fev. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008335>>. Acesso em: 11 dez. 2013.
- MORMANN, F.; LEHNERTZ, K.; DAVID, P.; E. ELGER, C. Mean phase coherence as a measure for phase synchronization and its application to the EEG of epilepsy patients. **Physica D: Nonlinear Phenomena**, v. 144, n. 3-4, p. 358–369, out. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167278900000877>>.
- O’DONNELL, B. F.; VOHS, J. L.; KRISHNAN, G. P.; RASS, O.; HETRICK, W. P.; MORZORATI, S. L. The auditory steady-state response (ASSR): A translational biomarker for schizophrenia. **Supplements to Clinical Neurophysiology**, v. 62, n. October 2015, p. 101–112, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702053078000065>>.
- ODA, Y. Gamma band neural synchronization deficits for auditory steady state

responses in bipolar disorder patients. **Seishin shinkeigaku zasshi = Psychiatria et neurologia Japonica**, v. 116, n. 3, p. 245–53, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24783449>>.

OLIVER, D. L.; KUWADA, S.; YIN, T. C.; HABERLY, L. B.; HENKEL, C. K. Dendritic and axonal morphology of HRP-injected neurons in the inferior colliculus of the cat. **The Journal of comparative neurology**, v. 303, n. 1, p. 75–100, 1 jan. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2005240>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

ONSLOW, A. C. E.; BOGACZ, R.; JONES, M. W. Quantifying phase-amplitude coupling in neuronal network oscillations. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 105, p. 49–57, 2011.

OWEIS, R. J.; ABDULHAY, E. W. Seizure classification in EEG signals utilizing Hilbert-Huang transform. **Biomedical engineering online**, v. 10, n. 1, p. 38, jan. 2011a. Disponível em: <<http://www.biomedical-engineering-online.com/content/10/1/38>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

OWEIS, R. J.; ABDULHAY, E. W. Seizure classification in EEG signals utilizing Hilbert-Huang transform. **Biomedical engineering online**, v. 10, n. 1, p. 38, jan. 2011b. Disponível em: <<http://www.biomedical-engineering-online.com/content/10/1/38>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

OZEN, S.; SIROTA, A.; BELLUSCIO, M. A.; ANASTASSIOU, C. A.; STARK, E.; KOCH, C.; BUZSÁKI, G. Transcranial electric stimulation entrains cortical neuronal populations in rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 34, p. 11476–85, 25 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2937280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 set. 2015.

PACHORI, R. B. Discrimination between Ictal and Seizure-Free EEG Signals Using Empirical Mode Decomposition. **Research Letters in Communications**, v. 2008, p. 1–5, 2008. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jece/2008/293056/>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.: s.n.]

PENNY, W. D.; DUZEL, E.; MILLER, K. J.; OJEMANN, J. G. Testing for nested oscillation. **Journal of neuroscience methods**, v. 174, n. 1, p. 50–61, 15 set. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2675174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

PEREIRA, H. P. **Avaliação da via acústica através de respostas auditivas evocadas em regime permanente nos ratos wistar audiogênicos**. 2014. Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

PICTON, T. W.; HILLYARD, S. A.; KRAUSZ, H. I.; GALAMBOS, R. Human auditory evoked potentials. I: Evaluation of components. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 36, p. 179–190, jan. 1974. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013469474901552>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

PICTON, T. W.; JOHN, M. S.; DIMITRIJEVIC, A.; PURCELL, D. Human auditory steady-state responses. **International journal of audiology**, v. 42, n. 4, p. 177–219, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790346>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S. L. **Models of seizures and epilepsy**. [s.l.] Elsevier, 2006.

QUIAN QUIROGA, R.; KRASKOV, a.; KREUZ, T.; GRASSBERGER, P. Performance of different synchronization measures in real data: A case study on electroencephalographic signals. **Physical Review E**, v. 65, n. 4, p. 041903, mar. 2002. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.65.041903>>. Acesso em: 7 out. 2014.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 553–564, jul. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn1430>>. Acesso em: 24 set. 2015.

ROSS, B.; HERDMAN, A. T.; PANTEV, C. Right hemispheric laterality of human 40 Hz auditory steady-state responses. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 15, n. 12, p. 2029–39, 1 dez. 2005. Disponível em: <<http://cercor.oxfordjournals.org/content/15/12/2029.short>>. Acesso em: 1 dez. 2015.

SACKELLARES, J.; IASEMIDIS, L.; SHIAU, D. Epilepsy—when chaos fails. **Chaos in the ...**, n. 1, p. 1–22, 2000. Disponível em: <<http://plus.maths.org/issue35/features/dartnell/feat.pdf>>. Acesso em: 6 dez. 2013.

SAKATA, S.; YAMAMORI, T.; SAKURAI, Y. 7-12 Hz cortical oscillations: behavioral context and dynamics of prefrontal neuronal ensembles. **Neuroscience**, v. 134, n. 4, p. 1099–1111, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16019153>>.

SCARLATELLI-LIMA, A. V; MAGALHÃES, L. H. M.; DORETTO, M. C.; MORAES, M. F. D. Assessment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock, pentylenerazole and pilocarpine. **Brain research**, v. 960, n. 1-2, p. 184–9, 17 jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505671>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

SCHARFMAN, H. E. The neurobiology of epilepsy. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 7, n. 4, p. 348–354, 2007.

SCHELTER, B.; TIMMER, J.; SCHULZE-BONHAGE, A. **Seizure prediction in epilepsy: from basic mechanisms to clinical applications**. [s.l.: s.n.]

SCHULZE-BONHAGE, A.; FELDWISCH-DRENTROP, H.; IHLE, M. The role of high-quality EEG databases in the improvement and assessment of seizure prediction methods. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 22 Suppl 1, p. S88–93, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078525>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

SILVA, F. L. da; NIEDERMEYER, E. **Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields**. Fifth edit ed. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

SILVA, L. R.; AMITAI, Y.; CONNORS, B. W. Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. **Science (New York, N.Y.)**, v. 251, n. 4992, p. 432–5, 25 jan. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1824881>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

SMITH, D.; DEFALLA, B. a; CHADWICK, D. W. The misdiagnosis of epilepsy and the management of refractory epilepsy in a specialist clinic. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians**, v. 92, n. 1, p. 15–23, 1999.

SPENCER, K. M.; NESTOR, P. G.; NIZNIKIEWICZ, M. a; SALISBURY, D. F.; SHENTON, M. E.; MCCARLEY, R. W. Abnormal neural synchrony in schizophrenia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 19, p. 7407–7411, 2003.

STACEY, W. C.; LITT, B. Technology insight: neuroengineering and epilepsy-designing devices for seizure control. **Nature clinical practice. Neurology**, v. 4, n. 4, p. 190–201, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2904395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

STEVEN J. LUCK. **An introduction to the event-related potential technique**. [s.l.: s.n.]

STROINK, H.; VAN DONSELAAR, C. a; GEERTS, a T.; PETERS, a C. B.; BROUWER, O. F.; ARTS, W. F. M. The accuracy of the diagnosis of paroxysmal events in children. **Neurology**, v. 60, n. 6, p. 979–982, 2003.

TASS, P.; ROSENBLUM, M. G.; WEULE, J.; KURTHS, J.; PIKOVSKY, a.; VOLKMANN, J.; SCHNITZLER, a.; FREUND, H.-J. Detection of n:m Phase Locking from Noisy Data: Application to Magnetoencephalography. **Physical Review Letters**, v. 81, n. 15, p. 3291–3294, out. 1998. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.81.3291>>.

THOMSON, D. Spectrum estimation and harmonic analysis. **Proceedings of the IEEE**, v. 70, 1982. Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=1456701>. Acesso em: 14 ago. 2014.

TORT, A. B. L.; KOMOROWSKI, R.; EICHENBAUM, H.; KOPELL, N. Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. **Journal of neurophysiology**, v. 104, n. 2, p. 1195–210, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2941206&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 29 dez. 2014.

TRAUB, R. D.; MICHELSON-LAW, H.; BIBBIG, A. E. J.; BUHL, E. H.; WHITTINGTON, M. A. Gap junctions, fast oscillations and the initiation of seizures. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 548, p. 110–22, jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15250590>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

UHLHAAS, P. J.; SINGER, W. Neural Synchrony in Brain Disorders: Relevance for Cognitive Dysfunctions and Pathophysiology. **Neuron**, v. 52, n. 1, p. 155–168, 2006.

ULDALL, P.; ALVING, J.; HANSEN, L. K.; KIBAEK, M.; BUCHHOLT, J. The misdiagnosis of

epilepsy in children admitted to a tertiary epilepsy centre with paroxysmal events. **Archives of disease in childhood**, v. 91, n. 3, p. 219–221, 2006.

VALENTÍN, A.; ALARCÓN, G.; HONAVAR, M.; GARCÍA SEOANE, J. J.; SELWAY, R. P.; POLKEY, C. E.; BINNIE, C. D. Single pulse electrical stimulation for identification of structural abnormalities and prediction of seizure outcome after epilepsy surgery: a prospective study. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 11, p. 718–726, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442205702003>>.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A.; DINGLEDINE, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, v. 69, p. 16–24, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3447120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 dez. 2015.

VOYTEK, B.; D'ESPOSITO, M.; CRONE, N.; KNIGHT, R. A method for event-related phase/amplitude coupling. **Neuroimage**, p. 416–424, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053811912009330>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

WATSON, J. **Support Vector Machine (and Statistical Learning Theory) Tutorial** NEC Labs America, , 26 ago. 2011. .

WELCH, P. The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: a method based on time averaging over short, modified periodograms. **IEEE Transactions on audio and electroacoustics**, n. 2, p. 70–73, 1967. Disponível em: <http://148.204.64.201/paginas_anexas/voz/articulos_interesantes/IEEE_DSP/IEEE_DSP/55.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2014.

WESTNEAT, M. W.; HAL, W. G. Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: An electromyographic analysis of suckling and chewing. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 3, p. 539–554, 1992. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.106.3.539>>.

WIDMANN, A.; SCHRÖGER, E.; MAESS, B. Digital filter design for electrophysiological data - a practical approach. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 250, p. 34–46, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.08.002>>.

WINER, J. A.; SCHREINER, C. E. **The inferior colliculus**. [s.l.] Springer, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact Sheet about Epilepsy**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>>. Acesso em: 17 mar. 2015.

6. Anexos

O anexo 6.1 contém o certificado CEUA para os experimentos utilizados neste trabalho.

Nos anexos seguintes (6.2 em diante), estão contidas análises voltadas para a extração de informações dos sinais obtidos nos capítulos 2 e 3. Porém, os resultados e dados disponíveis são insuficientes para a confirmar ou refutar as hipóteses desejadas. Ainda assim, os resultados podem servir de motivação ou suporte para futuros trabalhos, de modo que seu registro nos apêndices deste trabalho se faz pertinente.

O anexo 6.4 contém a abordagem preliminar deste trabalho, que lida com a avaliação de métodos de decomposição de sinais na classificação de registros em uma base de dados de epilepsia. Com a mudança de escopo, optou-se por incluir esta parte do trabalho como anexo.

6.1.CERTIFICADO CEUA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 24 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação da via acústico-límbica através de respostas auditivas evocadas em regime permanente nos Wistar Audiogenic Rats (WARs)", que tem como responsável Márcio Flávio Dutra Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 13/06/2013. Este certificado espira-se em 13/06/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 24 / 2013, related to the Project entitled "Acoustic-lymbic network assesment by auditory steady state responses in Wistar Audiogenic Rats (WARs)", under the supervision of Márcio Flávio Dutra Moraes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 13/06/2013. This certificates expires in 13/06/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 13/06/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

6.2. DINÂMICA DA ASSR

Além de quantificar o grau de excitabilidade, pode ser de interesse a análise da dinâmica de atividade neural responsável pela ASSR. Uma das questões seria se a oscilação da resposta em $53,71\text{Hz}/92,77\text{Hz}$ permanece com amplitude relativamente constante ou é modulada em amplitude. E se há presença de modulação, qual a frequência ou banda que é mais influente. Para tal, é necessária a representação de energia da ASSR com alta resolução temporal, que pode ser obtida por meio da Transformada de Hilbert.

Para a extração da energia do sinal em determinada banda utilizando a Transformada de Hilbert, primeiramente é necessária a filtragem do sinal na banda de interesse. Neste trabalho, aplicamos um filtro *butterworth* de 6ª ordem no sinal original, com frequências de corte definidas pela banda de interesse, seguido da aplicação do filtro em direções opostas para eliminar distorções de fase (*zero phase filtering*). A escolha de um filtro IIR é recomendada neste caso, pois bandas de transição abruptas são desejáveis (de modo a evitar overlap de ritmos nos sinais filtrados de cada banda) (WIDMANN; SCHRÖGER; MAESS, 2014). Além disso, os algoritmos foram feitos para facilitar a mudança de parâmetros deste tipo, de modo que testes com filtro FIR também foram feitos, mas estes não apresentaram bom desempenho ao rejeitar a banda ASSR para definição do sinal de $f_{\text{gamma}}(t)$.

Como desejamos analisar características da modulação em amplitude da ASSR, $ASSR_{BW}$ deve ser igual ou maior que a frequência de modulação, pois o sinal filtrado deve incluir eventuais bandas laterais (*sidebands*) presentes no espectro do sinal AM. Processos de modulação deste tipo seriam desempenhados por ritmos mais lentos, de modo que $ASSR_{BW} = 10\text{ Hz}$ para as análises das próximas seções.

6.2.1. Variância intra-trial $A_{ASSR}(t)$

O primeiro conjunto destas características é relacionado com a distribuição dos valores de amplitude (Envelope de Hilbert) do sinal filtrado em $f_m \pm 10\text{Hz}$, representando a ASSR e eventuais modulações em amplitude, em cada *trial*. Após a

extração de $A(t)$ do segmento de interesse, é calculada a variância da distribuição, normalizada pelo respectivo basal.

A variância de $A(t)$ é uma medida da dispersão dos valores da amplitude da resposta evocada de cada *trial*. Ou seja, quanto menor a variância, mais concentrada é a distribuição dos valores de amplitude ao longo do *trial*, significando uma resposta mais estável em relação à excitabilidade. A Variância de $A(t)$ é definida por:

$$Var(A) = E[(A - \mu)^2] = Cov(A, A)$$

Onde μ é a média – $\mu = E[A]$.

6.2.1.1. Resultados

As figuras a seguir mostram as comparações entre a variância normalizada da ASSR, entre WARs e Wistars no protocolo de 85 dB, separando *trials* de 53 Hz e 92 Hz. Como as distribuições foram rejeitadas em testes de normalidade (KS e Shapiro-Wilk), foram utilizados testes não-paramétricos – Kruskal-Wallis com *Post Hoc de Dunn*.

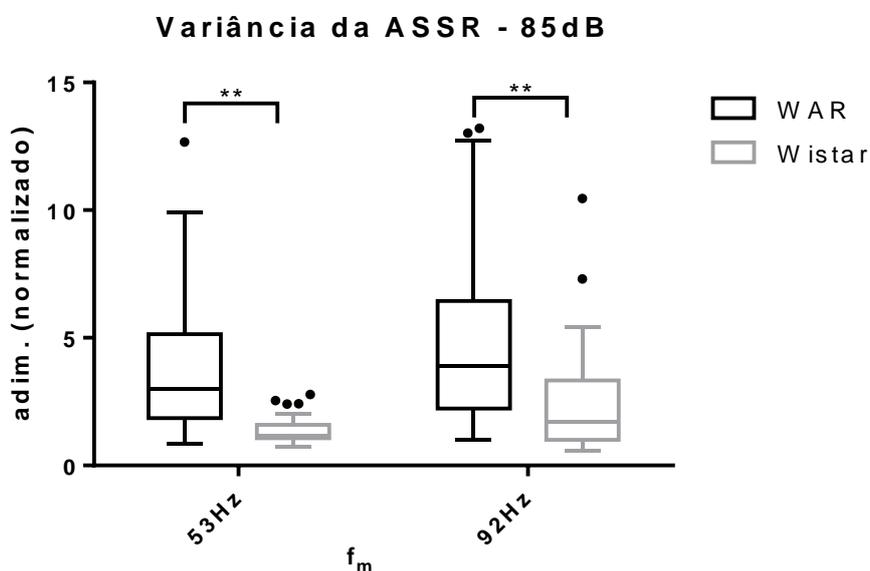


Figura 27: Variância intra-trial da ASSR, nos trials de 53 Hz e 92 Hz do protocolo de 85 dB. Dados representados como boxplot (tukey). Kruskal-Wallis com *Post Hoc de Dunn*. $**p \leq 0.01$

Em ambos os casos, WARs apresentam maior variância intra-*trial* da ASSR, sugerindo uma resposta com amplitude menos oscilatória em animais saudáveis. A seguir, são mostrados os valores para o protocolo de 110 dB.

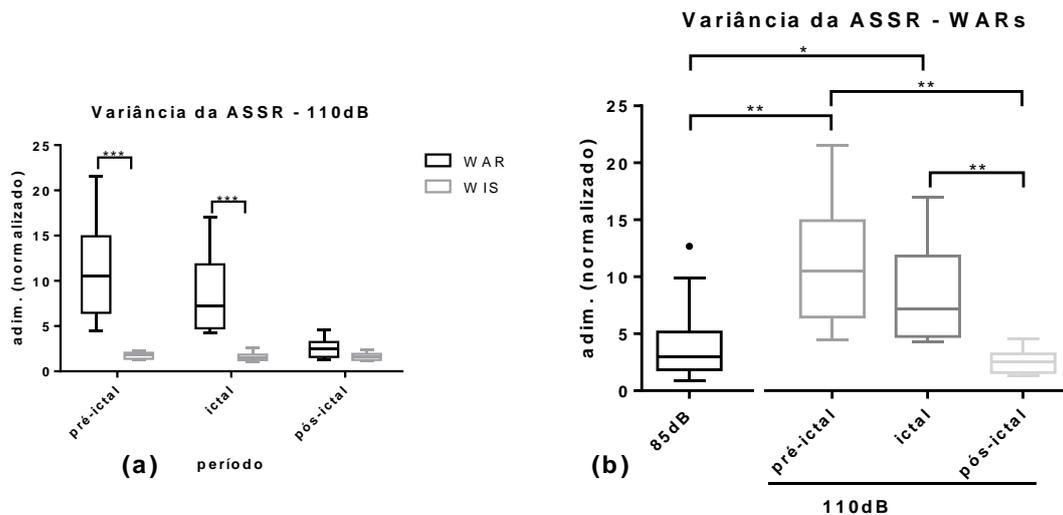


Figura 28: Variância intra-trial da ASSR, protocolo de 110 dB. (a) comparando WAR com Wistars (b) comparando entre os estágios do WAR. Dados representados como boxplot (tukey). Kruskal-Wallis com *Post Hoc de Dunn*. * $p \leq 0.05$. ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$

Exceto no pós-ictal, a variância da ASSR de WARs é maior que em animais Wistar. Nos períodos pré-ictal e ictal, os altos valores do gráfico indicam grande variabilidade na amplitude da resposta, que volta a níveis normais (comparáveis com os valores de 85 dB) após a CA. Isto pode indicar que, antes e durante a crise, há alterações nos processos de modulação do processamento auditivo, resultando em respostas mais instáveis. Nas seções a seguir, outros atributos são analisados para avaliar tal hipótese.

6.2.2. Características do envelope da ASSR: Centroide espectral e energia de $A'_{ASSR}(t)$

Com a extração do envelope de amplitude da ASSR, temos um sinal $A_{ASSR}(t)$, do mesmo tamanho do sinal filtrado/original $s(t)$. Considerando que ocorra modulação em amplitude, $A_{ASSR}(t)$ será um sinal oscilatório, cuja análise espectral poderá indicar características desta modulação. Neste caso, o nível DC e tendências de $A_{ASSR}(t)$ não são de interesse para a análise. Assim definimos $A'_{ASSR}(t)$ como a versão retificada do envelope de amplitude da ASSR, obtida ao filtrar $A_{ASSR}(t)$ com um passa-altas em 0,8 Hz.

O espectro de $A'_{ASSR}(t)$ pode ser analisado por meio da estimação de sua Densidade Espectral (PSD – Power Spectral Density). Neste trabalho, a estimação foi feita por meio do método de *multitaper* de Thomson (THOMSON, 1982). Este método obtém uma estimativa consistente da PSD de um sinal por meio da promediação de diferentes estimativas independentes do espectro. Cada estimativa é obtida por meio da multiplicação do sinal com *tapers* (funções para o janelamento do sinal) ortogonais entre si e com boas propriedades de concentração espectral, definidas como sequências *Slepian*. Cada periodograma k associado a uma sequência *Slepian* $g_{k,n}$ como janela é dado por:

$$S_k(f) = \Delta t \left| \sum_{n=0}^{N-1} g_{k,n} x_n e^{-i2\pi f n \Delta t} \right|^2$$

Em sua forma mais simples, a estimativa da PSD por *Multitaper* é feita então ao tirar a média de S_k . Outras variantes utilizam fatores de ponderação para levar em conta diferenças de concentração de energia em cada sequência *Slepian*, além da relação desta com propriedades espectrais do sinal (variante escolhida neste trabalho). Este método foi implementado no trabalho com a função *pmtm* do Toolbox de Processamento de Sinais do MATLAB (r2013b).

Após a estimação da PSD de $A'_{ASSR}(t)$, temos $P_{xx}(f)$. Desta função, extraímos a Centroide Espectral (*CE*), uma medida que pode ser vista como o “centro de massa” da PSD, indicando a banda de frequências com maior concentração de coeficientes (eq. (8)). Também foi extraída a entropia espectral, um indicador da dispersão de $P_{xx}(f)$. Ou seja, caso o espectro de $A'_{ASSR}(t)$ seja marcado por poucos coeficientes com grande magnitude, temos um sinal modulado por frequências específicas e, conseqüentemente, esparso. Mas caso $P_{xx}(f)$ seja relativamente uniforme, teremos um valor maior. Porém, como este índice se mostrou dependente do tamanho do trecho do sinal utilizado, não foi incluído nos resultados finais.

Os valores foram calculados em uma versão de $P_{xx}(f)$, cujos coeficientes de frequência são limitados de 0 até 16 Hz, uma vez que ritmos de frequência acima da banda *beta* dificilmente estariam envolvidos em processos de modulação de amplitude da ASSR.

Por fim, é calculada a energia de $A'(t)$, resultando no atributo de Energia do Envelope retificado (EE):

$$EE = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \|A'_{ASSR}(t)\|$$

Este parâmetro está relacionado com a Energia espectral de $A'_{ASSR}(t)$. Ou seja, quanto mais oscilações da ASSR, maior é o valor de EE .

6.2.2.1. Resultados

São extraídos dois atributos: Potência de A'_{ASSR} e Centroide Espectral, calculado sobre a PSD (multitaper de Thomson) de A'_{ASSR} , limitando os ritmos de interesse (delta até alpha), utilizando somente coeficientes correspondendo a frequências de 1Hz até 16Hz para os cálculos dos atributos.

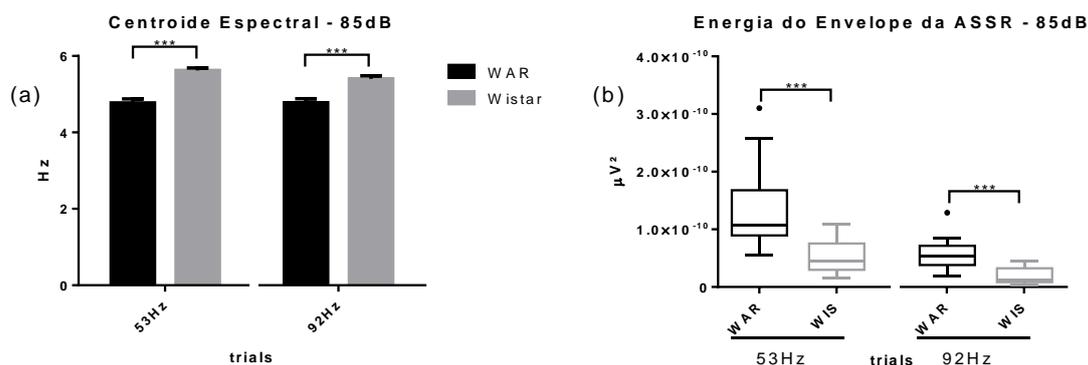


Figura 29: Atributos de $A'_{ASSR}(t)$. (a) Centroide espectral, nos trials de 53 Hz e 92 Hz do protocolo de 85 dB. Diferenças estatísticas encontradas nos dois casos (Two-Way anova, *post hoc* de Bonferroni). Dados representados como média+SEM (b) Potência de $A'_{ASSR}(t)$. Diferenças estatísticas encontradas com teste de Kruskal-Wallis, correção de Dunn. Dados representados como Tukey Boxplot.

Em WARs, a potência de $A'_{ASSR}(t)$ é elevada, significando uma ASSR com amplitude mais oscilatória. Este resultado está de acordo com o encontrado pela variância, o que pode indicar que há certa “instabilidade” em processos de modulação top-down envolvidos no processamento auditivo de animais icogênicos. Ou seja, animais normais teriam uma ASSR menor, mas relativamente estável em magnitude, enquanto a de WARs seria mais afetada por processos de modulação em amplitude. As Figuras a seguir mostram os resultados para o protocolo de 110 dB.

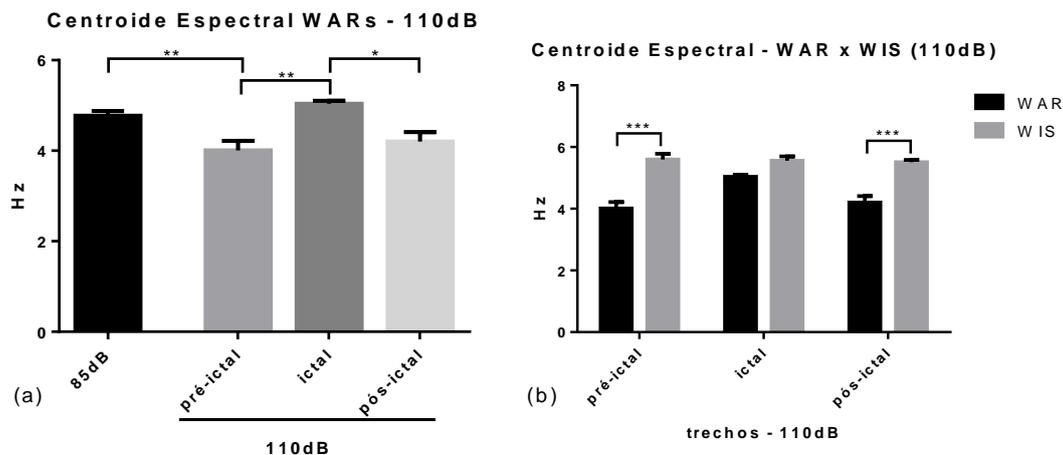


Figura 30: Centroide espectral de $A'_{ASSR}(t)$, protocolo de 110 dB. (a) Comparação entre trechos pré-ictal, ictal, pós-ictal e 85 dB (controle). Anova de uma via, com correção Bonferroni. (b) Comparação entre WARs e respectivos trechos Wistar. Anova de duas vias, com correção bonferroni. Dados representados como média + SEM.

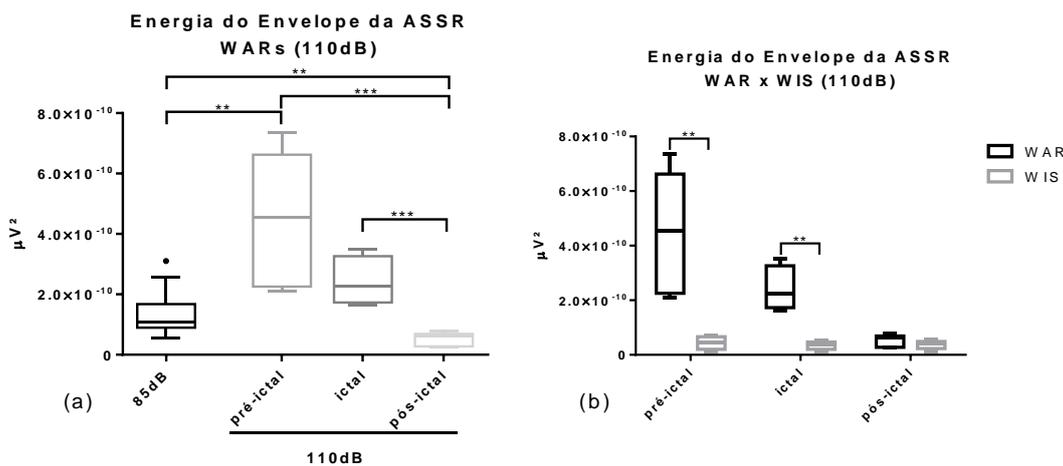


Figura 31: Potência de $A'_{ASSR}(t)$, no protocolo de 110 dB. (a) Comparações entre estágios pré-ictal, ictal e pós-ictal, de animais WAR, além dos trials de 53 Hz do protocolo de 85dB. (b) Comparações entre valores de WARs e Wistars. Dados representados como Tukey Boxplots. Diferenças estatísticas encontradas com teste de Kruskal-Wallis, correção de Dunn.

No pré-ictal e durante a crise, a ASSR é mais oscilatória que valores “normais” em WARs (protocolo de 85 dB) e respectivos controles Wistar. No pós-ictal, com o “desligamento” de grande parte dos circuitos endógenos do sistema, que ainda fica responsivo a estímulos, a ASSR é estável, com valores semelhantes a animais saudáveis, mas abaixo dos valores “basais” de WARs. Ou seja, na iminência de uma crise, o sistema é responsivo a estímulos (evidenciado pela potência da ASSR no capítulo 3), mas a resposta é mais instável em termos de sincronismo com o som (PLV

da hipótese IV) e em amplitude do envelope. Isto é ligeiramente reduzido no período ictal, onde parte do sistema de processamento estaria dissociado do foco ictal e respondendo “normalmente”. Após a CA, a manutenção da potência da ASSR, elevação do PLV e diminuição da potência do envelope da ASSR indicam que o grande parte do sistema está em período hipoexcitável, mas este é plenamente responsivo a estímulos, relativamente livre de processos de modulação ou interferências.

Um fator que traz dúvidas a tal conclusão é se as oscilações na ASSR são efetivamente processos de modulação da ASSR, ou se são componentes de *Gamma*, que variam em certos estágios da crise. No pré-ictal, isto não aparenta ser o caso, uma vez que a potência em Gamma não é alterada significativamente (capítulo 3), mas a potência do envelope da ASSR é maior. Porém, nos períodos ictal e pós-ictal, há uma correlação entre os resultados, com a potência maior em Gamma e $A'_{ASSR}(t)$, e menor no pós-ictal de ambos. Um modo de resolver esse problema seria a detecção de um acoplamento em amplitude entre sinais, onde um atributo de uma componente (como fase ou amplitude) afetaria a amplitude da ASSR. Porém, o protocolo utilizado não é ideal para verificar isto, pois somente um canal é utilizado. Não obstante, o acoplamento entre diferentes componentes de frequência de um mesmo canal é avaliado na próxima seção.

6.3. MODULAÇÃO FASE-AMPLITUDE

Neste trabalho, foram propostos métodos de quantificação de dinâmicas da ASSR relacionados à sua modulação em amplitude. Porém, não foram investigados índices de **acoplamento**, ainda que as características apresentadas possam estar indiretamente relacionadas com tal fenômeno. Ou seja, foram analisadas características de modulação de somente uma componente (A_{ASSR} , representando a amplitude ou envelope da ASSR), ao invés de analisar características de duas componentes (ou dois sinais) e a relação entre estes (onde o estado de uma componente é regido por um atributo do outro componente, por exemplo).

Como descrito na Figura 3, processos de acoplamento podem ocorrer de diversas maneiras; entre sinais diferentes ou entre componentes de um único sinal,

em somente uma banda de frequência ou entre bandas, com diferentes combinações de relações de fase, amplitude e frequência. Nesta seção, temos interesse em analisar um modo de CFC (*Cross-frequency Coupling*) denominado PAC (*Phase Amplitude Coupling*), caracterizado pelo acoplamento de fase de uma baixa frequência com a amplitude de uma componente de alta frequência.

A modulação de amplitude de um oscilador de alta frequência pela fase de um de baixa frequência é denominada PAC (ou *nesting*, ou CFC – Cross-Frequency Coupling). Este tipo de interação tem recebido interesse com a detecção de sua ocorrência em diversos contextos (CANOLTY et al., 2006a; COHEN, 2008; TORT et al., 2010; ONSLOW; BOGACZ; JONES, 2011; STEVEN J. LUCK, 2014), com indícios de que este tipo de acoplamento pode ter papel fundamental em cognição e processamento de informações (TORT et al., 2010; VOYTEK et al., 2013; ARU; PRIESEMANN; WIBRAL, 2014). Visto que crises epilépticas são distúrbios na comunicação neural e processamento de informações, sua investigação pode esclarecer dúvidas a respeito da dinâmica de ictogênese. Isto motivou a aplicação de métodos de estimação de PAC (CANOLTY et al., 2006a; TORT et al., 2010) nos sinais obtidos neste trabalho.

Não há consenso a respeito do índice de estimação de PAC mais indicado para registros de EEG ou LFP. Entre alguns dos índices propostos, temos o MVL (*Mean Vector Length*) publicado por (CANOLTY et al., 2006a), o MI (*Modulation Index*) de (TORT et al., 2010) e o SI (*Synchronization Index*) de (COHEN, 2008), cuja abordagem é semelhante à da seção 2.2.2, com a componente de baixa frequência sendo extraída da PSD do envelope da componente de alta frequência.

Para a escolha dos índices de PAC a serem utilizados neste trabalho, consideramos o desempenho destes segundo alguns critérios de interesse, de acordo com a literatura. Primeiramente, é desejável que o índice seja capaz de quantificar a intensidade do acoplamento (e não somente se ocorre ou não), para fins de comparação entre os grupos e para análise de sua dinâmica ao longo do tempo. Além disso, a estimativa de PAC deve ser independente da amplitude da componente de alta frequência, pois esta varia entre grupos e suas amostras. Por fim, também é desejável que o método seja robusto ao ruído, sempre presente de algum modo em sinais de

EEG/LFP e que pode produzir resultados espúrios em análises de CFC (ARU; PRIESEMANN; WIBRAL, 2014), ou mascarar acoplamentos existentes. Assim, escolhemos o índice MI (TORT et al., 2010), que além destes requisitos, é sensível à características como largura de modulação e multimodalidade na distribuição de amplitude em função da fase. Para maiores detalhes relativos a critérios de comparação entre índices de CFC, conferir (TORT et al., 2010) e (PENNY et al., 2008). Outros trabalhos comparando outros métodos de quantificação de sincronismo são (KREUZ et al., 2007), (QUIAN QUIROGA et al., 2002) e (LE VAN QUYEN et al., 2001).

6.3.1.1. Modulation Index – MI

O MI, proposto por (TORT et al., 2010), é um método de quantificação de PAC, onde a amplitude de uma componente de alta frequência está relacionada com a fase de uma componente de baixa frequência. O índice é baseado na distribuição de amplitude (alta frequência) em função da fase (baixa frequência), e os passos para sua obtenção são descritos a seguir.

O primeiro passo consiste na extração dos sinais $x_p(t)$ e $x_A(t)$, correspondendo às componentes de baixa e alta frequência, respectivamente. Estes são obtidos ao filtrar o sinal original $x_{raw}(t)$ (ou cada um de um canal diferente, para analisar acoplamento entre componentes de diferentes sinais) nas respectivas bandas de frequência f_{low} e f_{hi} . Por meio da Transformada de Hilbert de $x_p(t)$ e $x_A(t)$, são obtidas $\phi_{f_p}(t)$ e $A_{f_A}(t)$, representando a fase instantânea de $x_p(t)$ e amplitude do envelope de $x_A(t)$, respectivamente (Conferir seção 2.3.1.2 para detalhes da obtenção de fase e amplitude da Transformada de Hilbert de um sinal). Assim, temos uma série temporal composta $[\phi_{f_p}(t), A_{f_A}(t)]$, contendo a respectiva amplitude do envelope e a fase instantânea para cada amostra das componentes analisadas. A Figura 32 mostra um trecho de um sinal de LFP de um rato durante uma crise induzida por PTZ, onde é evidente a presença de PAC. A componente de Alta frequência $x_A(t)$ é obtida filtrando o sinal original em $[48\ 78]Hz$, e $x_p(t)$ filtrando em $[4\ 8]Hz$.

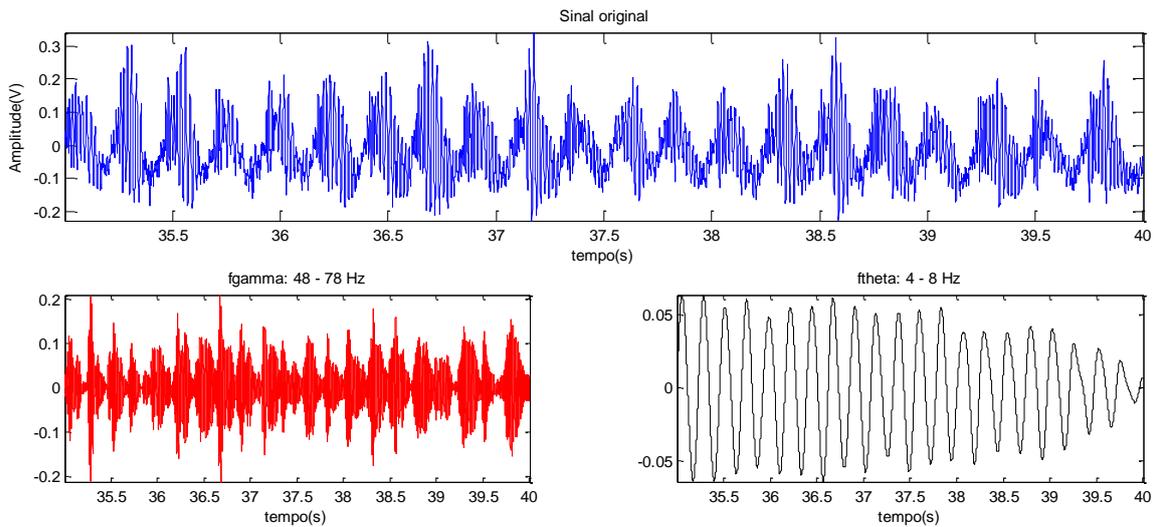


Figura 32: Filtragem de sinais para índice PAC. Sinal original (superior) e componentes filtradas. Inferior à esquerda - $x_A(t)$. Inferior à direita - $x_p(t)$

Em seguida, é construída a distribuição dos valores de amplitude em função de valores de fase. Isto é feito delimitando faixas de tamanhos iguais para valores de fase (*bins*) durante todo o intervalo de $-\pi$ a $+\pi$, calculando a média dos valores de $A_{f_A}(t)$ associados aos respectivos valores $\phi_{f_p}(t)$ de cada faixa. Assim, temos $\langle A_{f_A} \rangle_{f_p}(j)$, a média dos valores de A_{f_A} de cada faixa (*bin*) j . Em seguida, a distribuição é normalizada de acordo com a soma dos valores de $A_{f_A}(t)$, de modo a obter uma FDP (função densidade de probabilidade) discreta $P(j)$:

$$P(j) = \frac{\langle A_{f_A} \rangle_{f_p}(j)}{\sum_{k=1}^N \langle A_{f_A} \rangle_{f_p}(k)}$$

Onde N é o número de *bins*. A Figura 33a mostra $\phi_{f_p}(t)$, $A_{f_A}(t)$ e $x_A(t)$ de um trecho ampliado da Figura 32, e a respectiva função de distribuição de amplitude $P(j)$ é mostrada na Figura 33b

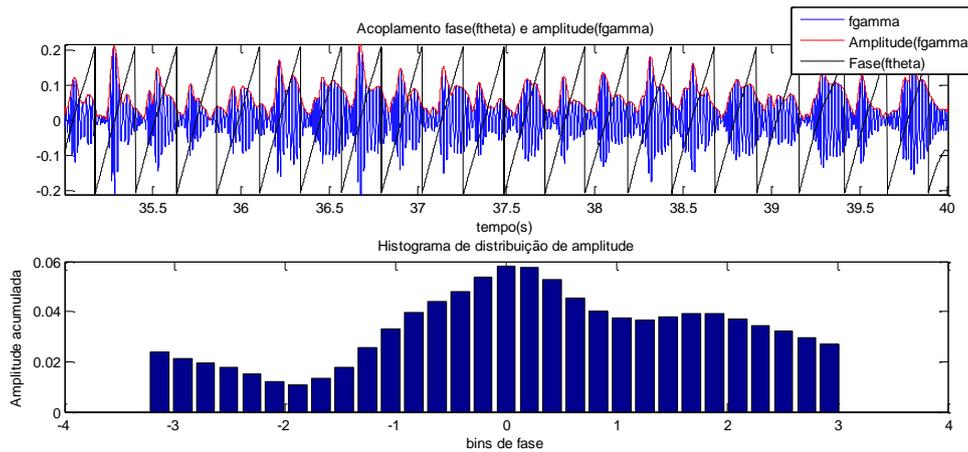


Figura 33: Acoplamento fase-amplitude. (a): Trechos de $x_A(t)$, $A_{f_A}(t)$ e $\phi_{f_p}(t)$. Note que as oscilações de $A_{f_A}(t)$ resultam em valores maiores perto dos mesmos valores de fase em $\phi_{f_p}(t)$ (série de fase teve a escala ajustada para visualização no gráfico), resultando na distribuição não-uniforme no gráfico inferior (b) $P(j)$, onde a média maior de amplitude está associada em valores de fase mais próximos de 0.

Na distribuição $P(j)$, a presença de acoplamento fase-amplitude é evidenciada na presença de picos ou não-uniformidades. Ou seja, determinados valores de fase estão associados a maiores amplitudes; no caso de ausência total de PAC, a distribuição $P(j)$ seria uniforme. Assim, o índice MI é definido de acordo com a medida de distância (distância KL, Kullback-Leibler) entre $P(j)$ e uma distribuição uniforme discreta $U(j)$ (TORT et al., 2010);

$$MI = \frac{D_{KL}(P, U)}{\log(N)}$$

$$D_{KL}(P, U) = \sum_{j=1}^N P(j) \log \left[\frac{P(j)}{Q(j)} \right]$$

Assim, o índice MI varia de 0, para ausência total de acoplamento e uma distribuição uniforme, até $MI = 1$, máximo acoplamento onde $P(k) = 1$ para somente uma *bin* k e $P(j) = 0$ para as demais *bins*.

Para evitar índices de acoplamento espúrios devido a ruído e distribuições de fase individuais não-uniformes, é comum a utilização de índices validados estatisticamente por meio de séries substitutas (*surrogates*). Estas são geradas ao “embaralhar” uma das séries de fase ou amplitude (utilizamos a série de amplitude $A_{f_A}(t)$), preservando as características de sua distribuição, mas destruindo sua relação temporal com a outra série ($\phi_{f_p}(t)$). Assim, várias séries substitutas

$A_{f_{ASurrogate}}(t)$ são geradas, e índices substitutos de MI_{surr} são calculados para cada $A_{f_{ASurrogate}}(t)$ e $\phi_{fp}(t)$. O índice normalizado MI_{norm} é então definido:

$$MI_{norm} = \begin{cases} 0, & \text{se } MI < \overline{MI_{surr}} \\ \frac{MI_{raw} - \overline{MI_{surr}}}{1 - \overline{MI_{surr}}} & \end{cases}$$

6.3.2. Resultados PAC

Para a quantificação de PAC, é necessário definir as bandas das componentes de baixa frequência (que resultará na série de fase) e de alta frequência (resultando na série de amplitude). A princípio, a componente de amplitude foi definida como a ASSR ((53,71 ou 92,77) \pm 10 Hz), e a de fase foi obtida filtrando o sinal em (4 – 8 Hz). Esta banda de frequência foi escolhida pois acredita-se que este ritmo (*theta*) esteja associado ao processamento de informações e processos de modulação fase-amplitude (CANOLTY et al., 2006a, 2006b; TORT et al., 2010; BELLUSCIO et al., 2012), além de uma série de outras funções aparentes que justificam a atenção dada por neurocientistas a este ritmo, com mais de 1600 trabalhos (BUZSÁKI, 2006). Primeiramente, foi analisada a evolução do índice MI ao longo do tempo por meio de janelas deslizantes (1,2 e 4 segundos, com 50% de *overlap*) em registros individuais. O resultado para um registro (WAR 01) é mostrado na Figura 34.

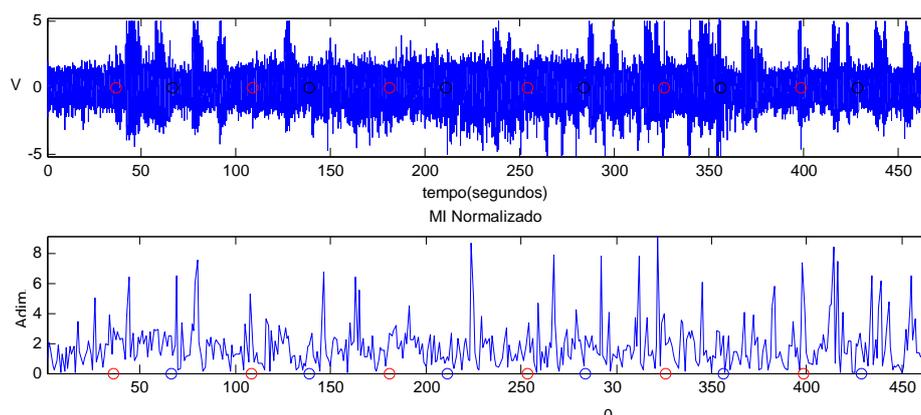


Figura 34: Registro e MI ao longo do tempo. Acima, registro (WAR 01, amplificação em 10.000x) e MI calculado em janelas deslizantes (abaixo). Sinal filtrado em 4-8 Hz (baixa frequência, componente de fase) e 43.71-63.71Hz (alta frequência, componente de amplitude)

Além de ruidoso, o gráfico inferior (MI ao longo do tempo) não apresenta modificações aparentes durante os *trials* de 53 Hz, que seriam evidentes caso

houvesse um acoplamento fase-amplitude entre frequências decorrentes do estímulo. Gráficos deste tipo foram analisados individualmente para cada registro, comparando entre amostras de um mesmo grupo e entre grupos diferentes, e nenhum padrão foi encontrado. Outros parâmetros foram alterados, como bandas de frequência e inclusive o índice de PAC calculado; utilizamos os definidos por (CANOLTY et al., 2006b) e (COHEN, 2008), mas estes também não revelaram padrões ao longo do tempo, entre amostras de um grupo ou entre diferentes grupos. Os únicos índices significativos encontrados foram para $4 - 8\text{Hz}$ e $30\sim 40\text{Hz}$, porém uma análise mais aprofundada revelou que estes são devido aos HVS, pois a forma de onda dos fusos é composta por várias componentes de frequência (indo de 4Hz até $\sim 40\text{Hz}$), quando representada por Fourier. Assim, quando são filtradas em duas componentes; $4 - 8\text{Hz}$ e $30\sim 40\text{Hz}$, as oscilações de cada uma estarão necessariamente acopladas, pois são representações parciais de uma mesma fonte, e não dois osciladores neurais acoplados, como buscamos.

Por fim, em busca de um par de componentes de frequência que interagissem com acoplamentos do tipo PAC/CFC, foram feitos comodulogramas. Em gráficos deste tipo, um trecho de interesse é selecionado, e valores de *MI* são calculados variando as bandas de componente de baixa (0 a 20Hz , largura de banda de 4Hz) e alta frequência (30 Hz até 100Hz , larguras de banda igual à respectiva componente de baixa frequência), como um processo de varredura de frequências. A análise individual de cada trial e as médias ao longo das amostras e trials não revelaram diferenças significativas entre grupos, além da alta variância entre amostras de um mesmo grupo e entre trials de um mesmo animal. Com isso, concluímos a ausência de PAC decorrentes de processos neurais entre componentes do canal CI em ambos grupos (WAR e WIS). Porém, apesar de não encontrar indícios de PAC, não podemos fazer afirmações que processos deste tipo não ocorrem no CI ou não desempenham papel na ictogênese, uma vez que somente um eletrodo foi utilizado. O uso de mais canais, com eletrodos em diferentes regiões do cérebro proporcionaria mais dados e possibilidade de análise de acoplamentos entre componentes. Porém, além das dificuldades práticas de confecção destes eletrodos e registros deste tipo, análises neste caso são cada vez mais complexas à medida que aumenta o número de canais e

combinações possíveis. Além disso, é preciso que, caso ocorram indícios de PAC, tenhamos uma motivação e interpretação fisiológica e evidências que estes ocorram por mecanismos neurais e não sejam índices espúrios (ARU; PRIESEMANN; WIBRAL, 2014).

6.4.CLASSIFICAÇÃO DE SINAIS DE EEG POR DECOMPOSIÇÃO DE MODOS

6.4.1. Introdução

Este capítulo anexo contém a abordagem inicial do trabalho para lidar com o problema de classificação de sinais de EEG para crises epilépticas. Por meio da extração de características de registros de EEG e técnicas de reconhecimento de padrões, espera-se a identificação ou caracterização das amostras analisadas, rotulando cada uma de acordo com três classes; ictal, inter-ictal ou normal. Estes métodos teriam aplicações em uma série de contextos relacionados com epilepsia, como auxílio no diagnóstico desta patologia, na identificação de focos epilépticos no cérebro em casos onde intervenção cirúrgica é necessária e na detecção de episódios de crises. Normalmente a detecção de crises epilépticas é feita por inspeção visual de sinais de EEG por um neurofisiologista experiente (BAJAJ; PACHORI, 2013) que leva em conta: frequência, amplitude, regularidade das formas de onda, fotoestimulação, escalas espaciais e persistência temporal das anomalias do sinal (ADELI; ZHOU; DADMEHR, 2003). O método de inspeção visual, além de trabalhoso e demorado, pode ser impreciso (especialmente para séries longas). Os resultados da análise de uma mesma série feita por dois profissionais podem ser diferentes devido à subjetividade inerente a tal método (BAJAJ; PACHORI, 2013). Além disso, há uma série de componentes e características presentes no sinal que dificilmente são detectados por meio de simples inspeção visual. Deste modo, algoritmos de análise e processamento de sinais desempenham um papel importante no diagnóstico clínico de epilepsia, ao extrair características e informações de séries temporais de EEG de um ou vários canais (STACEY; LITT, 2008). Neste capítulo, são avaliados métodos de processamento que envolvem a decomposição do sinal em componentes AM-FM, seguido pela extração de características de cada um. Deste modo, espera-se que certos modos estejam associados a componentes relacionados à ictogênese, facilitando a obtenção de informações a seu respeito.

Recentemente, alguns trabalhos utilizaram o método EMD (HUANG et al., 1998), que decompõe sinais de EEG em diferentes Funções de Modo Intrínseco (Intrinsic Mode Function - IMF), para algoritmos de detecção e classificação de crises (BAJAJ; PACHORI, 2011, 2013; OWEIS; ABDULHAY, 2011a; MARTIS et al., 2012, 2012). Através da decomposição de sinais de EEG em diferentes modos, espera-se que IMFs específicas, que são componentes moduladas em amplitude, revelem a presença, iminência ou a suscetibilidade a crises de um sinal (ou trecho de um registro de EEG). A extração de características para discriminação de classes seria facilitada por esta divisão do sinal em diferentes modos, que pode ser obtida por outros meios além da EMD. Um destes métodos é a Transformada de Wavelet Empírica (Empirical Wavelet Transform - EWT) (GILLES, 2013), que ainda não possui trabalhos para classificação de sinais de EEG de crises epiléticas. Assim, este capítulo busca avaliar a viabilidade de um método de extração de características por meio da EWT, para classificação de sinais de EEG de crises em uma base de dados conhecida. Os resultados são comparados com a decomposição por EMD e outros trabalhos semelhantes. Apesar da motivação inicial de desenvolver e avaliar métodos de predição de crises, esta base de dados é voltada para detecção de episódios ictais e focos ictogênicos, sendo utilizada como avaliação preliminar dos métodos aqui apresentados.

Os algoritmos utilizados neste capítulo anexo foram implementados em MATLAB (R2013b).

6.4.2. Empirical Mode Decomposition - EMD

O método EMD foi proposto por (HUANG et al., 1998) e inicialmente foi utilizado para análise de fenômenos atmosféricos, meteorológicos e marítimos, sendo posteriormente utilizado em uma série de áreas diferentes, se destacando por sua simplicidade e adaptabilidade em relação às características do sinal, não dependendo de suposições a respeito de não-estacionariedade e não-linearidade. Alguns trabalhos utilizaram EMD para problemas de classificação de sinais de crises epiléticas. Por exemplo, em (PACHORI, 2008), as frequências médias dos modos resultantes da EMD são utilizadas para classificar entre período ictal e período livre de crises em sinais de

EEG. Um problema de classificação semelhante é abordado em (OWEIS; ABDULHAY, 2011b) por meio da análise de frequências ponderadas.

Este método busca dividir o sinal analisado em uma série de Funções de Modo Intrínseco (IMFs), onde cada uma deve satisfazer a duas condições relativamente simples:

- I. No segmento a ser analisado, o número de extremos (máximos e mínimos locais) deve ser igual ou diferir de um em relação ao número de cruzamentos em zero.
- II. Em todos pontos, o valor médio do envelope definido pelos máximos locais e do envelope definido pelos mínimos locais deve ser igual a zero.

O algoritmo proposto em (HUANG et al., 1998) para a obtenção destas IMFs consiste nos seguintes passos:

- 1) Passo 1: Dada uma série temporal $x(t)$, encontrar os máximos e mínimos locais.
- 2) Gerar os envelopes e_{max} e e_{min} por meio de interpolação de spline cúbica, dos máximos e mínimos, respectivamente.
- 3) Calcular a média dos envelopes, $m_i(t) = (e_{max}(t) + e_{min}(t))/2$
- 4) Subtrair o valor encontrado anteriormente do sinal: $h(t) = x(t) - m_i(t)$. Se $h(t)$ satisfazer as condições apresentadas anteriormente para uma IMF, uma IMF $c_i(t) = h(t)$ é encontrada.
- 5) Um novo resíduo r é gerado: $r(t) = x(t) - c_i(t)$. Repetir os passos 1 a 4, aplicados ao resíduo r , de modo a encontrar as IMFs restantes. O processo para quando não é mais possível computar uma IMF de um resíduo, que então é definido como resíduo final, r_M .

O sinal então é decomposto em determinado número de IMFs ($c_i(t)$) e um resíduo, podendo ser representado e reconstruído por (1),

$$x(t) = r_M + \sum_{i=1}^N c_i(t)$$

onde N é o número total de IMFs encontradas.

A implementação em MATLAB do método EMD neste trabalho foi baseada nos códigos disponíveis em [<http://perso.ens-lyon.fr/patrick.flandrin/emd.htm>].

6.4.3. Empirical Wavelet Transform

Outro método de decomposição adaptativa é apresentado em (GILLES, 2013), denominado Transformada de Wavelet Empírica (EWT). Como no EMD, este método busca extrair as componentes oscilatórias moduladas em amplitude (AM) e frequência (FM) de um sinal, considerando-as como tendo suporte compacto no espectro de Fourier. Ao contrário de Transformadas Wavelet tradicionais, que utiliza uma estrutura pré-definida de bancos de filtros, a EWT define os suportes dos filtros de acordo com a distribuição espectral do sinal, de maneira adaptativa. Algumas considerações são feitas para a análise: (1) o sinal deve ser real, devido à necessidade de simetria e (2), um eixo de frequências normalizado com periodicidade de 2π é considerado, com a análise restrita a $[0, \pi]$, devido ao critério de amostragem de Shannon.

Um número N de modos é definido a priori, determinando em quantos segmentos o espectro no intervalo $[0, \pi]$ será particionado. Dos $N+1$ limites de frequência a serem determinados, dois limites já são pré-definidos (ω_0 e ω_N), correspondendo às frequências de 0 e π , respectivamente. Os $N-1$ limites restantes são definidos de acordo com a distribuição do espectro de frequência do sinal: os $N-1$ máximos locais são encontrados, e os limites ω_n ($n = 1, 2, \dots, N-1$) são definidos como os pontos médios entre dois máximos consecutivos. Apesar de em (GILLES, 2013) esta divisão ser feita sobre o espectro resultante da Transformada de Fourier, consideramos a segmentação feita com base na análise de máximos locais da distribuição de Densidade de Potência Espectral (PSD). A divisão por meio da FFT resultou, muitas vezes, na divisão de uma componente em mais de um modo, de modo que uma representação mais suave do espectro (neste caso feita por meio da densidade espectral) foi mais adequada para a detecção de máximos locais e segmentação. Para a estimação da PSD, foi utilizado o método de *Welch* (WELCH, 1967), que divide o sinal em N segmentos com um grau de sobreposição, aplica janelas no domínio do tempo a cada uma, e determina a DFT e sua magnitude

quadrática, tirando então a média dos resultados ao longo do tempo. A segmentação de um sinal de EEG normal em 9 modos é mostrada na Figura 35.

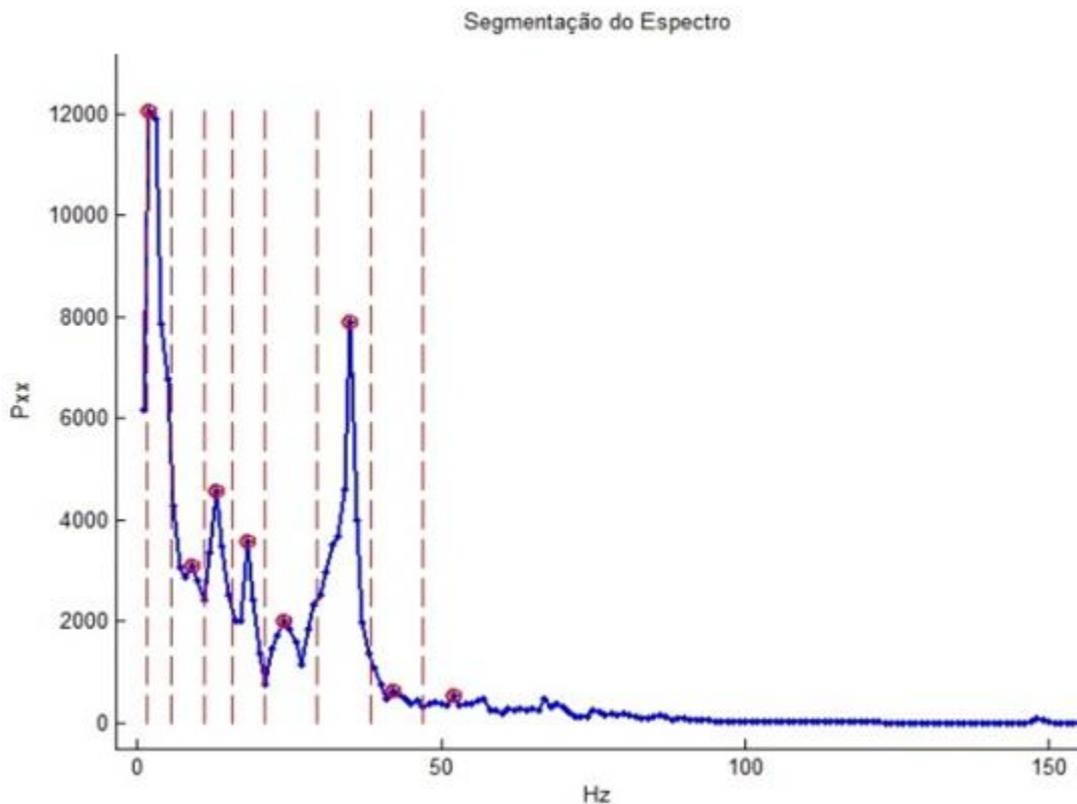


Figura 35: Exemplo de segmentação do Espectro de um EEG normal

Definidos os limites ω_n , temos os segmentos $\Lambda_n = [\omega_{n-1}, \omega_n]$, preenchendo o intervalo $[0, \pi]$. Os limites de cada segmento são caracterizados por uma fase de transição centrada no respectivo ω_n e com largura $2\tau_n$. Cada segmento está associado a um filtro passa-faixa (passa-baixas no caso do segmento em ω_0), cuja construção está de acordo com Wavelets de Littlewood-Paley e Meyer (DAUBECHIES, 1992). São definidas então, uma função de escala empírica, $\phi_n(\omega)$, e a Wavelet Empírica $\psi_n(\omega)$, que são construídas de tal modo que um Frame justo é obtido. Maiores detalhes sobre a construção de tais funções são dados em (GILLES, 2013).

Com as condições para construção de um Frame Justo satisfeitas, a EWT é definida de modo semelhante a uma Transformada de Wavelet tradicional, onde os detalhes são dados por

$$\mathcal{W}_f^e(n, t) = \langle f, \psi_n \rangle = \int f(\tau) \overline{\psi_n(\tau - t)} d\tau$$

E a aproximação é dada pelo produto interno do sinal analisado com a Função de Escala:

$$\mathcal{W}_f^\varepsilon(0, t) = \langle f, \phi_1 \rangle = \int f(\tau) \overline{\psi_1(\tau - t)} d\tau$$

Cada modo empírico do sinal é então obtido por:

$$f_0(t) = \mathcal{W}_f^\varepsilon(k, t) * \psi_k(t)$$

Mais um resíduo ou tendência do sinal:

$$f_k(t) = \mathcal{W}_f^\varepsilon(0, t) * \phi_k(t)$$

Esses modos, quando somados, resultam no sinal reconstruído.

A implementação em MATLAB do método EWT foi baseada nos códigos disponíveis em [<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/42141-empirical-wavelet-transforms>].

6.4.4. Base de Dados utilizada

Os dados de EEG utilizados neste capítulo foram obtidos da Base de Dados da Universidade de Bonn². A base de dados original é dividida em 5 conjuntos: *Z, O, N, F, S* (ANDRZEJAK et al., 2001). Cada uma é composta de 100 séries temporais com duração de 23.6s e frequência de amostragem de 173.61 Hz. Os conjuntos *Z* e *O* correspondem a séries de EEG extra cranial, de cinco voluntários saudáveis (com olhos abertos e fechados, respectivamente). As outras 3 séries são de pacientes epiléticos, com a série *S* obtida durante um período de crise, e as séries *F* e *N* (com eletrodos localizados na zona epileptogênica e hipocampo oposto, respectivamente) durante períodos livres de crise. Neste estudo, foram utilizados três conjuntos; *S, F* e *Z*, correspondendo às classes Ictal, Interictal e Normal, respectivamente. Amostras de cada classe e os respectivos espectros de frequência, calculados por meio da FFT, são mostradas na Figura 36.

² Dados disponíveis em http://epileptologie-bonn.de/cms/front_content.php?idcat=193

O uso desta base de dados é motivado por alguns fatores. Primeiramente, é uma base útil para avaliações iniciais de métodos de classificação de EEG para epilepsia, com registros rotulados em diferentes classes correspondendo a diferentes estados (interictal, ictal ou normal), em situações controladas. Além disso, é uma base utilizada por vários trabalhos com objetivos semelhantes, tornando-a interessante para fins de comparação. Por fim, é uma das poucas bases de dados de EEG para classificação de sinais de crises disponíveis publicamente, outro fato que dificulta o desenvolvimento de algoritmos para fins semelhantes (STACEY; LITT, 2008; SCHULZE-BONHAGE; FELDWISCH-DRENTROP; IHLE, 2011).

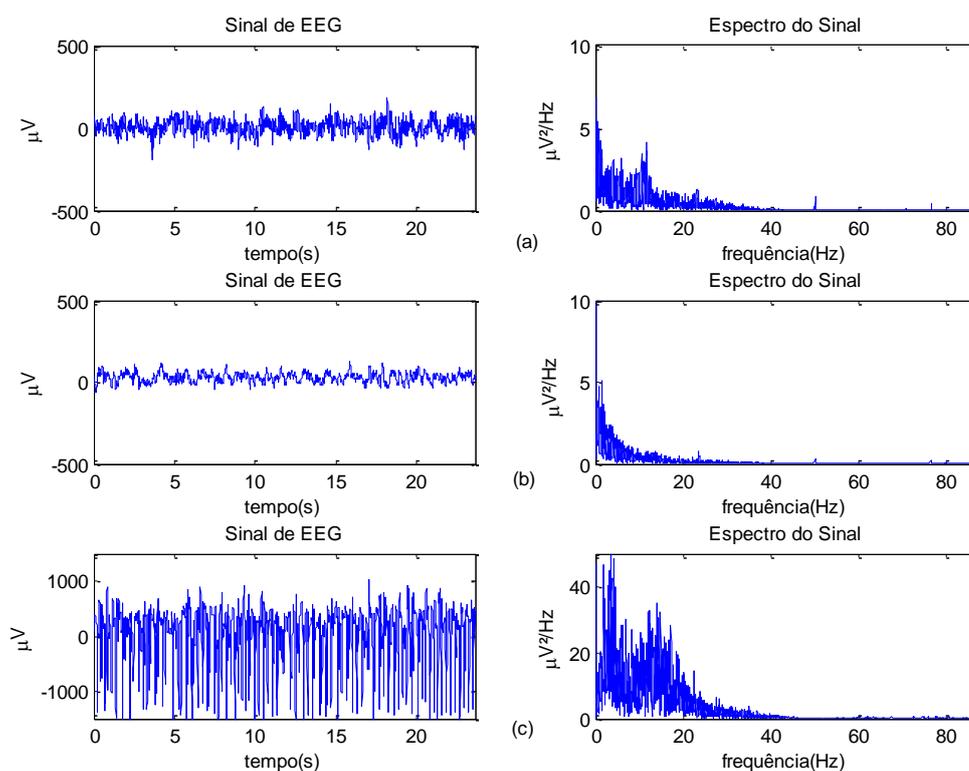


Figura 36: Sinais de EEG e respectivos espectros de frequência (a) Normal (b) Inter ictal (c) Ictal

6.4.5. Extração de Características

Tanto as IMFs retornadas pelo método EMD quanto os modos empíricos da EWT podem ser considerados como sinais modulados em amplitude e frequência. Assim, a extração de características é feita de acordo com características do espectro

de cada modo, semelhante à abordagem empregada por (MARTIS et al., 2012). O artigo citado utiliza a estimação da Densidade Espectral (PSD) por um modelo Auto regressivo pelo método de Burg. Porém, a PSD de cada modo de cada sinal é diferente e muitas vezes imprevisível, dificultando a estimativa por este método (em especial a escolha de ordem, que pode variar para diferentes modos de um sinal). Assim, neste trabalho optamos por fazer a estimativa da PSD de cada modo pelo método de *Welch*, utilizado também na partição de frequências da EWT e citado anteriormente. Foram utilizadas 8 janelas, com 50% de sobreposição.

Como em (MARTIS et al., 2012), a primeira característica extraída é dada pela Energia Espectral (EE), definida por:

$$EE = \frac{1}{N} \sum_{f=0}^{\frac{f_s}{2}} P_{XX}(f)$$

onde N é o número total de coeficientes espectrais estimados, e P_{XX} é a PSD estimada pelo método de *Welch*. A segunda característica é dada pela Entropia Espectral (EntE) como mostrado abaixo

$$EntE = - \sum_{f=0}^{\frac{f_s}{2}} \bar{P}_{XX}(f) \log[\bar{P}_{XX}(f)]$$

onde \bar{P}_{XX} é a densidade espectral normalizada. As outras três características estão relacionadas pela componente principal de frequência do modo analisado. Após a determinação do máximo global de P_{XX} , a magnitude correspondente é extraída (determinando o Pico Espectral, PE), assim como a frequência associada (F), definindo a 3ª e 4ª característica, respectivamente. A 5ª característica extraída é definida pela centróide espectral (CE), que pode ser vista como o “centro de massa” da PSD, com a seguinte fórmula:

$$CE = \frac{\sum_{f=0}^{\frac{f_s}{2}} \omega(f) M(f)}{\sum_{f=0}^{\frac{f_s}{2}} M(f)}$$

onde f é a “bin” de frequência, e $\omega(f)$ e $M(f)$ a frequência central e Magnitude do espectro correspondendo à “bin” f , respectivamente.

As duas últimas características são as larguras de banda AM e FM, definidas por (COHEN; LEE, 1990);

$$B^2_{AM} = \frac{1}{E} \int \left(\frac{dA(t)}{dt} \right)^2 dt$$

$$B^2_{FM} = \frac{1}{E} \int \left(\frac{d\phi(t)}{dt} - \langle \omega \rangle \right)^2 A^2(t) dt$$

Onde A é amplitude do sinal analítico, E é a Energia e $\langle \omega \rangle$ é a frequência central do respectivo modo/IMF:

$$\langle \omega \rangle = \frac{1}{E} \int \frac{d\phi(t)}{dt} A^2(t) dt$$

6.4.6. Seleção de Características e Classificação

Como o número de características extraídas de cada sinal é relativamente grande, e nem todas são relevantes para a discriminação entre classes, é desejável a seleção de características ou a ordenação por grau de relevância. Neste trabalho, características foram ranqueadas de acordo com o RELIEFF, um algoritmo de seleção de atributos proposto por (KONONENKO; ŠIMEC; ROBNIK-ŠIKONJA, 1997), como uma adaptação do RELIEF original (KIRA; RENDELL, 1992). Os classificadores foram então aplicados sucessivamente, aumentando o número de características selecionados a cada iteração, a fim de avaliar a convergência e a estabilidade no que diz respeito à seleção de características.

Para a classificação, dois métodos foram utilizados e comparados. O primeiro foi baseada na Análise de Discriminantes Lineares (LDA – Linear Discriminant Analyzis) (FISHER, 1936). O segundo classificador é um utilizado no capítulo 2; *Bagging* aplicado a uma árvore de decisões (CART). Ambos são métodos supervisionados, onde dados de treinamento são submetidos ao algoritmo junto com as classes reais de cada amostra. A etapa de teste consiste em alimentar o algoritmo com novos dados e comparar os resultados com as respectivas classes do novo conjunto.

6.4.7. Resultados e Discussão

Três classes de EEG foram analisados: Ictal, Interictal e Normal (conjuntos E, D e A, respectivamente), cada um com 100 séries temporais. A fim de evitar sobre-estimação (*overfitting*) dos dados, validação cruzada de *k-folds* foi utilizada para os algoritmos de classificação, com 70% de amostras utilizado para treinamento, e 30% para teste. Para avaliação de desempenho, foram utilizados três medidas comuns; Exatidão, especificidade e sensibilidade.

Um dos parâmetros mais comuns para avaliação de desempenho de um classificador é relacionado com seu número de previsões incorretas. Assim, é definido o primeiro parâmetro de desempenho, Exatidão, que é dada pelo número de classificações corretas das amostras de teste sobre o número total destas amostras. Apesar de ser o mais intuitivo, tal parâmetro nem sempre é o melhor para avaliar um método de classificação, especialmente em problemas desbalanceados. Assim, também escolhermos a Sensitividade ($VP/(FN+VP)$) e Especificidade ($VN/(VN+FP)$) como parâmetros de desempenho.

Amostras de cada classe foram decompostas em sete modos empíricos ou IMFs, por EWT ou EMD, respectivamente. Sete características de cada modo são extraídas (SE, SEnt, SP, F, SC, B_{AM} and B_{FM}), totalizando 49 atributos por amostra, que foram então ordenados de acordo com o algoritmo RELIEFF, e avaliados a cada vez que uma característica era adicionada. Os melhores resultados para ambos os classificadores aplicados a cada método de decomposição estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Melhores índices de desempenho de cada método

Dec.	Clas.	Nfeats	ACC(%)	Sen(%)	Spec(%)
EMD	LDA	41	93,87	95,20	97,10
	Bag	6	94,53	97,00	97,10
EWT	LDA	33	79,7	77,0	96,4
	Bag	41	94,8	96,6	99,2

Exceto para o classificador LDA aplicada à decomposição EWT, todos os resultados têm índices comparáveis com o sumário apresentado em (MARTIS et al., 2012), de resultados de trabalhos utilizando as mesmas classes e a mesma base de

dados. Os valores de exatidão variaram de 90.7% em (GHOSH-DASTIDAR; ADELI, 2009) até 99,7% em (ACHARYA et al., 2012). Outros valores incluem (GULER; UBEYLI; GULER, 2005), onde a taxa de exatidão foi de 96,7 %, com a extração de Expoentes de Lyapunov e classificação por meio de Redes Neurais Recorrentes. Em (FAUST et al., 2010), o uso de SVM aplicado às características máximos e mínimos locais estimados pelo método de Burg resultou em 93.3% de exatidão, 98,33% de sensibilidade e 96,67 de especificidade. Como esperado, o resultado por EMD é semelhante ao encontrado em (MARTIS et al., 2012), que também este método de decomposição, atingindo 95,33, 98,00% e 97,00% de Exatidão, Sensibilidade e Especificidade máximas, respectivamente.

Embora os resultados sejam positivos, devem ser analisados com ressalvas. Embora a base de dados de Bonn seja útil para a avaliação preliminar de algoritmos e permita a comparação com trabalhos semelhantes, é relativamente pouco exigente em termos de generalização e robustez, em comparação com o que poderia ser encontrado em um ambiente clínico. Ainda assim, é um importante passo que deve ser considerado para os métodos de classificação e previsão de sinais de crises.

Os métodos apresentados neste trabalho visam decompor um sinal em componentes AM-FM e extrair características de cada um, diferenciando sinais "normais" de patológicos. Isto tem aplicações promissoras para a identificação de sistemas ictogênicos e para a identificação de transições de estado interictal-ictal. As capacidades de extração de características podem ser exploradas ainda mais se considerarmos cada modo como tendo uma Transformada de Hilbert "bem comportada", que nos permite analisar as relações de fase entre os diferentes modos do mesmo sinal ou entre diferentes regiões do cérebro. Isto é importante, pois se acredita que a sincronização desempenha um papel importante para ictogênese. Uma investigação mais profunda de como isto acontece é essencial para desvendar os mecanismos de geração de crises e conceber marcadores para prever tais eventos.

6.4.8. Conclusão

O desenvolvimento de métodos de extração de características e classificação é um passo fundamental tanto para a compreensão dos mecanismos de funcionamento de epilepsia, como para análises clínicas, incluindo possíveis aplicações em dispositivos de previsão de crises. Tal tarefa é dificultada pela complexidade do problema em questão, além da falta de conhecimento dos fatores que levam a essa condição.

Neste capítulo, demonstramos que a EWT, um método relativamente novo de decomposição de modos, pode ser usado para extrair características relevantes para a classificação e detecção de sinais de EEG de crises, com desempenhos semelhantes à EMD, um método semelhante e previamente utilizado para esta finalidade. Estes métodos de decomposição e extração de atributos tornam-se interessantes pelo fato de que utilizam características relacionados com componentes AM-FM que são alterados na presença de crises e, possivelmente, em períodos anteriores esses eventos.

Porém, embora os métodos apresentados neste capítulo tenham dado bons resultados, a aplicação posterior destes na classificação de registros extensos de EEG, ou em sistemas de predição de crises, está longe de ser um problema trivial, como visto no Capítulo 1 e em (MORMANN et al., 2007). Além dos problemas citados, outro desafio considerável é a falta de bancos de dados disponíveis publicamente. Como mostrado nesta seção, testamos os métodos na base de dados de Bonn (ANDRZEJAK et al., 2001), que é interessante para avaliações preliminares dos métodos, pois contém características interessantes, como simplicidade, número de amostras, e possibilita comparações com outros trabalhos. Porém, os registros desta base são obtidos em situações controladas e relativamente curtos, tornando sua classificação um problema relativamente fácil, comparados com o que teríamos em registros clínicos e de situações mais “reais”. Assim, embora a base de Bonn seja interessante para avaliações preliminares de algoritmos de classificação de crises, e os resultados indiquem que métodos de decomposição EMD e EWT são bons candidatos para avaliações mais aprofundadas, estes ainda devem ser testados onde vários outros métodos promissores falharam.

Como descrito por (MORMANN et al., 2007), a predição de crises é uma estrada longa e sinuosa. Assim, evitando percorrer o mesmo caminho de diversos outros métodos antes promissores, mas que falharam quando submetidos a testes mais abrangentes, optou-se por mudar a abordagem de tal problema. Ao invés de propor e testar algoritmos de processamento e análise de sinais em bases de dados já conhecidas (e bem exploradas), decidiu-se por prosseguir com a obtenção dos dados por novos protocolos de experimentos, voltados para avaliação de hipóteses em um modelo animal de crises. Deste modo, espera-se ressaltar características que diferenciem cérebros normais dos suscetíveis a crises epiléticas, além de esclarecer possíveis mecanismos de ictogênese. Esta foi a abordagem apresentada nos capítulos principais deste trabalho.