



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Trabalho de Conclusão de Curso

**PROPOSTA METODOLÓGICA PARA EXPERIMENTOS DE INVESTIGAÇÃO
DE ATIVIDADE SENSÓRIA EM NERVOS PERIFÉRICOS**

Leila Raulino Câmara Cavalcanti

Natal/RN

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

**PROPOSTA METODOLÓGICA PARA EXPERIMENTOS DE
INVESTIGAÇÃO SENSÓRIA EM NERVOS PERIFÉRICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte para obtenção do título de Graduado em Engenharia Biomédica.

Graduanda: Leila Raulino Câmara Cavalcanti.

Orientadora: Prof^a Dra. Beatriz Stransky Ferreira.

Natal/RN

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

**PROPOSTA METODOLÓGICA PARA EXPERIMENTOS DE
INVESTIGAÇÃO SENSÓRIA EM NERVOS PERIFÉRICOS**

Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso:

Prof^a. Dra. Beatriz Stransky Ferreira

UFRN - Orientadora

Prof. Antônio Pereira Júnior

UFRN – Avaliador Interno

Prof. Gilvan Luiz Borba Filho

UFRN – Avaliador Interno

Natal/RN

2015

À minha avó, Yvonne Câmara, meu maior exemplo e fonte inesgotável de inspiração. A ela, por me ensinar a ter fé em Deus e a perseverar sem perder a ternura de apreciar a beleza da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pela compreensão e amor incondicionais e pelo suporte durante todos os anos de faculdade. Aos amigos que me acompanharam durante essa jornada, sempre me compreendendo, apoiando e aconselhando, deixando os momentos difíceis mais leves e suportáveis.

Aos integrantes do Center for Implantable Devices (CID), da Purdue University, laboratório que me acolheu, me instruiu e proporcionou um enorme crescimento em minha vida acadêmica.

Especialmente, agradeço ao Dr. Matthew Ward, Ph.D., cientista pesquisador do CID. Obrigada por todo o ensinamento, a paciência, o suporte, a orientação incessante e, principalmente, por ter se tornado uma referência para mim de como fazer ciência, como olhar eticamente para um animal em experimentação, atentar para o cuidado e o rigor na definição de cada passo dado na pesquisa científica, sempre me instigando a honestidade, o trabalho árduo e a criatividade, mola propulsora do caminhar investigativo e desbravador da ciência.

Agradeço aos professores doutores Beatriz Stransky e George Câmara pelas orientações, sugestões, leituras e revisões e por sempre depositarem confiança em mim.

Agradeço, por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo financiamento de minha experiência em estudar nos Estados Unidos, onde tive a oportunidade de despertar para a jornada científica em neurociência e neuroengenharia.

SUMÁRIO

Dedicatória	3
Agradecimentos	4
Sumário	5
Lista de Figuras e Tabelas	6
Lista de abreviações, siglas e símbolos	8
Resumo	9
Abstract	10
1 Introdução	11
2 objetivos	15
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos	17
3 Revisão de Literatura	17
3.1 O sistema nervoso	17
3.2 Registro de sinais elétricos no SNP	27
3.3 Estimulação sensorial	34
4 Metodologia	38
4.1 Configuração Experimental	38
4.2 Registro eletrofisiológico e Estimulação elétrica	39
4.3 Estimulação mecânica	40
4.4 O Software ANC	41
4.5 O uso animal	44
4.6 Eletrodos tipo Cuff	51
5 Resultados e Discussões	60
5.1 Caracterização dos Eletrodos	61
5.2 Resultados Preliminares	65
5.3 Discussões	70
6 Conclusões	71
Referências	73

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1 - Circuito sensorial e registro em nervo.	12
Figura 2.1 - Mecanismo para reabilitação sensória.	16
Figura 3.1 - Componentes do SN e suas relações funcionais.	18
Figura 3.2 - Níveis de organização do Sistema Nervoso.	19
Figura 3.3 - Desenho esquemático do neurônio.	21
Figura 3.4 - Gráfico esquemático do potencial de ação.	23
Figura 3.5 - O Potencial de Ação Composto.	25
Figura 3.6 - Comparação entre PA e PAC.	25
Figura 3.7 - Eletrodos de Interface com o SNP.	28
Figura 3.8 - Exemplos de eletrodos epineurais.	29
Figura 3.9 - Exemplo de eletrodo do tipo braçadeira.	29
Figura 3.10 - Sistema de registro de sinal em nervo periférico.	30
Figura 3.11 - Eletrodos de Utah.	33
Figura 3.12 - Filamento de von Frey.	35
Figura 4.1 - Esquema do arranjo experimental proposto.	38
Figura 4.2 - O circuito do HCP (Howland Current Pump).	39
Figura 4.3 - Resumo esquemático do Autonomous Neural Control.	42
Figura 4.4 - Nervos periféricos em cadáver de rato.	45
Figura 4.5 - Plexo braquial do rato.	45
Figura 4.6 - Terminações nervosas na superfície da mão.	46
Figura 4.7 - Pontos de estimulação na pata do rato.	47
Figura 4.8 - Incisão para acesso dos nervos.	49
Figura 4.9 - Eletrodo fabricado.	52
Figura 4.10 - Dimensões do eletrodo.	53

Figura 4.11 - Fio soldado na contato de Pt-Ir.	54
Figura 4.12 - Disposição do nervo no eletrodo.	54
Figura 4.13 - Etapa de fabricação de eletrodos.	56
Figura 4.14 - Contatos são encurvados.	56
Figura 4.15 - Disposição do eletrodo no teste mecânico.	58
Figura 4.16 - Exemplo de uma curva tensão-deformação.	59
Figura 5.1 - Tensão-deformação do eletrodo fabricado (#2).	62
Figura 5.2 - Tensão-deformação do eletrodo fabricado (#15).	63
Figura 5.3 - Aproveitamento da produção de eletrodos.	64
Figura 5.4 - Esquema experimental utilizado.	65
Figura 5.5 - Ponto de estimulação utilizado.	66
Figura 5.6 - Representação gráfica de todos os registros realizados.	67
Figura 5.7 - Visão 3D das curvas de PAC obtidas.	68
Figura 5.8 - Os PACs obtidos e a curva média calculada.	69
Tabela 1 - Classificação das fibras nervosas	22
Tabela 2 - Propriedades de mecanorreceptores do tato	27

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/D - Analógico - Digital

ANC - *Autonomous Neural Control*

ARF - Análise de Resposta  Frequência

CID - Center for Implantable Devices

D/A - Digital - Analógico

DAQ - Sistema de Aquisio de Dados

DC - Durao de Carga

FES - *Functional Electrical Stimulation*

IACUC - *Institutional Animal Care and Use Committee*

Ir - Irdio

PA - Potencial de Ao

PAC - Potencial de Ao Composto

PAN - Perfil de Ativao Neural

Pt - Platina

Pt-Ir - Platina/Irdio

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

VC - Voltimetria Cíclica

CAVALCANTI, Leila Raulino Câmara Cavalcanti. **Proposta Metodológica para Experimentos de Investigação de Atividade Sensória em Nervos Periféricos.** Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 76p., 2015.

RESUMO

Esforços científicos têm sido dedicados à busca por padrões de atividade neuronal com potenciais aplicações em reabilitação. Ainda sem abordagem clínica, a área que motiva a realização deste trabalho é a de restauração sensorial em próteses. O *Center for Implantable Devices (CID)*, da *Purdue University*, onde este trabalho foi concebido, é um laboratório com diversas pesquisas em interface cérebro-máquina e próteses neurais. O emergente projeto desse laboratório para investigação de reabilitação tátil conduziu à necessidade de se ter uma metodologia experimental com esse intuito. O presente trabalho aborda os procedimentos envolvidos na utilização do modelo animal (ratos Long-Evans), na fabricação de eletrodos tipo *cuff*, bem como em toda a instrumentação necessária, incluindo o *software Autonomous Neural Control*, de autoria do CID. A metodologia proposta se baseia na estimulação mecânica sensorial, utilizando filamentos de von Frey; na microestimulação elétrica de nervos periféricos e no registro eletrofisiológico do nervo quando as estimulações são realizadas. O procedimento proposto foi aprovado pelo comitê de cuidado e uso animal da universidade e um experimento preliminar foi realizado. Dos eletrodos fabricados, 72,5% e 92% passaram respectivamente nos testes de qualidade mecânica e elétrica. O registro do nervo mediano enquanto 98mN foram aplicados como estímulo tátil destacou peculiaridades dos potenciais de ação compostos observados em 37% dos sinais coletados diante tentativas de evocar respostas no nervo durante o estímulo físico. Os resultados indicam que esta metodologia poderá ser utilizada em outros estudos que associem estimulação tátil e padrões de resposta em nervos periféricos, auxiliando o entendimento e o desenvolvimento de próteses bidirecionais.

Palavras-chave: Neurociência. Reabilitação sensorial. Registro eletrofisiológico. Microestimulação elétrica.

CAVALCANTI, Leila Raulino Câmara Cavalcanti. **Methodological Proposal for Experiments to Investigate Sensory Activity in Peripheral Nerves.** Conclusion Work Project, Biomedical Engineering Bachelor Degree, Federal University of Rio Grande do Norte, 76p., 2015.

ABSTRACT

Scientific efforts have been dedicated to finding patterns of neuronal activity with potential applications in rehabilitation. Still with no clinical approach, sensory restore in prostheses is the field that motivates this work. The Center for Implantable Devices (CID), at Purdue University, where this work has been conceived, is a laboratory with several researches in brain-machine interfaces and neural prostheses. The emerging project at this center for investigating tactile rehabilitation led us to create an experimental methodology to make this study possible. This work presents the procedures involved in using animal model (Long-Evans rats), in cuff electrodes fabrication, as well as in all the necessary instrumentation, including the Autonomous Neural Control software, signed by the CID. The proposed methodology is based on sensorial mechanic stimulation, using von Frey filaments; on electrical microstimulation of peripheral nerves; and on nerve electric-physiological recording while the stimuli are performed. The proposed procedures were approved by the Purdue Animal Care and Use Committee and one preliminary experiment has been performed. From all fabricated electrodes, 72.5% and 92% passed in the mechanical and electrical quality tests, respectively. The median nerve recordings while 98mN were applied as tactile stimulus, have highlighted peculiarities of the compound action potentials observed in 37% of the collected signals when trials were done to elicit responses from the nerve. Results indicate that this methodology can be utilized in other studies with association between tactile stimulation and patterns of peripheral nerves responses, supporting the understanding and the development of bidirectional prostheses.

Keywords: Neuroscience. Sensorial rehabilitation. Electric-physiological recording. Electrical microstimulation.

1 INTRODUÇÃO

O *Center for Implantable Devices* (CID – Centro de Dispositivos Implantáveis) é um laboratório de pesquisa alocado no departamento de Engenharia Biomédica da Purdue University, West Lafayette - IN, Estados Unidos cujo objetivo é desenvolver estudos transdisciplinares em dispositivos implantáveis. Nesse laboratório, coordenado pelo Prof. Pedro Irazoqui, Ph.D., as pesquisas são focadas essencialmente em problemas de interface entre microeletrônicos implantáveis e circuitos neurais. Além de direcionar investigações para aplicações em BCI (*Brain-Computer Interfaces* – Interfaces Cérebro-Máquina), o laboratório concentra trabalhos em epilepsia, lesões medulares, glaucoma, depressão, distúrbios gástricos e problemas relacionados a interfaces crônicas com o sistema nervoso, como biocompatibilidade e transmissão de potência elétrica em sistemas sem fio.

Um emergente projeto de pesquisa no CID é o de investigação de padrões da atividade elétrica em nervos periféricos em resposta a estímulos táteis. Esse projeto tem como motivação o desenvolvimento de estimulações artificiais que mimetizem a resposta a estímulos mecânicos realizados nos mecanorreceptores da pele. Assim, a sensibilidade natural pode ser restaurada em um paciente amputado, por exemplo, através da aplicação artificial de estímulos elétricos em seu sistema nervoso.

Uma perspectiva emergente desse estudo é, portanto, o estabelecimento de bidirecionalidade em próteses, ou seja, adicionar sensibilidade a um membro artificial cuja funcionalidade seja apenas motora. Com isso, as vantagens para o usuário da prótese não se limitam a melhorar a capacidade funcional da interação dele com o mundo que o cerca, por estar tendo o retorno sobre informações de textura, peso, maciez, temperatura e formas dos objetos em contato com a prótese. Esse avanço auxilia na própria função motora, uma vez que um sistema de controle fechado pode ser otimizado ao processar o quanto de pressão, força ou detalhe nos gestos devem ser feitos de acordo com a resposta de interação tátil. Ou seja, com uma prótese bidirecional, o usuário consegue, após ter bem integradas as funções propostas, agir de forma mais natural, adquirindo o membro artificial de uma forma mais fisiológica. Além de melhorar a performance ao desenvolver as atividades cotidianas e ocupacionais, o indivíduo tende a se sentir mais confiante e independente, tendo sua reinserção no trabalho e na vida social de uma forma mais rápida e eficaz.

A ideia geral dos experimentos para tal investigação gira em torno do registro de sinais eletrofisiológicos enquanto a estimulação tátil é entregue na superfície da pele. Mecanorreceptores são células receptoras especializadas que, quando estimuladas por pressão, vibração, toque transformam essas informações mecânicas em impulsos elétricos que viajam pelos nervos, levando a informação do *feedback* sensorio para a medula espinal (PURVES, 2012). O sinal é, então, integrado e redirecionado ao encéfalo, onde, em nível de córtex cerebral somatossensorial, é interpretado, gerando as sensações de toque, vibração, dor, calor, frio. A Figura 1.1 abaixo ilustra esse caminho de condução da informação e onde o registro dessa atividade neuronal é feito.

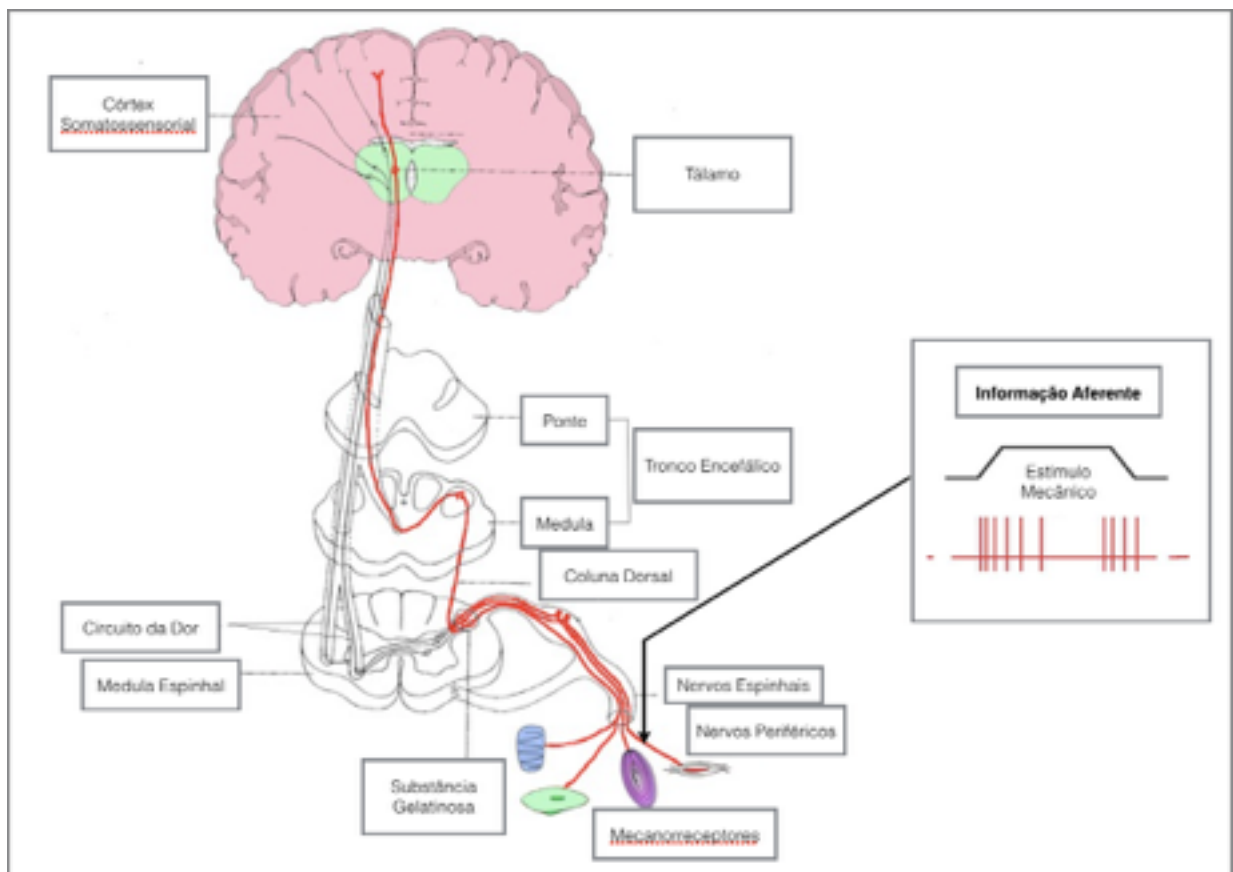


Figura 1.1 - Circuito sensorial e registro em nervo. Representação esquemática do circuito de informação aferente sensorial e o do registro de atividade eletrofisiológica em nervo periférico. Ilustração adaptada de imagens disponíveis no site do Departamento de Fisiologia da University of Calgary e de LECHNER, 2013.

A dificuldade inicial dessa pesquisa é estabelecer uma metodologia experimental para esse fim, a começar por determinar métodos de coleta de dados, uso animal (incluindo técnica cirúrgica com aprovação de protocolo por comitê de

ética da instituição), definição de instrumentação a ser utilizada, fabricação de eletrodos e métodos de processamento de dados. Muitos são os tipos de eletrodos e metodologias para se fazer o registro de atividade neuronal no sistema nervoso periférico, como os revistos e analisados em (NAVARRO, 2005). A intenção no CID é ter a fabricação própria de eletrodos, podendo controlar variáveis como dimensão, adaptação à configuração experimental, teste de impedância elétrica em meio de simulação biológica, economia e, sobretudo, melhor adequação da aplicação dos eletrodos, não só em termos de aquisição de dados, como também de adequação à conexão dos eletrodos à instrumentação dos circuitos amplificadores e de conversão analógica-digital, mais discutidos nas metodologias utilizadas. É nesse contexto que o desenvolvimento deste trabalho se insere.

O intuito é que, com a metodologia desenvolvida, o tempo de cirurgia seja melhor aproveitado e os contatos elétricos dos eletrodos façam uma coleta efetiva dos sinais, possibilitando conexão com toda a instrumentação elétrica subsequente, sem que os eletrodos sejam deslocados facilmente dos nervos, mesmo com a exposição da pata do animal à estímulos mecânicos.

Há aparatos experimentais comerciais para estudo de sensibilidade tátil de ratos, como o *Dynamic Plantar Aesthesiometer* (Ugo Basile), que foi desenhado para ter acesso automático à sensibilidade ao toque na superfície plantar de ratos e camundongos, sendo conhecido como o von Frey eletrônico, de alta precisão, com correções experimentais de tempo de latência e controle de força entregue, mas de custo não justificável para o orçamento do laboratório, que já possui uma estrutura de alto nível para registros e estimulações em geral do sistema nervoso em ratos. A necessidade é, então, fazer adequações, dentro das limitações e disponibilidades do laboratório para fazer o novo projeto ter experimentos reprodutíveis.

O registro de sinais nervosos pode ser uma etapa desafiadora no desenvolver da pesquisa, devido à característica inerentemente ruidosa do sinal a ser capturado. Para fazer tal coleta, eletrodos são implantados cirurgicamente nos nervos, diminuindo interferências musculares e cutâneas. Devido a este caráter invasivo da pesquisa, um modelo animal é requerido, assim como a aprovação por um comitê de ética de um protocolo adequado para seu uso.

O modelo animal nesse experimento se faz necessário uma vez que os processos fisiológicos envolvidos nessa investigação são de alta complexidade, não

havendo, por exemplo, simuladores computacionais que pudessem substituir o modelo animal. Esses animais são classicamente utilizados na esfera científica para estudo de sensibilidade (BENNET, 1988; CODERE, 1987; FLEISCHER, 1983; HANDWERKER, 1987; HANDWERKER, 1991; HELLON, 1975; KIM, 1992; KOW, 1983; LEEM, 1993; LYNN, 1982; SANDERS, 1986; SHIR, 1990). Os ratos possuem uma carga genética muito semelhante à do humano, são de fácil aquisição, manipulação, conservação e de relativo baixo custo, justificando seu uso nesse trabalho.

Para melhor elucidar cada etapa do procedimento, os parágrafos seguintes introduzem os conceitos essenciais ao desenvolvimento das estimulações mecânica e elétrica, da gravação dos sinais e do uso animal.

A estimulação mecânica é amplamente explorada em trabalhos científicos na investigação do funcionamento dos mecanorreceptores, sendo o uso de filamentos de von Frey um dos métodos mais discutidos na literatura (LEEM, 1993; BOVE, 2006; FRUHSTORFER, 2001). Os filamentos de von Frey são filamentos de *nylon*, com a peculiar propriedade de manter constante uma força entregue à superfície com a qual ele faz contato, uma vez que o fio esteja curvado quando solicitado axialmente por compressão (BOVE, 2006). Com a utilização desses filamentos, podemos ter o controle da magnitude de forças aplicadas à pele e ter um parâmetro para mapear como é dada a relação entre intensidade de força realizada na superfície da pele e o padrão de atividade eletrofisiológica no sistema nervoso.

A captura dos sinais decorrentes da atividade elétrica da estimulação tátil é dada com a utilização de microeletrodos do tipo “braçadeira”, os chamados *cuff electrodes*. Com a utilização do *software* desenvolvido no CID, *Autonomous Neural Control*, e códigos desenvolvidos em MATLAB para processamento de dados, é possível filtrar informações importantes da atividade neuronal, como, por exemplo, a velocidade de condução dos impulsos nervosos, e, com isso, identificar fibras em atividade durante a estimulação.

Este trabalho mostra como o procedimento experimental pode ser realizado, incluindo o *design* e os métodos de fabricação de eletrodos para o registro dos sinais eletrofisiológicos, arranjo mecânico de estimulação, definição de cuidado animal, procedimento cirúrgico, correlação anatômica e fisiológica dos mecanismos envolvidos na transmissão da informação sensória e a especificação da

instrumentação necessária (circuitos amplificadores, conversor analógico-digital e *software* para controle do registro e processamento dos sinais coletados). Com isso, almeja-se que o laboratório possa amadurecer as pesquisas no campo da investigação sensorial tátil, com posterior modulação de estimulações elétricas que mimetizem as respostas de estímulos externos. Com o mapeamento do padrão de respostas observadas nos nervos periféricos e a respectiva tradução dessas atividades em estímulos elétricos, podemos restaurar sensações perdidas em usuários de próteses bidirecionais.

2 OBJETIVOS

O desenvolvimento de interfaces cérebro-máquina e próteses neurais (em que a interface da máquina é dada com nervos e não com o cérebro) está em pleno crescimento nestes últimos anos com grandes perspectivas de prosseguir no futuro. Essa área da pesquisa está especialmente em ascensão com recentes e volumosos investimentos dos Estados Unidos e da Europa voltados para a pesquisa do cérebro e do sistema nervoso, como por exemplo o *Brain Project*.

Uma das grandes áreas de investigação na neurociência é a reabilitação. Expressivos avanços na restauração da função motora em próteses e órteses têm sido mostrados tanto na pesquisa científica como na aplicação clínica. No entanto, a reabilitação sensorial de dispositivos de reabilitação ainda não chegaram à esfera comercial e as pesquisas ainda tentam desvendar maneiras para conceber aparatos artificiais que mimetizem sensações táteis. O desenvolvimento deste trabalho se insere na área de experimentação animal para viabilizar uma solução em neuroprostética para a reabilitação sensorial.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O CID realiza diversas pesquisas na área de próteses neurais e interfaces cérebro-máquina e pretende desenvolver pesquisas na área de reabilitação artificial da sensibilidade por estimulação elétrica do sistema nervoso periférico. Este trabalho tem como objetivo fornecer uma metodologia experimental que se adeque à

infra-estrutura laboratorial existente e que possa permitir mapear padrões da atividade em nervos periféricos diante de estimulação tátil e, com isso, produzir estímulos elétricos seletivos que mimetizem as sensações naturais de um estímulo mecânico. A Figura 2.1 resume esquematicamente a ideia geral que abrange a grande área tangente a este trabalho.

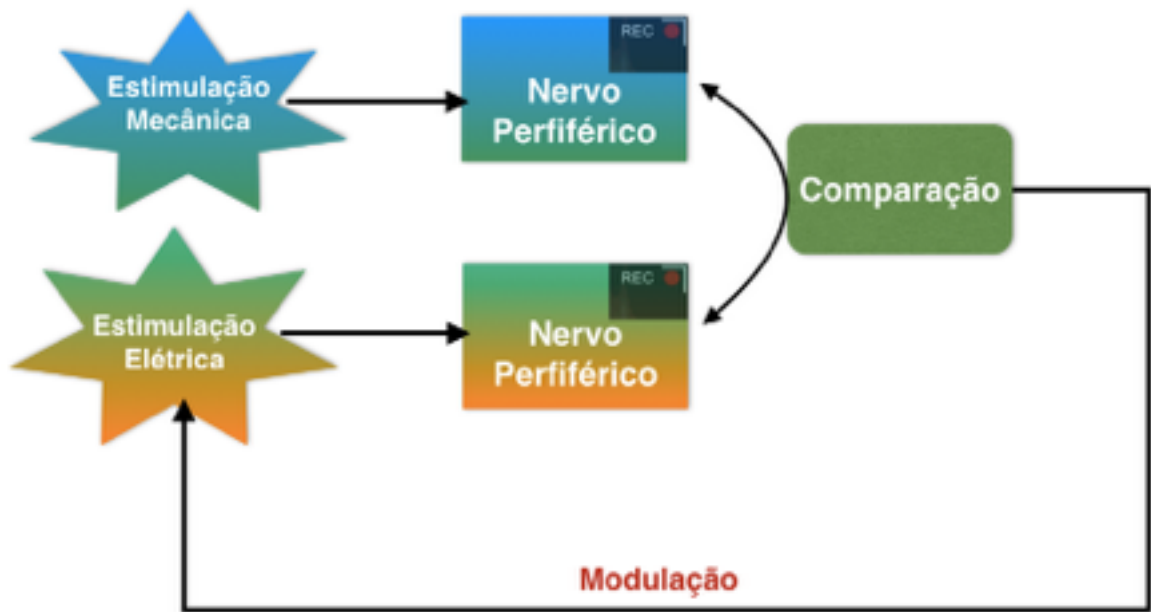


Figura 2.1 - Mecanismo para reabilitação sensorial. Esquema geral do mecanismo para a reabilitação sensorial por estimulação elétrica em nervo periférico.

A estimulação mecânica é realizada com a interação tátil na pele. A estimulação elétrica é realizada com base em respostas eletrofisiológicas coletadas do nervo periférico que inerva a região estimulada mecanicamente. Os padrões de potenciais de ação compostos observados quando um estímulo tátil mecânico é realizado são comparados com os obtidos quando o estímulo elétrico é feito. A comparação desses padrões viabiliza a modulação e o refinamento das respostas evocadas artificialmente para se equiparar a uma resposta fisiológica, dando ao indivíduo uma restauração de sensibilidade a partir de estímulo direto no nervo de forma seletiva com a criteriosa definição de parâmetros de estimulação como frequência, amplitude e duração de pulso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com esse trabalho objetiva-se compreender relações anatômico-funcionais do sistema nervoso periférico no que se refere à sua habilidade discriminante tátil. Objetiva-se também compreender como as respostas sensoriais são dadas no sistema nervoso e como essa informação pode subsidiar a concepção de uma metodologia experimental que propicie pesquisas no CID na área de reabilitação sensória.

Assim, é almejado com esse trabalho: 1. especificar procedimentos experimentais para registrar atividade eletrofisiológica de nervo periférico em modelo de rato; 2. elaborar um protocolo de uso animal para ser aprovado pelo comitê de ética de uso animal da instituição; 3. caracterizar a fabricação de eletrodo específico para a aplicação; 4. pôr em prática o método de fabricação proposto; 5. testar mecânica e eletricamente os eletrodos fabricados; 6. conceber a forma de manter o controle na quantidade de estímulo tátil realizado no experimento; 7. especificar a instrumentação necessária no aparato experimental; 8. verificar a viabilidade da metodologia proposta para mapear padrões de potenciais de ação compostos registrados no nervo em estudo e 9. identificar lacunas/problemas da proposta com sugestão de abordagens futuras.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O SISTEMA NERVOSO

A divisão mais simples do sistema nervoso pode ser dada em razão da natureza da informação transmitida. Assim, podemos ter: a) O sistema sensorio, que adquire e processa informação do ambiente, como, por exemplo, os sistemas visual e auditivo; e b) O sistema motor, que responde a informações recebidas com a geração de movimentos e outros comportamentos motores (PURVES, 2012). Uma enorme quantidade de células e arranjos intercelulares integram esses dois sistemas bem definidos de entrada e saída de informações. Há também a classificação do

sistema nervoso em Central (SNC) compreendendo o encéfalo e medula espinal e Periférico (SNP) incluindo os nervos que se projetam a partir de (ou para) regiões distais em relação ao SNC, como a conexão com receptores sensórios e com circuitos de processamento relevantes do SNC. Inclui também os componentes de atividades motora e visceral do corpo. A Figura 3.1 mostra essas divisões de forma esquemática (PURVES, 2012).

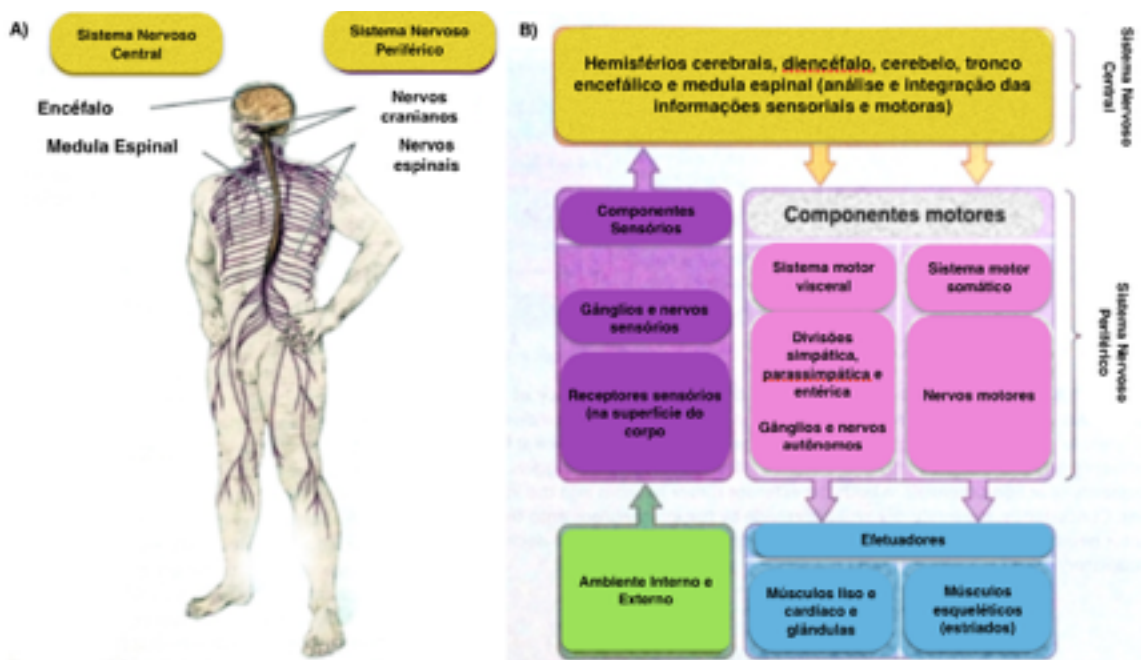


Figura 3.1 - Componentes do SN e suas relações funcionais. (A) O SNC (cérebro e medula espinal) e o SNP (nervos espinhais e cranianos) (B) Diagrama dos principais componentes dos sistemas nervosos central e periférico e suas relações funcionais. Estímulos do ambiente externo fornecem informações para circuitos de processamento no cérebro e na medula espinal, os quais integram e interpretam os significados, enviando, posteriormente, sinais para os efetadores periféricos que movimentam o corpo e ajustam o funcionamento dos órgãos internos. Adaptado de (PURVES, 2012).

Funcionalmente, o sistema nervoso executa três distintos papéis. Os receptores sensitivos detectam estímulos (internos ou externos) que são traduzidos como informação a ser conduzida até o encéfalo e a medula por meio dos nervos cranianos e espinais respectivamente. Essa é a função sensitiva do sistema nervoso. A função motora é também papel do sistema nervoso, que se configura como uma resposta adequada de acordo com a informação sensória recebida, ou o planejamento motor cortical, e realizada por efetadores (músculos e glândulas). Para que essa interação entre sensibilidade e motricidade seja possível, um terceiro

papel desenvolvido no sistema nervoso é essencial, o de integração. O sistema nervoso processa a informação sensitiva, analisando e armazenando uma parte dela e tomando decisões para fornecer respostas apropriadas. Um exemplo de função integradora é a percepção, que é a consciência de um estímulo (TORTORA, 2010).

As unidades estruturais do sistema nervoso, neurônios e células da glia, são brevemente discutidas na sessão seguinte, abrangendo também o conceito de atividade eletrofisiológica do potencial de ação, importante para o entendimento de geração e coleta de sinais biológicos à luz da neuroengenharia.

3.1.1 Biologia Celular do Sistema Nervoso

A Figura 3.2 ilustra níveis de organização da estrutura e função do sistema nervoso. Dependendo da abordagem do estudo, diferentes unidades estruturais ou funcionais podem ser levadas em consideração (LEVITAN, 2001).

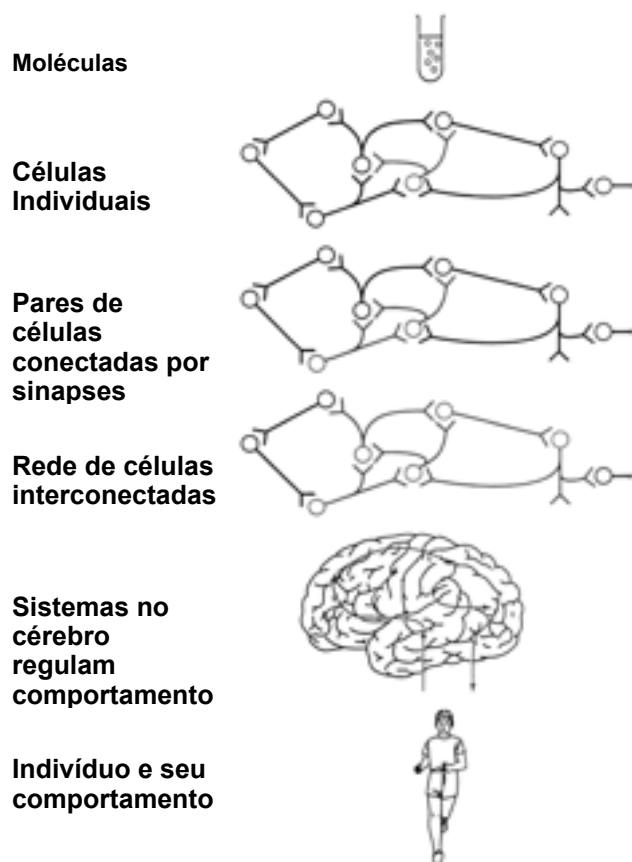


Figura 3.2 - Níveis de organização do Sistema Nervoso. Diferentes níveis de organização para estudo estrutural ou funcional do sistema nervoso. Adaptado de (LEVITAN, 2001).

Nenhum nível é inerentemente mais ou menos importante que outro e informações vindas de todos os níveis podem ser necessárias para o mais rudimentar entendimento de funções normais ou anormais do cérebro (LEVITAN, 2001). O SNC é constituído de dois tipos básicos de células: neurônios e células da glia. As células da glia são tradicionalmente conhecidas por suas funções de migração, proteção neuronal, proliferação, direcionamento axonal e efeitos tróficos, sendo, provavelmente reconhecidas como as células mais versáteis em nosso corpo. São divididas em oligodendrócitos e células de Schwann (responsáveis pela formação e manutenção das bainhas de mielina no SNC e no SNP, respectivamente) e astrócitos (responsáveis por defesa, sustentação, nutrição neuronal e modulação de sinapses).

Além desses grupos celulares, também há a chamada microglia, que abrange o grupo de células responsivas imunologicamente e que só apresentam função quando são essencialmente recrutadas (por exemplo, na presença de um corpo estranho). Por muitos anos as células da glia foram consideradas como simples agentes de suporte para os neurônios, mas recentemente tem se mostrado seu importante papel no desenvolvimento e funcionamento neuronal (NDUBAKU, 2008).

Neurônios (como o ilustrado na Figura 3.3) são mensageiros de informação. Algumas características do neurônio o tornam uma célula única e viabilizam sua funcionalidade no sistema nervoso. Existem três elementos estruturais dos neurônios, que são: corpo celular, que envolve a unidade de processamento da célula, com núcleo e suas organelas; o axônio, que é especializado na transmissão de informação intracelular; e o dendrito, que é frequentemente o local onde a informação é recebida de outros neurônios. O local onde dois neurônios se comunicam, ou onde um neurônio se comunica com uma célula efetora, chama-se fenda sináptica.

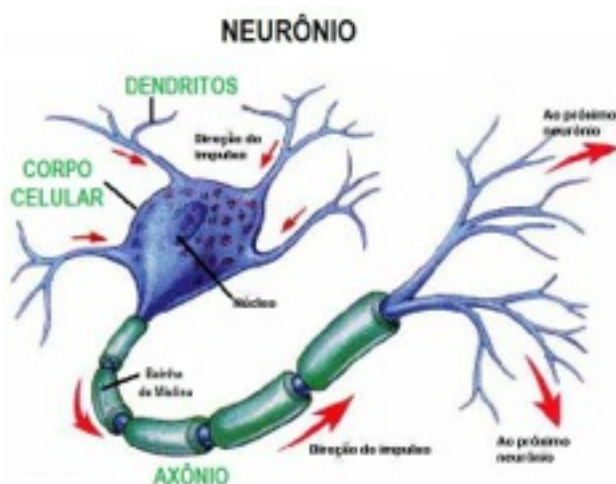


Figura 3.3 - Desenho esquemático do neurônio. As setas vermelhas indicam o sentido da condução de informação.

A maioria dos neurônios tem seus axônios envoltos por mielina, produzida por células de Schwann, que é responsável por aumentar a velocidade de condução do impulso nervoso, dado de forma saltatória. Uma classificação melhor detalhada das fibras nervosas (axônios) é mostrada na sessão seguinte.

3.1.2 Classificação das Fibras Nervosas

A classificação das fibras nervosas se dá de acordo com o diâmetro dos axônios, que por sua vez é também função da quantidade de mielina presente na célula nervosa. Essa distinção é importante pois associa-se à velocidade de condução de impulsos sinápticos na fibra, característica experimentalmente mensurável. A visualização da vasta gama de velocidades pode ser obtida por meio da estimulação artificial de um nervo sensorio com eletrochoque de curta duração (GASSER et al., 1941). Para tanto, dois eletrodos são posicionados no nervo com uma distância conhecida entre eles. Um dos eletrodos, digamos o proximal, é usado para entregar um microchoque de estimulação no nervo, e o outro, distal, serve como eletrodo de registro. Os impulsos conduzidos por fibras mais rápidas serão registrados no segundo eletrodo em um determinado tempo, e impulsos conduzidos por fibras mais lentas terão seu sinal detectado em um tempo maior. Assim, a velocidade de condução pode ser inferida como a razão entre a distância conhecida entre os eletrodos e o tempo gasto entre o microchoque de estímulo e o registro do sinal no segundo eletrodo (GASSER et al., 1941).

A classificação para os nervos periféricos inclui funções associadas às categorias de fibras: as dos grupos A e B (cuja espessura inclui mielina) e as do grupo C (não mielinizadas). O grupo A é subdividido em alfa, beta, gama e delta em ordem decrescente de diâmetro. As fibras menores são aquelas do grupo C, não possuindo mielina e portanto, com a menor velocidade de condução. Fibras mielinizadas dos grupos A e B possuem velocidades de condução que aumentam progressivamente com o diâmetro. A Tabela 1 mostra um resumo das classificações das fibras (KIERNAN, 2002). Em mamíferos, nervos motores são compostos em fibras A-alfa, A-beta, A-gama, e C e fibras puramente sensoriais são compostas por componentes A-beta, A-delta e C (MANZANO *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Classificação das fibras nervosas (GASSER, 1941).

Grupo	Diâmetro Externo (μm)	Velocidade de condução (m/s)	Fibra Mielínica	Função
A-α ou IA	12-20	70-120	Sim	Neurônios motores (extrafusais); propriocepção dos fusos musculares.
Aβ-IB	10-15	60-80	Sim	Propriocepção tendínea (tensão); sensibilidade tátil e térmica
II	5-15	30-80	Sim	Propriocepção tônica dos fusos musculares; tato discriminativo
Aγ	3-8	15-40	Sim	Motora para as fibras intrafusais dos fusos musculares; sensibilidade tátil e térmica
Aδ ou III	3-8	10-30	Sim	Sensibilidades menos discriminativas
B	1-3	5-15	Sim	Autônoma pré-ganglionar (ramos comunicantes brancos, nervos cranianos III, VII, IX e X)
C ou IV	0,2 - 1,5	0,5 - 2,5	Não	Dor e temperatura; olfação; autônoma pós-ganglionar

Além de um embasamento estrutural do sistema nervoso, conceitos funcionais importantes são relatados a seguir, de fundamental relevância para o estudo de aplicações em neuroengenharia e neurociência.

3.1.3 Análise Funcional da Atividade Neuronal

Um potencial de ação (PA) é um sinal de natureza elétrica, do tipo tudo-ou-nada, de ocorrência rápida, da ordem de um milissegundo, que inverte o potencial de membrana, seguido da restituição do estado de repouso (TORTORA, 2010). O PA só surge se um estímulo for capaz de despolarizar a membrana, ou seja, se um nível crítico, o limiar (em azul na Figura 3.4 a baixo) for atingido. Na primeira fase, ascendente, o potencial de membrana vai se tornando cada vez menos negativo, até que atinge o zero e alcança valores positivos, em um pico. Em seguida, a repolarização ocorre, em que o estado de repouso de potencial observado na membrana é restabelecido, por volta dos -70mV . Esses eventos elétricos ocorrem através da ação dos canais de membrana de sódio e potássio, dependentes de voltagem.

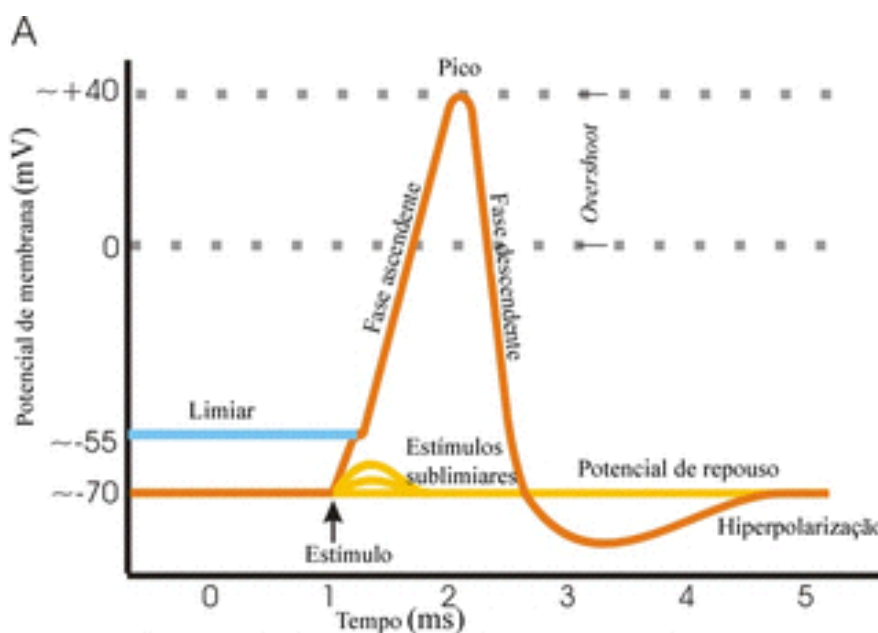


Figura 3.4 - Gráfico esquemático do potencial de ação. O potencial de membrana mostrado é hipoteticamente medido em um único ponto da membrana. Adaptado de (TORTORA, 2010).

Análises funcionais são uma poderosa ferramenta para entender o funcionamento do sistema nervoso. Diversos métodos fisiológicos estão disponíveis para avaliar a atividade elétrica e metabólica de circuitos neuronais que constituem o sistema nervoso. Duas abordagens - registros eletrofisiológicos e imagem funcional do cérebro - têm sido particularmente úteis na definição de como sistemas neuronais representam informação (PURVES, 2012).

O método eletrofisiológico mais amplamente utilizado é o registro de sinal de uma única célula, através de eletrodos que penetram o tecido e registram a atividade elétrica celular. Muitas vezes esse método abrange a captura de atividade de células vizinhas, dando mais informações na aquisição de dados. Essa técnica tem sido expandida e refinada para incluir o registro de múltiplas células ao mesmo tempo durante a investigação de atividades cognitivas, sensoriais ou motoras (PURVES, 2012). A evolução da manufatura de eletrodos permitiu que tipos de registros diferentes fossem viáveis na investigação da atividade eletrofisiológica neuronal, tanto no cérebro quanto nos nervos, de forma intra ou extracelular.

É possível medir um único potencial transmembrano através do chamado *patch-clamp*, inserindo-se uma pipeta de vidro dentro de uma célula e registrando as variações de potencial com relação ao meio extracelular, no qual repousa um eletrodo de referência (ver imagem superior da Figura 3.6). Essa técnica intracelular é usada, por exemplo, para registrar o potencial de repouso de uma fibra muscular, ou de um neurônio, o que permite um registro bastante acurado da atividade de uma única célula, mas é muito difícil de ser realizada em uma fibra nervosa de vertebrado e pode envolver consideráveis danos à membrana em volta da ponta do eletrodo.

Uma técnica que apresenta danos bem menores é o registro extracelular (ver Figura 3.5), que envolve o posicionamento de um eletrodo o mais próximo possível de uma célula excitável, mas não a penetra, tendo um eletrodo de referência no mesmo local no fluido extracelular. Esse tipo de gravação de sinal registra as variações de potencial na superfície da membrana, e não através da membrana.

Ao se entregar um estímulo suficientemente grande para que o nervo responda com o disparo de atividade eletrofisiológica, um sinal, um pouco diferente de um PA, é observado. Esse sinal é chamado de Potencial de Ação Composto, PAC, e representa uma somação algébrica de todos os PAs produzidos por todas as fibras que foram disparadas pelo estímulo. Um nervo é feito de centenas de axônios cujo tamanho, mielinização e posição com relação aos eletrodos interferem na medição do PAC (McGILL, 2005).

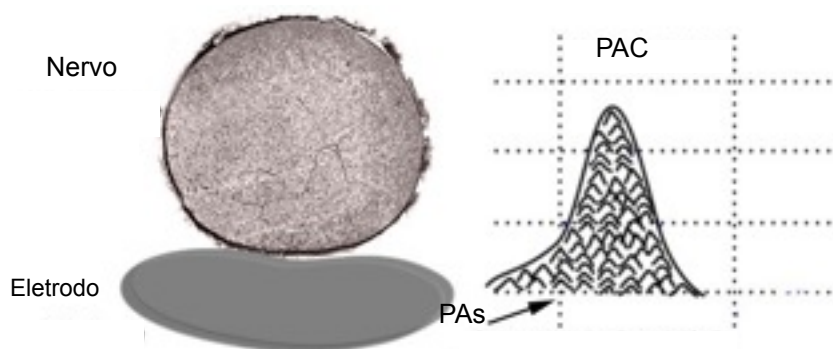


Figura 3.5 - O Potencial de Ação Composto. À esquerda, uma representação esquemática da posição relativa do eletrodo e o feixe nervoso (nervo). À direita, exemplo da formação de um PAC, sendo a soma algébrica de PAs gerados por várias células simultaneamente. Adaptado de McGill, 2015.

Ambos PA e PAC são bifásicos, ou seja, possuem deflexões positivas e negativas, mas por razões diferentes. A fase negativa do PA intracelular é atribuído ao mecanismo de pós-hiperpolarização. A fase negativa do PAC é devida à maneira como o sinal é registrado (Figura 3.6).

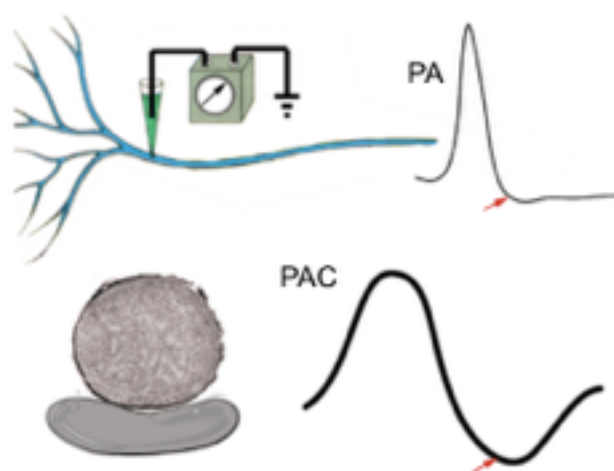


Figura 3.6 - Comparação entre PA e PAC. Representações esquemáticas comparando o modo com que o sinal de PA é registrado (coletando informação de uma única fibra) e o sinal de PAC, que é resultado da gravação de sinal realizada pelo eletrodo que capta informação de múltiplas células. As setas indicam a fase negativa, que na formação do PA significa a hiperpolarização da célula, e no PAC, a fase negativa aparece devido intrinsecamente à forma de registro do sinal. Adaptado de McGill, 2015.

Há dois eletrodos de registro tocando o nervo, cada um conectado a uma entrada de um amplificador diferencial. Antes do estímulo ser feito, ambos os fios do eletrodo devem medir basicamente a mesma tensão. Não haverá deflexão

registrada porque o amplificador pega a diferença dos sinais registrados em ambos os eletrodos antes de passar o sinal para o conversor analógico digital.

A situação muda à medida que o PAC trafega ao longo do nervo. Sua forma dependerá da distância entre eletrodos, do tamanho do segmento do axônio despolarizado por PAs e da velocidade de condução dos axônios. Quando o PAC chega ao primeiro eletrodo de registro, tal eletrodo torna-se transientemente negativo em relação ao outro eletrodo. A diferença de potencial entre os dois eletrodos é detectada e a forma de onda é vista como uma deflexão para cima.

Com a progressão do PAC entre os dois eletrodos de registro, o potencial gravado retorna ao *baseline* (sem diferença de potencial entre os eletrodos). Quando o PAC passa pelo segundo eletrodo, uma deflexão de mesmo tamanho, mas de sinal oposto, é então registrado. O sinal é negativo pela maneira como o amplificador compara essas duas entradas.

Teoricamente, se os eletrodos estão suficientemente longe um do outro, um pequeno segmento de deflexão nula será gravado antes que o PAC chegue ao segundo eletrodo de registro.

3.1.4 Mecanorreceptores medeiam o tato

Os mecanorreceptores são sensíveis à deformação mecânica do tecido no qual eles estão inseridos. Diante de um estímulo mecânico na pele, essas células especializadas provocam uma transdução de energia mecânica em potenciais de ação (energia elétrica). Impulsos elétricos trafegam pelas vias aferentes nos nervos periféricos transmitindo a informação tátil obtida pela deformação detectada pelos mecanorreceptores.

Os tipos de mecanorreceptores são classificados de acordo com três características: a sensação que transmitem, o taxa de adaptação e o campo receptor. Existem quatro tipos de mecanorreceptores presentes na pele da palma da mão: células de Merkel, corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini e terminações de Rufini (KANDEL, 2014). A Tabela 2 resume os tipos de macanorreceptores presentes na pele e medeiam o tato (PURVES, 2012).

Tabela 2 - Propriedades de mecanorreceptores do tato. Adaptado de PURVES, 2012.

	Merkel	Meissner	Pacini	Ruffini
Diâmetro da fibra	7-11 μ m	6-12 μ m	6-12 μ m	6-12 μ m
Velocidade de condução	40-65m/s	35-70m/s	35-70m/s	35-70m/s
Função sensória	Percepção de forma e textura	Detecção de movimento e controle de força da mão	Percepção de vibração	Percepção de forças tangenciais. direção de movimento
Campo receptor	Pequeno	Pequeno	Grande	Grande
Taxa de adaptação da fibra	Lenta	Rápida	Rápida	Lenta

3.2 REGISTRO DE SINAIS ELÉTRICOS NO SNP

Existem maneiras diferentes de acoplar eletrodos ao sistema nervoso periférico dependendo do tipo de sinal biológico que se quer registrar (químico, mecânico, magnético ou elétrico). Quando se deseja coletar informações de natureza elétrica, ou seja, mensuração de tensões e/ou correntes, dispositivos de microeletrodos que fazem contato com nervos periféricos ou músculos são os mais comumente usados e são os dispositivos de interface mais conhecidos (NAVARRO, 2005).

O registro de atividade eletrofisiológica é comum na clínica para diversos exames envolvendo técnicas não invasivas de coleta de dados. No entanto, na pesquisa e na investigação neurocientífica, o uso de eletrodos mais invasivos é bastante frequente. Com o surgimento e o avanço de soluções desenvolvidas para distúrbios neuronais ou para fins de reabilitação, eletrodos penetrantes estão pouco a pouco sendo utilizados em pacientes humanos e a contínua melhora na manufatura de eletrodos mais adequados a aplicações específicas é essencial para emergirem resultados significativos para a prática médica.

Eletrodos de superfície são comumente usados, por exemplo, para estimulação funcional (FES) com finalidade de restauração de funções motoras,

alívio da dor, estimulação elétrica transcutânea de nervo, monitoramento eletrocardiográfico, desfibrilhação, ritmo da superfície cardíaca e sistemas avançados de *delivery* de drogas (NAVARRO, 2005). Exames de eletrocardiografia (ECG), eletromiografia (EMG) e eletroencefalografia (EEG) fazem uso de eletrodos de superfície. A vantagem de serem não-invasivos e de fácil adaptação é contrabalançada com algumas desvantagens como baixa reprodutibilidade e qualidade do sinal adquirido (NAVARRO, 2005), além de baixa resolução temporal, quando comparados, por exemplo com a eletrocorticografia.

Os eletrodos podem ser categorizados de acordo com o quão invasivos e seletivos eles são. A Figura 3.7 mostra um gráfico que relaciona o grau de invasividade e seletividade para eletrodos utilizados em interfaces com o SNP.



Figura 3.7 - Eletrodos de Interface com o SNP. Os diferentes tipos de eletrodos aplicados a interfaces com nervos do SNP com classificação de acordo com a seletividade e invasividade. Adaptado de NAVARRO, 2005.

3.2.1 Eletrodos extraneuronais

Eletrodos que são concebidos para serem posicionados em contato com o nervo sobre o epineuro (película que envolve o nervo), são classificados como extraneuronais. Para a captura desses sinais em nervos periféricos, eletrodos extraneuronais podem ser utilizados sabendo-se que o sinal coletado será referente à composição de sinais oriundos de todo um nervo e não somente de uma fibra nervosa. Assim, esse sinal se caracteriza como um PAC, uma vez que o eletrodo envolve um nervo inteiro, e que deve ser dissecado e isolado de estruturas anatômicas vizinhas. Alguns exemplos são mostrados nos tópicos seguintes.

3.2.1.1 Eletrodos epineuronais

São eletrodos caracterizados pela composição de um longo fio que possui isolamento elétrico feito por material biocompatível e que envolvem dois ou mais contatos metálicos (usualmente de platina ou platina-irídio). Eles são posicionados no nervo e suturados no epineuro, o que requer extrema delicadeza na técnica cirúrgica. Apresentam boa estabilidade, o que permite estimulações elétricas bipolares e seletivas, com baixo grau de dano ao nervo. A Figura 3.8 mostra exemplos desse tipo de eletrodo, que pode ser utilizado em aplicações em Estimulação Elétrica Funcional (FES) para controle de respiração através de estimulação do nervo frênico (LIBERSON *et al.*, 1961) e para alívio de dor neuropática (STREGE *et al.*, 1994).



Figura 3.8 - Exemplos de eletrodos epineurais. À esquerda, da Finetech, e à direita, um eletrodo helicoidal da Cyberonics (LIBERSON *et al.*, 1961; STREGE *et al.*, 1994).

3.2.1.2 Eletrodos do tipo *cuff*

Eletrodos *cuff*, do inglês, “braçadeira” (ver Figura 3.9), são compostos por um tubo de material isolante que circunda todo o perímetro aproximadamente circular do nervo. Dois ou mais contatos metálicos são feitos na parede interna desse tubo que envolve o nervo, possibilitando o contato elétrico com o tecido neuronal. Fios isolados eletricamente emergem desse tubo e com eles é possível conectar o aparato experimental de registro de sinais eletrofisiológicos ou estimulação do nervo. Eles devem ser flexíveis, adaptando-se à circunferência do nervo, sem comprimí-lo nem esticá-lo, ao mesmo tempo que seja garantido o máximo de contato com o

tecido nervoso. Em geral, são reconhecidos por reduzirem o dano ao nervo e a magnitude da estimulação elétrica, aumentando a relação sinal-ruído dos sinais coletados (NAPLES et al, 1990).



Figura 3.9 - Exemplo de eletrodo do tipo braçadeira (CHEUNG, 2007).

A Figura 3.10 (CHU *et al.*, 2012) mostra um diagrama de blocos que ilustra como o eletrodo *cuff* é posicionado no nervo e como o sistema de coleta de dados se procede com o seu uso.

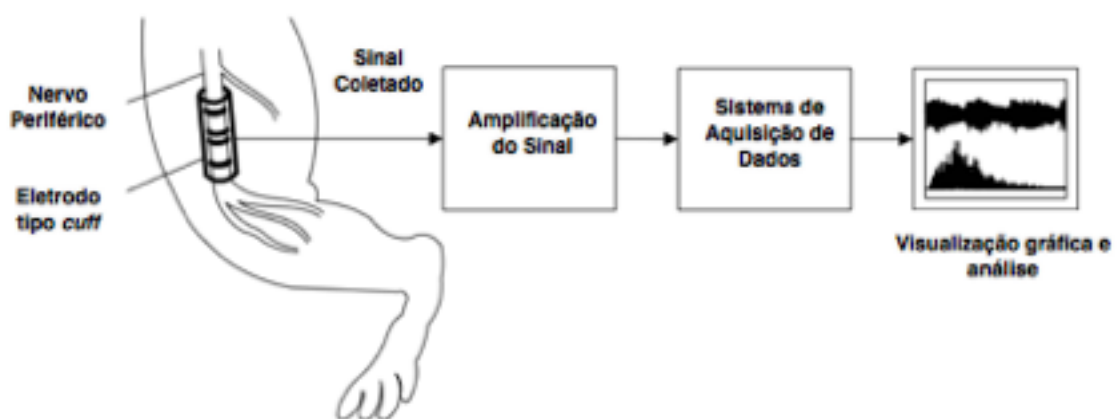


Figura 3.10 - Sistema de registro de sinal em nervo periférico. Diagrama de blocos de um sistema utilizando eletrodo do tipo *cuff* (CHU *et al.*, 2012).

Várias vantagens do uso de eletrodos *cuff* podem ser apontadas. Permitem o posicionamento correto dos fios do eletrodo, minimizando distorções mecânicas e possíveis falhas do fio (rompimento com a natural movimentação necessária no

procedimento cirúrgico) e a corrente elétrica entregue no pólo de estimulação fica confinada no espaço interno do eletrodo, evitando que corrente se espalhe para outros tecidos circundantes (LOEB e PECK, 1996). A magnitude de corrente elétrica necessária para estimulação neuronal é uma ordem de grandeza menor do que a requerida por técnicas não invasivas, ao mesmo tempo que o eletrodo *cuff* é menos propenso a gerar danos no tecido que ele “abraça”, comparado com eletrodos mais invasivos (revisados a seguir), sendo de mais fácil técnica cirúrgica, quando comparados com os eletrodos epineurais. No entanto, devido à delicadeza dos nervos e das propriedades físicas do eletrodo, danos ao tecido são inevitáveis (LARSEN *et al.*, 1998), especialmente se a implantação for feita em nervos dos membros, devido ao alto nível de movimentação.

3.2.1.3 Eletrodos do tipo *FINE*

Esse tipo de eletrodo é uma variação do eletrodo *cuff*, com uma sutil diferença no design de sua concepção. A nomenclatura *FINE* deriva do inglês, *flat-interface nerve electrode*. É um tipo de eletrodo extraneuronal, desenhado para remodelar o formato do nervo, gerando uma geometria favorável a uma estimulação mais seletiva, pois um maior contato do eletrodo é feito com o nervo, que fica esmagado dentro do eletrodo que o envolve. Sua maior vantagem é possibilitar seletividade de estimulação com resolução espacial de acessar fascículos individuais do nervo, assim como fibras específicas de um fascículo (TYLER e DURAND, 2002). No entanto, danos provocados no nervo são reportados mesmo quando o nível de esmagamento ao qual o nervo é submetido é pequeno, em casos crônicos de um a três meses de implantação (LEVENTHAL e DURAND, 2004).

3.2.2 Eletrodos intraneuronais

Eletrodos concebidos para serem posicionados dentro de nervos periféricos têm sido cada vez mais desenvolvidos no intuito de se alcançar mais seletividade (quando comparado com os eletrodos extraneuronais, por exemplo). Além da maior especificidade no registro e na estimulação, com eletrodos mais invasivos, a relação

sinal-ruído da gravação de sinais tem potencial de ser aumentada. O maior empecilho para o desenvolvimento desses eletrodos é a invasividade, que além de poder distorcer a informação procurada - uma vez que os tecidos são danificados - também provoca reações de inflamação no tecido neuronal.

3.2.2.1 Eletrodos Intrafasciculares

São posicionados dentro do nervo, fazendo contato direto com a fibra nervosa, tecido do qual se pretende registrar ou no qual realizar um estímulo. Com isso, é possível estimular determinadas fibras sem muita interferência de outras vizinhas, permitindo a maior especificidade do estímulo. Assim, múltiplos eletrodos desse tipo podem ser implantados com objetivos distintos de estimulação. A intensidade necessária do estímulo é menor para atingir os mesmos efeitos quando comparado com os eletrodos extraneuronais (YOSHIDA et al, 2000).

Há um tipo específico dessa classe de eletrodos que ficou bastante conhecido, o eletrodo LIFE (*Longitudinally Implanted intraFascicular Electrode*) por permitir a interface com subconjuntos restritos de axônios dentro de um único nervo fasciculado utilizando materiais como Kevlar, polímeros flexíveis e Pt-Ir para aumentar a resistência mecânica ao mesmo tempo em que otimiza a relação sinal-ruído (LAWRENCE et al, 2004). Apesar da seletividade do LIFE ser alta, é ainda um desafio a implantação cirúrgica de vários eletrodos destinados a seletivamente estimular feixes de fibras de forma independente e correta para realizar, por exemplo, uma correta estimulação muscular (NAVARRO, 2005).

3.2.2.2 Matriz penetrante de eletrodos

Em se tratando de uma aquisição de dados ainda mais específica, o registro de sinais de um único neurônio ou de uma população bem restrita de neurônios, é realizada com a utilização de microeletrodos do tipo unitário ou matriz de eletrodos (*array*) (CAMPBELL, 2010). O registro com esse tipo de eletrodo é extracelular e pode capturar sinais de PA ou potenciais de campo (quando a atividade elétrica

detectada é resultante de mais de uma célula). Variações desses tipos dependem da aplicação desejada em cada estudo, abrangendo configurações *single-units* para o registro de uma célula e *multi-units* para registrar várias células ao mesmo tempo, além de distribuições distintas de agulhas na superfície destinada à matriz, bem como diferentes alturas para acessar profundidades diferentes, e portanto, múltiplas regiões, como podemos ver na Figura 3.11.

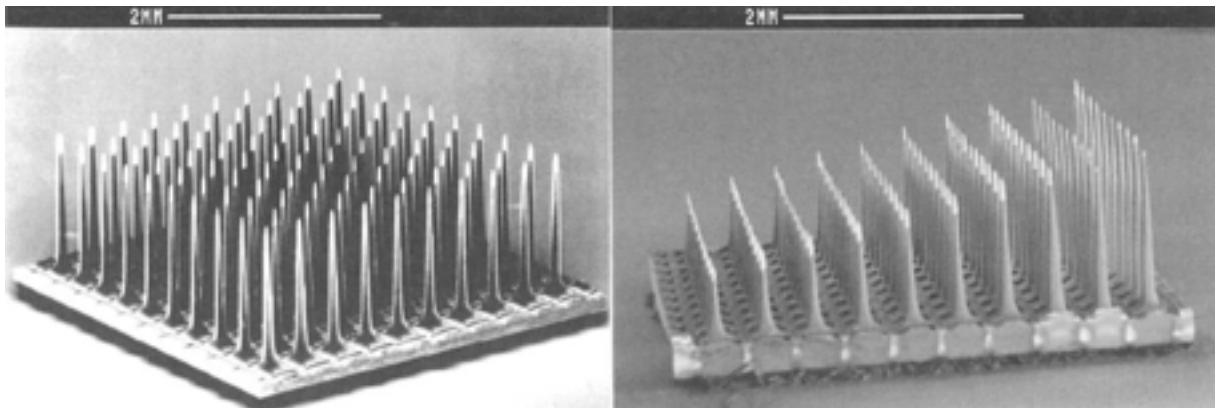


Figura 3.11 - Eletrodos de Utah. O eletrodo de Utah (esquerda) é um eletrodo em três dimensões, com 100 microeletrodos de silicone, cada um com a ponta tratada com platina. À direita, uma variação desse tipo de eletrodo, em que os microeletrodos posicionados em degrau permitem o estímulo de fibras de profundidades diferentes no nervo coclear (BADI *et al.*, 2003).

A maior parte das matrizes de microeletrodos está envolvida com a aplicação de interface com o córtex cerebral (NORHAUSEN *et al.*, 1996), mas também possui diversas aplicações em registro e estimulação de nervos periféricos (RUTTEN, 2002; SHIMOJO *et al.*, 2003, SMITH *et al.*, 1999; TAKEUCHI *et al.*, 2004, McCREERY *et al.*, 2004; BRANNER *et al.*, 2001; AOYAGI *et al.*, 2003; WARWICK *et al.*, 2003) incluindo aplicações para reabilitação motora e sensória para soluções protéticas. As vantagens do uso desses eletrodos para interfaces com o sistema nervoso são que eles permitem alta resolução temporal e espacial, permitindo registro ou estimulação simultânea de grandes populações de neurônios de forma independente, mas possuem riscos associados à técnica cirúrgica e ao processo inflamatório desencadeado após a implantação, e a estabilidade do sinal adquirido é perdida ao longo do tempo.

3.3 ESTIMULAÇÃO SENSORIAL

3.3.1 Estimulação Mecânica

Em um estudo (LEEM *et al.*, 1993) é mostrada uma estimulação mecânica no intuito de investigar mecanorreceptores em pata de rato, através de, inicialmente, estímulo suave com pincel de pelo de camelo seguido de toques com a ponta arredondada de um bastonete de vidro. Estímulos de força constante foram utilizados com um estimulador mecânico de *feedback* controlado. Esse estimulador foi desenhado para empregar uma força constante de até 400mN ou deslocamento de até 2500 μ m. Esse aparato foi posicionado em uma armadura de um microscópio articulado, possibilitando orientação em qualquer posicionamento, assim garantindo consistência na localização contanto que a ponta do corpo de prova de estimulação estivesse vertical à superfície da pele.

A utilização de filamentos de von Frey, como ficaram conhecidos após sua primeira utilização por von Frey (ZUR, 1922), foi se expandindo e tornou-se um padrão-ouro para o controle de estimulação mecânica. O uso desses filamentos é detalhadamente descrito em um estudo (BOVE, 2003), destacando sua peculiar característica de manter a força de contato constante uma vez que o filamento esteja encurvado sob solicitação axial de compressão, ver Figura 3.12. Além disso, destaca a importância desses dispositivos para a determinação de limiares de sensibilização de campos receptores do sistema sensorio em animais para melhor compreender e interpretar os comportamentos de *feedback* sensitivo e a condução da informação no sistema nervoso.



Figura 3.12 - Filamento de von Frey. À esquerda: Desenho esquemático do comportamento de um filamento de nylon quando solicitado longitudinalmente em contato com uma superfície (BOVE, 2006). À direita: Exemplo de filamento de von Frey, que é utilizado clinicamente em neurologia e em pesquisa (DanMic Global[®]).

3.3.2 Estimulação de temperatura

A análise e estudo de como o estímulo sensorial de temperatura se processa no sistema nervoso é de grande valia para o entendimento mais completo desse comportamento complexo, envolvendo a investigação dos receptores e das vias aferentes, bem como os pormenores de como esse processo ocorre e que informações são trafegadas por que fibras. A variação de temperatura da superfície da pele foi variada com a utilização de enxágue através de pipeta diretamente sobre campos receptivos sensórios em um estudo com aves (NECKER, 1974). A temperatura da água pode ser ajustada para valores entre 10 e 50 graus Celsius, sendo a temperatura sempre controlada por um termostato na ponta da pipeta.

Em outro estudo, utilizou-se contato com um tubo de ensaio com água gelada ou quente para estimular unidades termais de excitação sensorial (LEEM *et al.*, 1993). Limiares termais de sensibilização foram determinados com um *feedback* controlado, utilizando um dispositivo capaz de controlar a temperatura da pele entre 0 e 60 graus Celsius e produzir rápido aquecimento (8°C/s) e resfriamento (4°C/s) da pele.

3.3.3 Estimulação elétrica

A estimulação elétrica funcional tem sido direcionada principalmente para a

reabilitação de funcionalidade de membros (superior e inferior), intestino, bexiga, além de funções respiratória, sexual, visual e auditiva (DiLORENZO, 2008).

Os impulsos elétricos são capazes de excitar os nervos através da indução de fluxo de íons transmembrano, com a subsequente geração de potencial de ação. Esse estímulo pode resultar em uma contração muscular ou parestesia, dependendo do tipo de nervo estimulado (TSUI, 2008).

Grandes esforços científicos e tecnológicos têm sido dedicados ao desenvolvimento de sistemas biônicos híbridos com órteses e próteses eletrônicas e/ou robóticas, com o objetivo principal de restaurar funções motoras e sensoriais em pacientes com lesões medulares, cerebrais, amputações ou doenças degenerativas (NAVARRO, 2005).

O desenvolvimento tecnológico de implantes eletrônicos e do conhecimento das funções neurais tornaram possível a construção de interfaces cuja funcionalidade é a troca bidirecional de informações entre o SNC e instrumentos artificiais computadorizados através de matrizes de microeletrodos implantadas no cérebro (LAUER, 2000; NICOLELIS, 2001; DONOGHUE, 2002) ou na medula espinal (PROCHAZKA, 2001; ALO e HOLSHEIMER, 2002).

Uma análise quantitativa dos efeitos de estimulação elétrica não invasiva por eletrodos de superfície para determinar o máximo limite seguro de corrente foi mostrado em um estudo (BESIO *et al.*, 2010). Pôde-se concluir que enquanto a densidade de energia especificada aplicada for mantida abaixo de $0.92 \text{ A}^2 / \text{cm}^4 \cdot \text{s}^{-1}$, a máxima temperatura celular irá permanecer dentro de limites seguros.

O uso mais frequente de interfaces com o SNP é para estimulação elétrica funcional, que tem como base a produção de contração através da estimulação elétrica, despolarizando o nervo motor, produzindo assim uma resposta síncrona em todas as unidades motoras de um músculo. Este sincronismo promove uma contração eficiente, mas é necessário treinamento específico, afim de evitar a fadiga precoce que impediria a utilização funcional do método com o objetivo reabilitacional.

3.3.4 Neuroprostética

A neuroprostética (também chamada de prótica neural) é uma disciplina relacionada com a Neurociência e com a Engenharia Biomédica, cuja finalidade é o desenvolvimento de próteses neurais, que são um série de dispositivos que podem substituir uma modalidade cognitiva, motora e/ou sensorial danificadas devido a um acidente ou por doença. Pela substituição ou melhoria de funções comprometidas, esses dispositivos têm o objetivo de aprimorar a qualidade de vida de pacientes com alguma deficiência. Várias pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento e em testes experimentais de interfaces com o SNP que não provoquem danos às fibras nervosas, permitindo acesso à informações provenientes de vias aferentes, estimulação seletiva de múltiplas fibras nervosas, e permitir controle gradual de força muscular (BRANNER *et al.*, 2001).

Esses dispositivos implantáveis também são bastante usados em experimentos animais, como uma ferramenta para ajudar neurocientistas a ter um maior entendimento do sistema nervoso e seu funcionamento. Implantes neurais são projetados para possuírem o menor tamanho possível, para que sejam minimamente invasivos. No entanto, eletrodos para nervos têm um inerente potencial de provocar danos às fibras nervosas, que são extremamente delicadas.

A estimulação de superfície é mais simples na manufatura e *design* se comparado a outros modelos, pois o eletrochoque é aplicado por meio de um dispositivo em contato com a pele e não com o nervo diretamente. Assim, não é exigido que os materiais com os quais os eletrodos são fabricados sejam, por exemplo microscópicos e biocompatíveis.

O campo da neuroprostética visa desenvolver, por exemplo, controle de atividade motora induzida por uma estimulação elétrica artificial proveniente de *feedback* seletivo de fibras aferentes contendo informações de propriocepção e mecanorreceptores. Para isso, registros seletivos da atividade neuronal se fazem necessários com o uso de microeletrodos seguidos de uma análise de reconhecimentos de padrões (NAVARRO, 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL

A metodologia aqui proposta envolve a concepção de um experimento de registro e estimulação de nervos periféricos que inervam a pata do rato. A Figura 4.1 mostra esquematicamente como o arranjo experimental é dado para atingir o objetivo proposto com essa metodologia (rever Figura 2.1 da sessão de Objetivos).

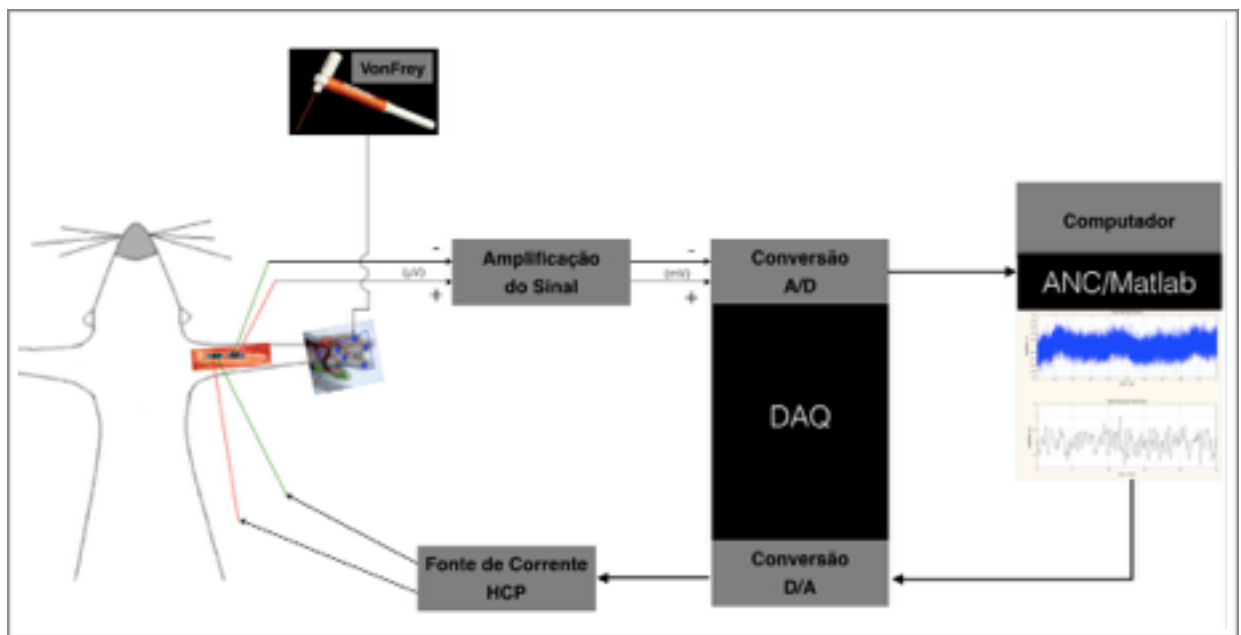


Figura 4.1 - Esquema do arranjo experimental proposto. O rato encontra-se em posição supinada com exposição da palma da mão para cima. A sigla A/D refere-se à conversão analógico-digital, D/A, digital-analógico; DAQ, à placa de aquisição de dados; ANC, ao software Autonomous Neural Control, e HCP, Howland Current Pump.

Para analisar e modular a eletrofisiologia por trás do tráfego de informação sensória nos nervos periféricos, um aparato elétrico e computacional é necessário, envolvendo circuitos amplificadores, conversão analógico-digital, computação para visualização gráfica do comportamento eletrofisiológico registrado e gerar pulsos de corrente de estimulação. Tudo isso é ainda vinculado ao estímulo mecânico, responsável por evocar as respostas sensoriais no sistema nervoso. Podemos, então, subdividir esse arranjo experimental em 5 blocos funcionais, com aparatos e métodos de finalidades distintas, descritas nas sessões seguintes (4.2 - 4.6).

4.2 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO E ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

Na Figura 4.1 vemos dois circuitos emergindo do braço do rato. Essa emergência surge de pares de eletrodos implantados no nervo (radial, mediano ou ulnar). Um par de eletrodos, de registro, é conectado à entrada de um pré-amplificador (modelo P511 *High Performance*, da marca Grass Technologies), mostrado no circuito superior do esquema. Depois, o sinal é convertido de analógico para digital, quando então é possível gerar dados na interface computacional, baseada em MATLAB, na plataforma *Autonomous Neural Control (ANC)* — explicado mais à frente —, onde o registro eletrofisiológico é graficamente visualizado e o arquivo de dados coletados pode ser gerado.

Um segundo par de eletrodos, o de estimulação, é conectado à saída de um HCP (*Howland Current Pump*), com fator de escala de corrente de 1mA/V, na configuração de estimulação por eletrodo bipolar. Esse aparato (como mostrado na Figura 4.2), consiste de uma fonte de corrente de alta impedância, cujo princípio de funcionamento baseia-se no fato de que as entradas de um amplificador operacional podem ser usadas como bomba de corrente. O circuito básico é capaz de gerar em sua saída tanto corrente positiva quanto negativa sob diversas cargas resistivas.

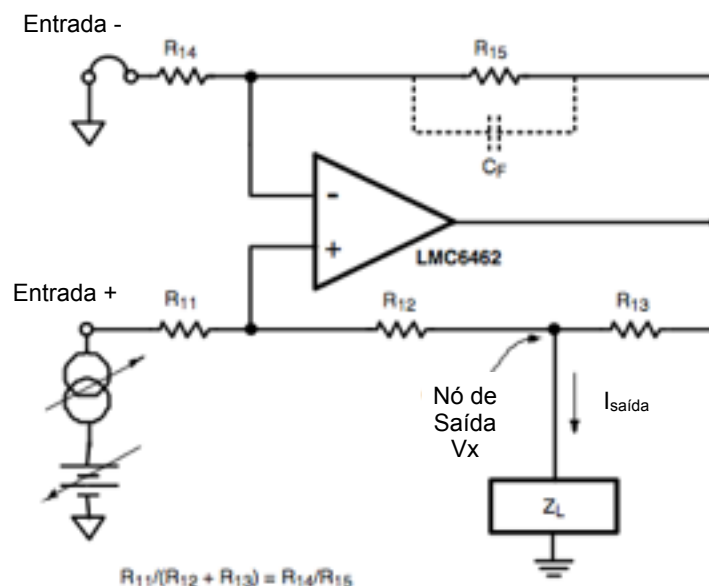


Figura 4.2 - O circuito do HCP (*Howland Current Pump*).

O circuito garante boa razão de rejeição de sinal em comum (CMRR: *common mode rejection ratio*), que atenua sinais em comum a ambas as suas entradas (inversora e não-inversora) e evidencia o sinal desejado (que é peculiar entre as

entradas). O circuito permite também que a saída gere correntes da ordem de mili ou micro amperes.

A estimulação limítrofe pode ser manualmente determinada aumentando-se a amplitude do estímulo em passos de 0.5 mV até que o potencial de ação correlacionado ao estímulo, reproduzível, seja associado. Alternativamente, o programa pode selecionar um conjunto de parâmetros que está previsto para substituir os padrões de resposta desejados e o padrão de pulsos de estímulos é convertido para uma saída analógica, lida pelo HCP.

A mesma placa de aquisição de dados (DAQ), National Instruments, USB-6353 X Series, é usada para fazer também a conversão A/D e D/A, além de intermediar a comunicação com o computador rodando o sistema ANC. Esse sistema é capaz de calcular os parâmetros otimizados de estimulação para cada padrão de PAC observado no registro referente a uma resposta de estímulo mecânico.

4.3 ESTIMULAÇÃO MECÂNICA

A estimulação mecânica se dá com a utilização de filamentos de von Frey (DanMic Global), disponíveis em 6 diferentes intensidades de estímulo possíveis: 0,4g, 10g, 60g, 180g e 300g. Os filamentos são usados de forma progressiva em relação à força nominal, e para evitar sensibilização de nociceptores, as estimulações são espaçadas entre si de 10s.

Para manter o padrão e a consistência das estimulações, é necessário fazer com que o filamento esteja curvado, pois sua propriedade peculiar de entregar a força especificada na superfície contra a qual é pressionado só é garantida uma vez que seu filamento esteja curvado. A força de curvatura é primariamente determinada pela rigidez do fibra de *nylon* do filamento, dividido pelo quadrado de seu comprimento (BOVE, 2006).

Os pontos de estimulação definidos conforme a Figura 4.7 (mostrada a seguir), são demarcados na pata do rato com auxílio de uma caneta cirúrgica. A identificação dos pontos adotados é dada tomando-se como referência os coxins, bastante proeminentes na palma do rato.

Progressivamente, os filamentos de von Frey são usados para estimular todos os pontos propostos observando na interface gráfica computacional a deflagração de um sinal expressivo característico de um PAC. Assim, podemos identificar qual o limiar de excitabilidade daquele ponto.

Ao mesmo tempo em que a estimulação sensorial mecânica é realizada, as respostas do nervo são registradas e monitoradas no sistema ANC. A ideia é se fazer uma decodificação dos padrões observados especificamente para cada estímulo (intensidade de força na sensibilização tátil) correlacionada com um padrão de atividade de PAC registrado.

4.4 O SOFTWARE ANC

Muitos recursos computacionais podem ser explorados na investigação de sinais biológicos, permitindo que análises mais robustas sejam viáveis para o processamento de dados capturados de sistemas complexos, como de seres vivos.

O MATLAB é uma linguagem que permite acesso a uma ferramenta computacional baseada em matrizes. Com sua versatilidade, esse *software* abrange cálculos matemáticos, simulações e modelagens, processamento, visualização de gráficos, e todo o respaldo numérico para soluções em engenharia (GILAT, 2011). O sistema ANC - *Autonomous Neural Control*, baseado em MATLAB, foi concebido pelos pesquisadores do CID, com o intuito de gerar uma interface gráfica simples para visualização dos registros eletrofisiológicos realizados no laboratório, bem como proporcionar a classificação de fibras registradas e a auto-adaptação de padrões de estímulos para uma série de aplicações distintas.

Na metodologia proposta, estímulos elétricos são gerados e os sinais eletrofisiológicos do nervo são registrados utilizando o ANC. Para a geração de estímulo elétrico, o *software* pode seleccionar um conjunto de parâmetros que são previstos para produzir os padrões de resposta desejados, conforme descrito em (WARD *et al.*, 2015).

O ANC é um sistema de controle de ativação de um nervo, projetado para eliminar a variabilidade de resposta de indivíduos e os efeitos ruidosos na interface do dispositivo com o tecido biológico. Em ratos, o ANC aprende rapidamente como

ativar mais eficientemente qualquer proporção de fibras A, B e/ou C ao longo do tempo. Ele fornece um novo mecanismo de dosagem com base na ativação neuronal. Em tempo real, o ANC decodifica sistematicamente o PAC do nervo para construir um perfil de ativação do nervo (PAN) específico, que descreve como cada população de neurônios irá responder a qualquer intensidade de estimulação.

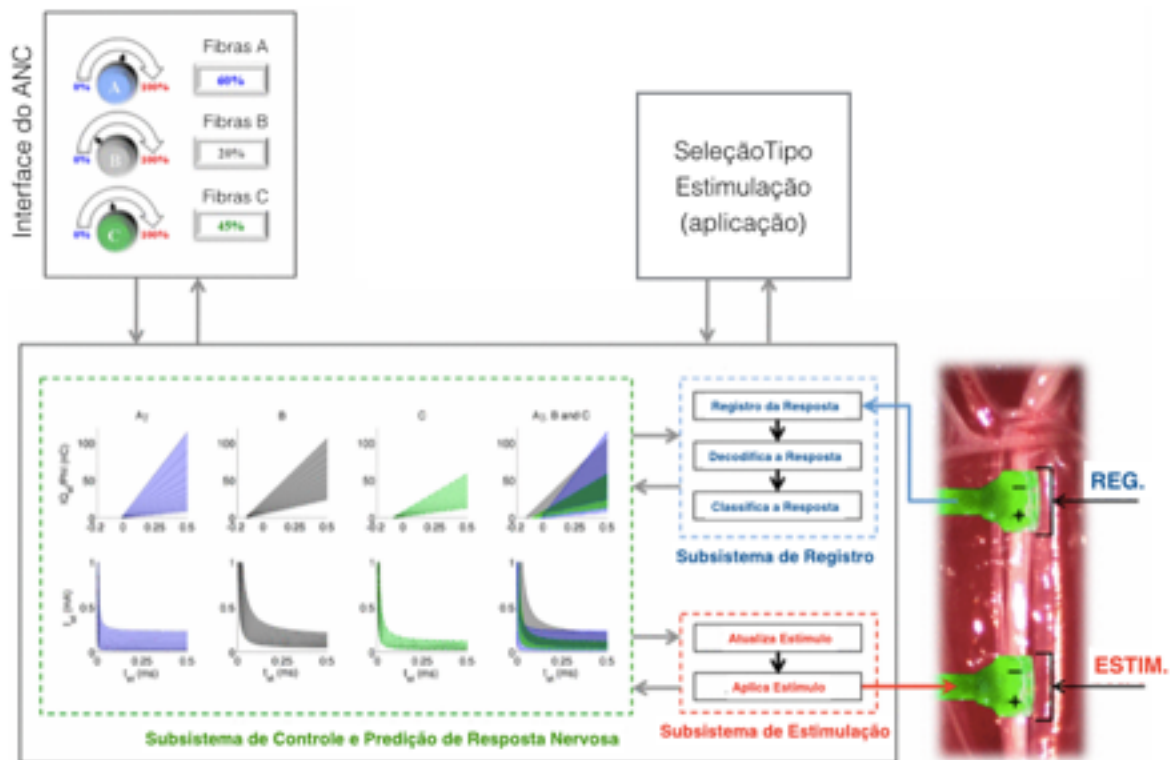


Figura 4.3 - Resumo esquemático do *Autonomous Neural Control* (WARD, 2015).

No quadro do subsistema de controle e predição da resposta nervosa da Figura 4.3, os perfis de ativação para as fibras A (azul), B (cinza) e C (verde) são traçados de acordo com as linhas previstas de duração de carga do estímulo (topo) para 0% a 100%, ativação máxima, em incrementos de 10%. A coluna da direita mostra o PAN, que prevê como todas as fibras A, B e C no nervo responderão a cada intensidade de estimulação.

Durante a estimulação elétrica o ANC refina continuamente o PAN para melhorar a sua precisão da previsão e para se adaptar a mudanças na interface tecido-dispositivo (Figura 4.3) (WARD, 2015). Esse refino é dado dentro dos limites de segurança (McCREERY *et al.*, 1997, ALBERT *et al.*, 2009), para controlar seletivamente a ativação do nervo. Ao fornecer a ativação do nervo de forma consistente, o ANC permite experimentos reprodutíveis para delinear

sistematicamente os mecanismos de PAN, simplificando o desenvolvimento de sistemas totalmente personalizados de controle de circuito fechado para o aplicações em próteses neurais.

A chave para a construção de um PAN está baseada em uma relação matemática previsível que equaciona a corrente de rebase I_{Rh} (que é a inclinação da reta de duração de carga (DC), descrita pelo equação de Weiss, mostrada na Equação 1, e seu nível de ativação da fibra correspondente. Na expressão, SD significa *Strength Duration* (duração de força) e "st" refere-se à estimulação. De modo que τ_{SD} é o período de aplicação da carga e t_{st} é o tempo que a estimulação é feita. Quando todas as linhas CD possíveis são construídas a partir de um conjunto de dados de estímulo-resposta, cada uma vai representar um nível de ativação exclusivo. Se a inclinação de cada linha (I_{Rh}) é representada graficamente contra o seu nível de ativação correspondente, uma relação exponencial é observada (ver parte inferior do Subsistema de Controle e Predição de Resposta Nervosa, da Figura 4.3). Ele é único para cada sujeito e cada nervo, e permite adaptar-se a alterações na interface tecido-eletrodo durante o curso de uma experiência.

$$\frac{1}{t_{st}} \int_0^{t_{st}} I_{st} dT = \frac{I_{Rh}(t_{st} + \tau_{SD})}{t_{st}} = \bar{I}_{st} \quad \text{Equação (1)}$$

O ANC desconstrói o PAC observado, gravado em uma distância fixa do cátodo do eletrodo, para estimar o nível e o tipo de ativação de fibras nervosas. A velocidade de condução é usada para identificar grupos distintos de fibras nervosas (ou seja, populações de neurônios), referido como A (rápido, fibras mielinizadas), B (lenta, fibras mielinizadas) ou C (fibras lentas, não-mielinizadas) (WOODBURY, 1990).

Ao gravar a uma determinada distância fixa e conhecida do cátodo de estimulação, os picos das formas de onda do PAC são separadas no tempo, devido às diferentes velocidades de condução de fibras A, B, e C. Derivando individualmente relações estímulo-resposta para cada fibra, o efeito de qualquer impulso de estímulo na atividade do nervo é diretamente mensurável.

O ANC mede, então, uma série de relações estímulo-resposta para a construção de um modelo empírico que descreve como cada tipo de fibra

responderá a um estímulo elétrico. Este modelo, PAN, descreve a sensibilidade e a variação dinâmica de cada tipo de fibra que pode ser identificado em um PAC. O ANC atualiza continuamente o PAN para melhorar sua precisão da previsão ao longo do tempo e se adaptar a uma variedade de fatores que influenciam a eficácia da estimulação (por exemplo, dessensibilização da fibra à estimulação). A sensibilidade de cada grupo de fibra para a estimulação do nervo é avaliada utilizando dados de estímulo-resposta coletados em tempos distintos.

4.5 O USO ANIMAL

Os ratos são amplamente utilizados na esfera científica no intuito de correlacionar as análises observadas com uma aplicação humana. Neste trabalho, o protocolo de uso de rato Long-Evans é detalhado a seguir e todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética de uso animal da Purdue University. As técnicas de armazenamento, manipulação, sedação, anestesia, cirurgia, eutanásia e despejo são baseados em procedimentos padrão adotados na instituição, com as adaptações, especialmente no protocolo cirúrgico, para o procedimento desejado.

No CID são realizados diversos experimentos agudos em ratos, especialmente com pesquisas em epilepsia e investigações envolvendo o nervo vago, sendo o rato Long-Evans o modelo animal apropriado e que oferece facilidade operacional para os experimentos.

Um animal, do sexo feminino, de 305g, eutanasiado após procedimento de estimulação do nervo vago foi utilizado para treinamento, estudo e identificação dos nervos radial, ulnar e mediano. A Figura 4.4 mostra uma fotografia após a dissecação de tecidos (como pele, músculos, tecido conjuntivo), da pata dianteira esquerda do indivíduo utilizado em estudo.



Figura 4.4 - Nervos periféricos em cadáver de rato. Fotografia de cadáver de rato Long-Evans utilizado para identificação dos nervos radial, ulnar e mediano.

Esses nervos foram identificados como os de interesse por serem os responsáveis por inervar a palma da pata, e portanto, serem os nervos carreadores de informação sensória localizada na pata. A Figura 4.5 mostra esquematicamente como a inervação se distribui na pata, com associação de cada nervo a uma região.

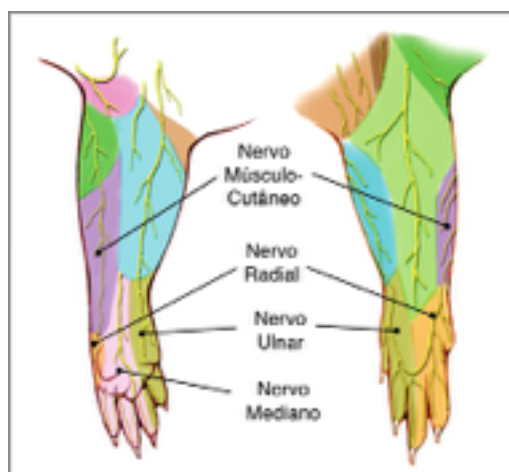


Figura 4.5 - Plexo braquial do rato. Identificação dos nervos do plexo braquial de rato na inervação cutânea em seu aspecto ventral (à esquerda) e dorsal (à direita). Adaptado de LI *et al.*, 2013.

Comparativamente, temos, na anatomia humana (Figura 4.6), uma similaridade na distribuição dos nervos na porção dos membros superiores com terminação sensória das mãos em relação ao rato. Dessa forma, a investigação de comportamentos neuronais em ratos dão respaldo a uma futura extrapolação e aplicação em humanos.

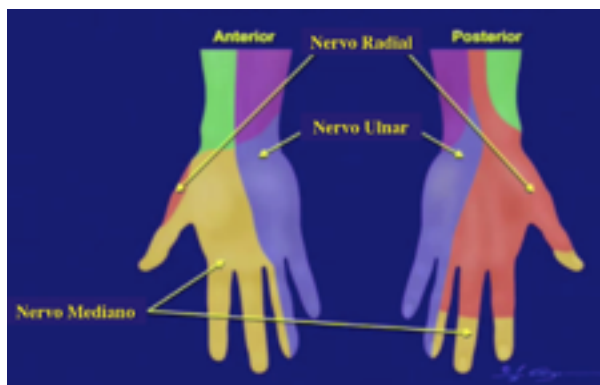


Figura 4.6 - Terminações nervosas na superfície da mão. Aspecto palmar à esquerda e aspecto dorsal à direita. Adaptado de material de ensino à distância da University of New England. (Distant education department of University of New England, Australia. Disponível online: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/u4-l37-brachial-plexus/deck/3099772>).

Podemos perceber que o nervo radial, nos ratos, abrange uma diminuta área da região palmar da pata e, nos humanos, não chega a inervar a palma. Por outro lado, os nervos mediano e ulnar são, em ambas as espécies, responsáveis por dar uma cobertura completa da palma. Essa informação é relevante na identificação dos nervos e a respectiva atividade eletrofisiológica associada a estímulos em regiões específicas da pata do animal.

4.5.1 Definição de pontos de estimulação

Com base na anatomia da inervação da pata do rato e seus respectivos mapas de terminações cutâneas, fez-se necessário definir os pontos apropriados para a estimulação com os filamentos de von Frey. A Figura 4.7 mostra a definição desses pontos, em que a região delimitada em vermelho (contendo o ponto 1) é inervada pelo nervo radial; em azul (com os pontos 2-6), pelo nervo mediano e em verde (com os pontos 7 e 8), pelo nervo ulnar.

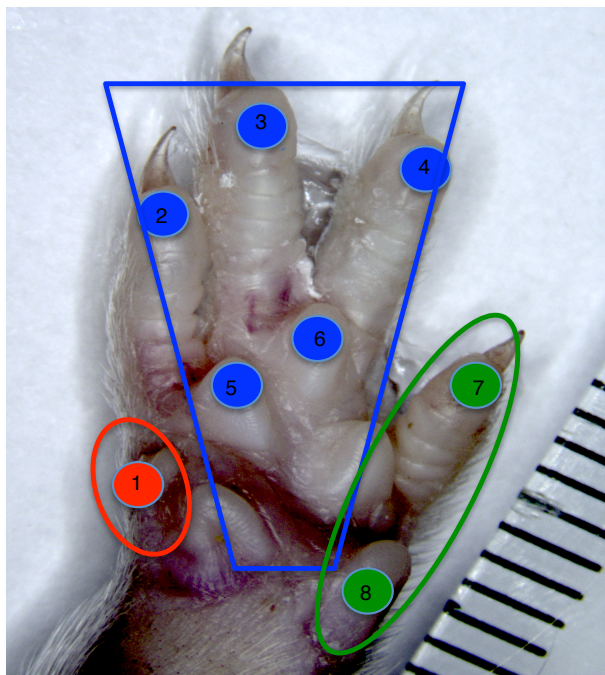


Figura 4.7 - Pontos de estimulação na pata do rato.

Para a definição dos pontos foi feita uma fotografia ao microscópio da pata do cadáver utilizado para estudo anatômico anteriormente citado. Os diagramas de inervação cutânea indicaram a identificação dos pontos, facilitada pela presença dos coxins proeminentes da palma.

4.5.2 Procedimento cirúrgico

Antes da cirurgia, o animal recebe acesso livre à água e à comida quando armazenados no biotério, localizado nos porões do prédio da Engenharia Biomédica da Universidade. O pré-operatório consiste em administração de um analgésico opióide, o Butorfanol, em dosagem de 0.5-2mg por kg do animal.

Todo o equipamento cirúrgico que pode ser submetido à autoclave é esterilizado por 20 a 30 minutos e os instrumentos que não podem, são submersos por tempo mínimo de 3 minutos em solução de Betadina 10%, sendo este um anti-séptico iodado, seguido de submersão em etanol 70% por tempo superior a 15 minutos.

O animal é recolhido do biotério em sua gaiola, levado ao laboratório coberto por pano escuro, em carrinho adequado ao seu transporte por vias de acesso restritas, evitando o estresse do animal. Esse é então pesado e posicionado na

câmara de anestesia, que é induzida por isoflurano (em oxigênio com fluxo de 1-3 L/min).

A indução é feita com a concentração de anestésico em torno de 5%, e para a manutenção da anestesia durante o procedimento, a concentração é diminuída para entre 0.5% e 3%, sendo o fluxo de O₂ mantido em 2L/min. Para testar se o animal está anestesiado de fato, a pata e/ou a cauda é prensada com auxílio de uma pinça e o batimento cardíaco é conferido, bem como se há reflexo de dor. A concentração de isoflurano é aumentada sempre que alguma alteração for indicativa de dor.

Para manter o animal com a temperatura adequada, um colchão de água morna circulante é posicionado sob o corpo e, para mantê-lo hidratado, 2-3mL de solução salina é injetada subcutaneamente a cada 3 horas de cirurgia/experimento.

Logo após a indução da anestesia, o animal é retirado da câmara de indução anestésica e lhe é posicionada uma máscara específica para boca e nariz do rato, com intuito de fazer a manutenção da anestesia. O animal é colocado em posição supinada e então é submetido à preparação cirúrgica padrão. É feita também uma aplicação de pomada oftalmológica para evitar ressecamento dos olhos, que é repassada conforme a necessidade durante o procedimento.

Subsequentemente, a região de incisão para acesso dos nervos - área ventral entre a pata e a região axilar - tem os pelos removidos com máquina de tosar e, para maior remoção de pelos em detalhe, uma lâmina é usada. A área tosada é preparada com três ciclos de limpeza alternando gaze umedecida com Betadine e com álcool isopropílico 70%.

Para acessar a região ventral do animal, ele é colocado na estação cirúrgica, equipada com microscópio e monitor de batimentos cardíacos e saturação de O₂ arterial. O campo cirúrgico é preparado ainda com panos estéreis descartáveis. Como a região a ser acessada é no braço, a pata é fixada com fita adesiva para estabilizar o membro durante a incisão e minimizar movimentos relativos durante o procedimento cirúrgico.

Uma incisão longitudinal é feita com bisturi desde um ponto mediano entre a fossa axilar e a fossa cubital até uma porção mediana do antebraço, em uma extensão de aproximadamente 2,5cm. A Figura 4.8 ilustra esquematicamente a disposição da incisão.

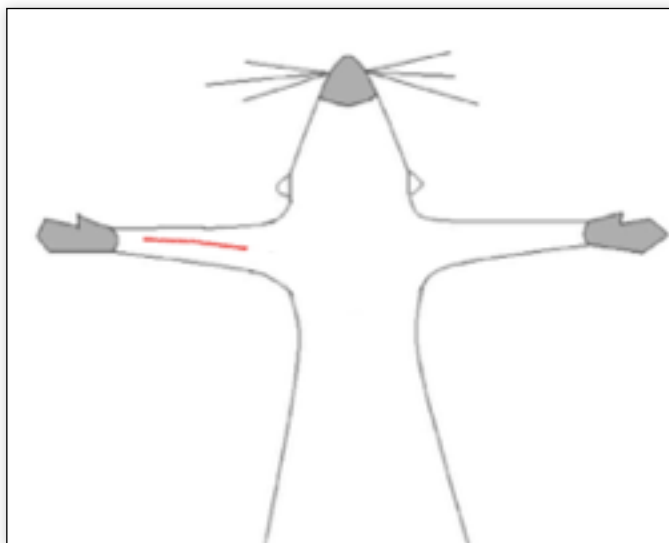


Figura 4.8 - Incisão para acesso dos nervos. Desenho esquemático do rato em posição supinada, com destaque em vermelho mostrando a incisão a ser feita cirurgicamente para acessar os nervos do plexo braquial.

Os nervos radial, ulnar e mediano são melhor identificados em porções mais proximais, pois as bifurcações ainda não são muito expressivas, facilitando a forma de isolá-los. O protocolo aqui desenvolvido permite que o experimentador os identifique e escolha qual nervo será estudado. A exposição do nervo é dada numa extensão de aproximadamente 1cm e um elástico cirúrgico de uso odontológico é usado para isolar o nervo dos tecidos circundantes e permitir acesso para posicionamento dos eletrodos.

Para identificar cada nervo, é levado em consideração que os nervos mediano e ulnar são acessados a uma distância aproximada de 1cm medial acima do cotovelo (e o ulnar se divide 0,5cm acima do cotovelo). O nervo radial é localizado seguindo uma linha lateral longitudinal acima do cotovelo, no plano entre o tríceps e o músculo braquial.

O nervo em estudo é acessado utilizando tesoura cirúrgica de ponta curvada e não cortante para afastar e dissecar os tecidos subcutâneos, até que a bainha do nervo seja visualizada. Usando um pequeno par de retratores, os músculos são afastados e segurados para expor o nervo e não fazer interferência no acesso desejado.

Até dois dos eletrodos fabricados de forma customizada para essa aplicação (explicados na sessão 4.6) são posicionados de forma a abraçarem a circunferência do nervo. O *design* e o posicionamento do eletrodo garantem uma interação estreita entre os contatos metálicos e o nervo, mas sem provocar compressão demasiada.

Para a implantação adequada, o posicionamento do eletrodo tipo *cuff* é feito com auxílio de pinças e através de visualização ao microscópio ótico. No caso de ser feito apenas o registro enquanto a pata é estimulada mecanicamente, apenas um par de eletrodos é implantado, enquanto que na situação em que a estimulação elétrica também for realizada, o segundo par de eletrodos é implantado a uma distância de 7mm.

O acompanhamento dos parâmetros vitais do animal é feito de 15 em 15 minutos, com o preenchimento de uma ficha, em que são anotados: a frequência cardíaca, o nível de saturação de O₂, quantidades e horários de todas as injeções fornecidas com as respectivas concentrações e dosagens e nível de isoflurano usado para manutenção anestésica.

Para apoiar o braço do rato em uma posição adequada ao acesso de estímulo na palma da pata, foi concebido um suporte simples para elevar o braço do animal, sendo posicionado abaixo do colchão de aquecimento. Além disso, para propiciar que a pata fique espalmada e favoreça o estímulo mecânico, uma fita adesiva dupla-face é posta entre o leito cirúrgico e a região dorsal do membro em experimentação. Assim, nenhuma forma de amarrar a pata é necessária, o que poderia influenciar a excitação dos mecanorreceptores. A região dorsal da pata, como anteriormente visto na Figura 4.2 é inervada pelos nervos ulnar e radial, sendo o mediano dedicado à inervação da palma.

Após o término do experimento, e finalizada a coleta de dados, a eutanásia é feita com overdose intraperitoneal de solução de pentobarbital sódico em doses de 150-200 mg/kg. Os batimentos cardíacos são acompanhados, bem como a coloração das patas. Após o óbito, o corpo é encaminhado para o congelamento, de onde o descarte é feito pela administração do prédio de Engenharia Biomédica.

Todas as experiências de estimulação e registro são realizadas enquanto o rato está sob anestesia, garantindo que o animal não sofra e não tenha dor. Uma vez que os eletrodos sejam corretamente posicionados, o protocolo de estimulação mecânica e elétrica pode ser realizado como mostrado a seguir.

4.6 ELETRODOS TIPO *CUFF*

4.6.1 Manufatura dos eletrodos

A fabricação customizada dos eletrodos a serem utilizados no experimento proposto é crucial para promover a adaptação adequada aos nervos em estudo. Diante das várias aplicações em eletrofisiologia do CID, vários eletrodos são utilizados no laboratório, desde comerciais a artesanais, especialmente para uso em nervo vago. A explicação a seguir mostra como, dentro da metodologia, os eletrodos são fabricados para otimizar o seu uso nessa aplicação. A própria metodologia de fabricação foi melhorada (em relação à limpeza, praticidade de manufatura, produtividade e qualidades elétrica e mecânica) quando comparada com técnicas adotadas previamente em aplicações para outros nervos e animais (camundongo e coelho). Algumas metodologias falhas ao longo das tentativas de fabricação foram descartadas e aqui são mostrados os passos da fabricação do método em que se obteve sucesso para gerar uma produção satisfatória.

A Figura 4.9 mostra o resultado final da fabricação de dois pares de eletrodos ainda unidos na mesma braçadeira de silicone. Podemos observar que o eletrodo é composto por um longo fio entubado, que se conecta à braçadeira (à direita da fotografia), onde os contatos metálicos ficam localizados. O perfil da braçadeira é em formato de “C”, permitindo uma abertura pela qual o nervo é posicionado. A Figura 4.12 adiante mostra essa relação.

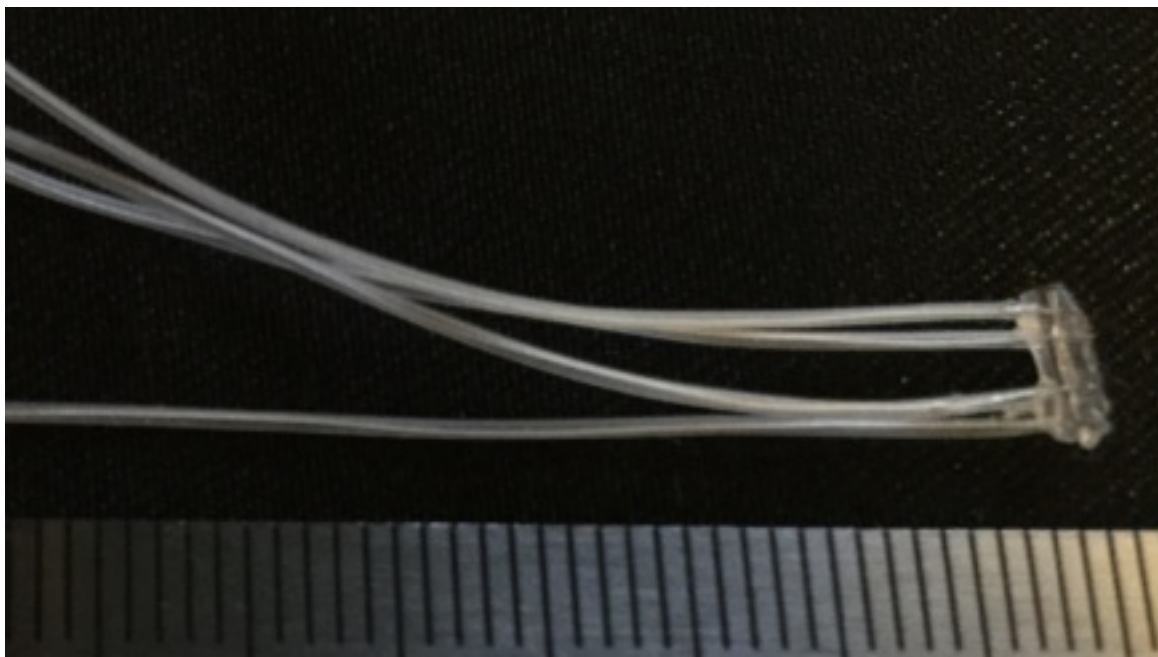


Figura 4.9 - Eletrodo fabricado. Foto com um exemplar da fabricação de eletrodo, com dois pares ainda na mesma braçadeira, espaçados para posterior cisão. Cada marcação da escala corresponde a 1mm.

Assim, o eletrodo é superficialmente todo envolto por silicone, e internamente, o contato com o nervo é feito com uma placa de platina-irídio (90% - 10%). O fio que o conecta com o restante do aparato elétrico da configuração experimental, é feito de uma liga metálica baseada em cobalto - 35N LT, e encapada com material isolante de espessura de 3.5 μ m. Todo o processo é descrito nos tópicos seguintes.

A) Preparação do componente metálico.

É utilizada uma fita de platina-irídio (Pt-Ir), de largura de 1.5mm, espessura de 0.1mm, para cortar pequenos retângulos, de comprimento de 2.9mm (ver Figura 4.10), com auxílio de paquímetro, microscópio e bisturi. A definição do comprimento se deu com base no diâmetro do nervo mediano de rato Long-Evans de aproximadamente 305 μ m, medido como 1mm de diâmetro.

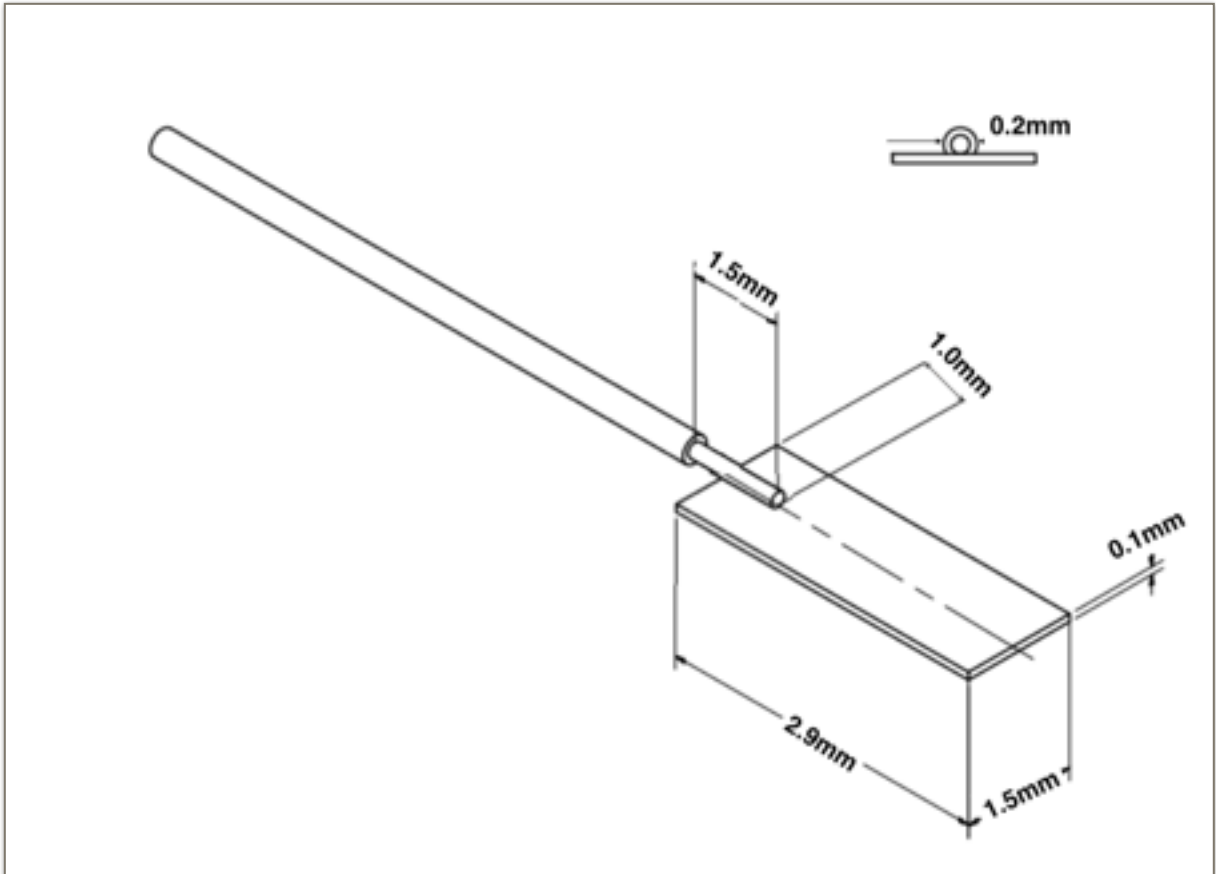


Figura 4.10 - Dimensões do eletrodo. Dimensões da placa retangular (contato de Pt-Ir) do eletrodo e a relação de solda com o fio (região desencapada).

O fio é desencapado numa extensão de 1.5mm e a uma distância de 1.0mm a partir de sua extremidade é demarcado o ponto onde se faz o contato de solda para unir o fio à pequena placa retangular de Pt-Ir. A solda é realizada com uma máquina de *Spot Welding*, cujo princípio de funcionamento é tal que uma alta corrente de pulso de curta duração é gerado entre o fio e a placa, e o calor gerado no fluxo da corrente é capaz de realizar a solda muito específica na escala de micrômetros. O resultado, após a solda é como mostrado na Figura 4.11. A placa de Pt-Ir é posteriormente encurvada para “abraçar” o nervo, como mostra esquematicamente a Figura 4.12.

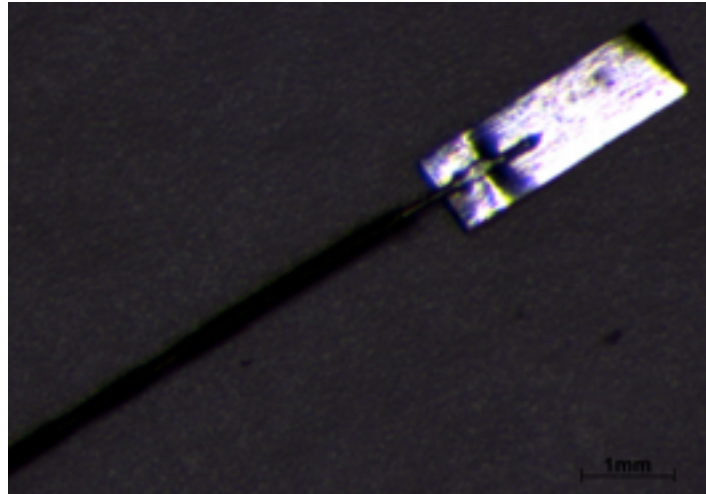


Figura 4.11 - Fio soldado na contato de Pt-Ir. Fotografia ao microscópio ótico.

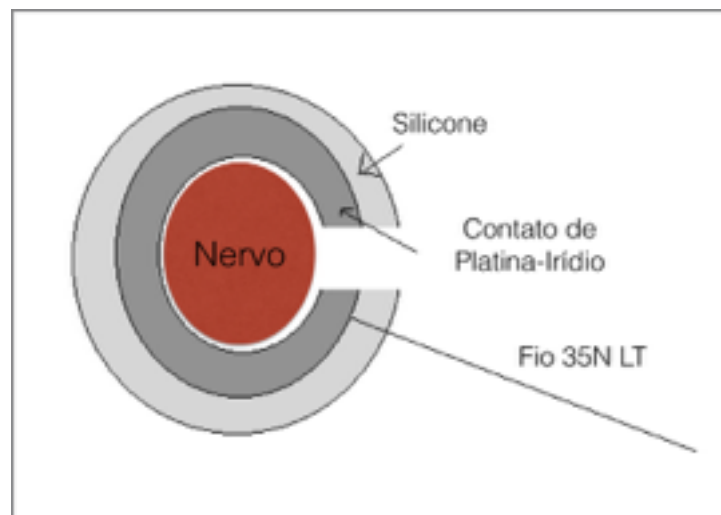


Figura 4.12 - Disposição do nervo no eletrodo. Desenho esquemático da constituição do eletrodo e sua posição em relação ao nervo.

O perímetro do “C” de Pt-Ir formado deve ser de 2.9mm, pois o nervo, de 1mm, possui uma circunferência de aproximadamente 3,14mm. Deixando em torno de 30° do total de 360° da extensão da circunferência para a abertura do “C”, o comprimento da placa de Pt-Ir é de 2.88mm, aproximado para 2.9mm.

B) Fazendo braçadeiras de silicone

Duas placas de fibra de vidro reforçada com epoxy (usualmente utilizadas para fabricação de placas de circuito impresso) são utilizadas para formar um molde, onde um vinco de 1mm de profundidade e 2mm de largura é feito em cada uma das placas. Esses vincos, de extensão de 7cm são preenchidos com silicone biocompatível de cura rápida (MED2 4420, NuSil, Silicone Technology) e um mandril

de 1mm de diâmetro é posto por cima do silicone de uma das placas e a segunda placa é posicionada na parte superior. As duas placas são firmemente fixadas com auxílio de pregadores e o conjunto fica secando de um dia para o outro.

Assim, no vinco das placas é formada uma camada de silicone, com um mandril entre as placas, internamente ao silicone. Após a cura do polímero biocompatível, o resultado é um tubo, cujo furo é formado com o mandril (que serve de molde interno e de guia, mas é removido para dar espaço à abertura onde o nervo se posicionará), tendo diâmetro externo de 2mm e diâmetro interno de 1mm. Os excessos de silicone podem ser cortados com auxílio de um bisturi, para deixar a superfície externa da braçadeira mais uniforme. Pequenos excessos de silicone nas extremidades do mandril são cortados, para permitir a manipulação do tubo através do próprio mandril (e não em contato com o silicone).

Uma vez que o tubo está feito e com o silicone totalmente curado, a abertura do "C" é feita prendendo-se as extremidades livres do mandril a uma superfície rígida, como uma lâmina histológica, e efetuando um corte longitudinal no silicone com um bisturi.

C) Passando os fios para dentro da braçadeira

Ainda com o mandril dentro da braçadeira, e fixo nas extremidades, utiliza-se uma agulha de seringa, de *27-gauges*, para penetrar a parede de silicone. A perfuração é feita em apenas uma das paredes, próxima à abertura do C. Essa agulha serve de guia para passar o fio do eletrodo (feito no passo A). Uma vez que o fio é "costurado" através da parede de silicone, a agulha é removida. Uma distância de 1mm é medida com um paquímetro, e a agulha é inserida para repetir o processo. A cada dois fios, um espaçamento maior é dado para, posteriormente, permitir a cisão dos pares de eletrodos. Um máximo de 6 pares é possível de ser feito no mesmo tubo de silicone. Mais do que 12 fios sendo trabalhados ao mesmo tempo torna o controle manual confuso e difícil. A Figura 4.13 mostra uma fotografia do ponto até agora. É recomendado que as placas de contato de Pt-Ir na extremidade inferior (da imagem mostrada) sejam posicionadas em alturas diferentes para facilitar a manipulação e acesso aos contatos no passo seguinte.

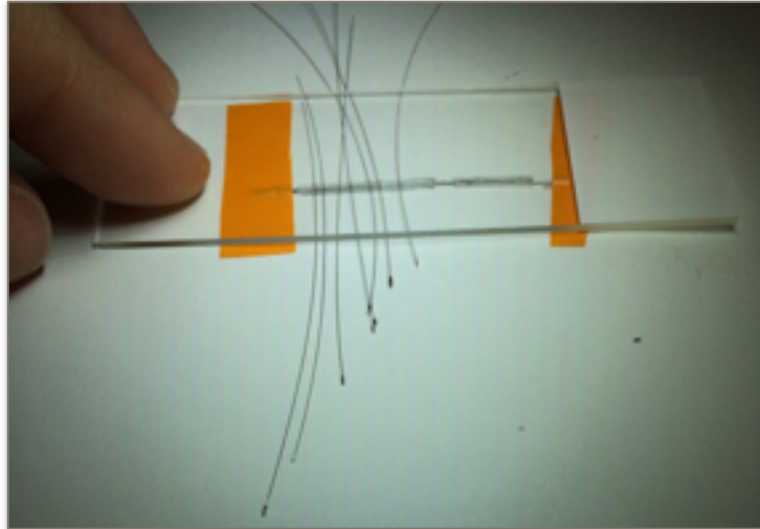


Figura 4.13 - Etapa de fabricação de eletrodos. Fotografia mostrando, na parte superior, o tubo de silicone (com o mandril inserido em seu interior) com fios metálicos inseridos na parede da braçadeira.

D) Encurvando os contatos de Pt-Ir

Um segundo mandril é utilizado para moldar a curvatura da pequena placa retangular de Pt-Ir. A face da placa que contém a solda com fio fica voltada para baixo, tocando o suporte rígido, e a sua superfície lisa fica em contato com o mandril, que é posicionado sobre a placa. Com auxílio de pinça, a placa de Pt-Ir é encurvada fazendo leves pressões em volta da circunferência do mandril. A Figura 4.14 mostra uma fotografia dessa etapa em realização, em que vários contatos estão envolvendo a circunferência do mandril-molde (parte inferior da imagem).



Figura 4.14 - Contatos são encurvados. Fotografia da etapa de fabricação do eletrodo em que os contatos são encurvados com auxílio de um segundo mandril.

Após a curvatura de todos os contatos de Pt-Ir, o mandril-guia do tubo de silicone pode ser delicadamente removido e o segundo mandril-molde, com as placas de contato o envolvendo é puxado para dentro da braçadeira, encaixando os contatos encurvados dentro do tubo de silicone, de perfil em “C”. O mandril-molde pode ser removido deslizando-o longitudinalmente, até sair por completo de dentro da braçadeira e dos contatos. Para garantir que os contatos fiquem presos à braçadeira, pequenas gotas de silicone MED2 4420 são postas entre a placa encurvada e a parede interna da braçadeira.

Como os fios são muito delicados e serão sujeitos à manipulação intensa na cirurgia durante a implantação do eletrodo no nervo, bem como no arranjo de conexão com o restante do aparato elétrico, eles são reforçados com um tubo de silicone comercial. O fio é inserido no tubo e o contato com a parede externa da braçadeira é feito com a colocação de uma gota de silicone MED2 4420 e o conjunto todo é deixado para cura por pelo menos 3 horas. Os pares de eletrodos são seccionados em cortes a cada dupla de fios, feitos com bisturi.

4.6.2 Teste de resistência mecânica

Para garantir um controle de qualidade nos eletrodos fabricados, eles são testados mecanicamente para validar a força da solda feita entre o fio e o contato de Pt-Ir. Para isso, primeiro, testes de tensão são realizados em eletrodos comercialmente certificados para se ter como referência. Depois os fabricados com a metodologia proposta são testados levando em consideração a curva de tensão-deformação gerada para o eletrodo da Precision Joining Technologies. Assim, podemos garantir uma maior qualidade do eletrodo e diminuir o risco de quebra no momento da implantação. O teste é realizado com um sistema *Test Resource*, do Laboratório de Biomecânica do departamento de Engenharia Biomédica da Purdue University, que conta com técnicos e estudantes para realização dos ensaios requeridos.

O ensaio de tração determina como um material reage em tensão. Nesse teste uma amostra deforma-se, tipicamente até a fratura, aumentando gradualmente a uma carga uniaxial aplicada na tensão. A máquina de ensaio de tração alonga o espécime a uma taxa constante. Durante este procedimento, o sistema irá registrar o

tempo, o deslocamento axial, e a quantidade de carga aplicada. A taxa de deformação é a taxa à qual a deformação de uma amostra é submetida.

A máquina de teste de tensão é ajustada para teste de tração e as braçadeiras de suporte para imprimir a tensão desejada no elemento de prova são esquematicamente ilustradas na Figura 4.15. Pequenas garras são utilizadas para segurar a placa de Pt-Ir e um grampo emborrachado, para prender o fio. Os grampos devem estar apertando apenas ao redor da área que não está soldada.

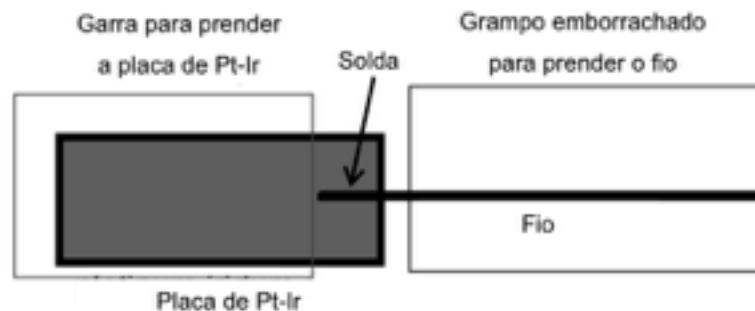


Figura 4.15 - Disposição do eletrodo no teste mecânico. Esquema de como o fio e a placa de Pt-Ir são acoplados na máquina de teste de tensão da solda.

O sistema realiza a aquisição de dados, com os quais é possível traçar a curva de tensão (σ) - deformação (ϵ). A tensão quantifica a resistência do material a uma mudança estrutural na presença de uma carga aplicada (F) em relação à área de secção transversal da amostra (A_0), segundo a Equação 2.

$$\sigma = F / A_0 \quad (\text{Equação 2})$$

A deformação descreve a modificação estrutural do material quando é aplicada a carga e está definida na Equação 3, em que l_0 é o comprimento original antes do ensaio e l_i é o comprimento atual.

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0} = \frac{l_i - l_0}{l_0} \quad (\text{Equação 3})$$

Tal como definido pela lei de Hooke, tensão (σ) e deformação (ϵ) são proporcionais durante a fase elástica (Equação 4). O módulo de elasticidade (E) ou de Young descreve a rigidez ou a resistência do material à deformação elástica.

$$\sigma = E\varepsilon$$

(Equação 4)

Os ensaios são normalmente concebidos para detectar uma deformação elástica, o que significa que, quando a carga é removida a partir da amostra voltará à sua forma original. Portanto, é importante para determinar a carga máxima que um material pode experimentar sem sofrer deformação plástica ou deformação permanente não recuperável durante o ensaio de tração. Quando um material deforma além da deformação elástica a lei de Hooke não é mais válida. A Figura 4.16 mostra um exemplo da relação tensão-deformação de um material ensaiado até a falha.

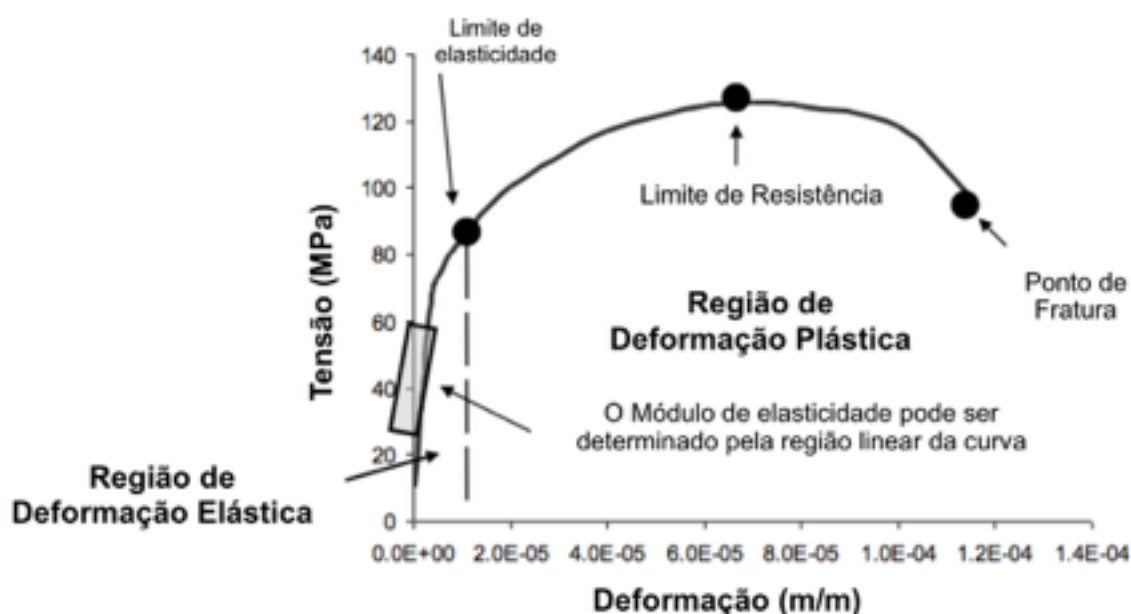


Figura 4.16 - Exemplo de uma curva tensão-deformação.

4.6.3 Teste de impedância elétrica

Depois de fabricados, os pares de eletrodo precisam passar por um teste de impedância elétrica para simular o seu comportamento diante de aplicações biomédicas, garantindo a maior qualidade do sinal e a segurança do animal em experimentação.

Para tanto, é realizada uma espectroscopia eletroquímica de impedância com um sistema de potenciostato (Gamry Reference 600), submerso em solução tampão-fosfato (pH = 7.4). O ensaio eletroquímico é realizado em cada eletrodo, com análise de resposta à frequência (ARF) e voltimetria cíclica (VC), para identificar

a impedância inicial, a capacidade de carga e qualquer dano na construção, como pontos quebrados (rompimento da solda por exemplo). Os ciclos de voltimentria, consistindo de uma escala de -0.6 a 0.8 V com variações de 1V/s são realizados nesse intervalo pelo fato de que é uma janela de eletrólise aquosa capaz de proporcionar a oxidação de platina e irídio, sem comprometer a integridade do eletrodo.

De uma forma sucinta, os impulsos gerados ciclicamente são usados para produzir uma reação de oxi-redução em meio aquoso (solução de fosfato) e assim gerar óxido de irídio na superfície exposta ao meio de reação do eletrodo de Pt-Ir. A camada de óxido aumenta a área de superfície efetiva do eletrodo, cria mais estados de oxidação, e desse modo diminui a impedância da transferência de carga na interface eletrodo-eletrólito. Outra maneira de olhar para a reação é que a película de óxido permite que o eletrodo passe mais carga através da interface eletrodo-tecido, usando menos energia do que seria necessário sem a camada de óxido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A metodologia desenvolvida com este trabalho passou por aprovação pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso Animal (IACUC) da Purdue University, onde a concepção deste trabalho se deu (Protocolo 1112000390A007), atendendo às diretrizes científicas abordadas nos Estados Unidos, referência mundial em produção científica, seguindo o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, publicado pela Academia Nacional Americana.

A seguir são mostrados os resultados obtidos com a aplicação da metodologia proposta. Para a fabricação dos eletrodos, é feita uma análise comparativa com a metodologia adotada anteriormente pelos pesquisadores do laboratório, além de uma análise funcional de suas propriedades mecânica e elétrica. Do experimento realizado com um rato são mostrados os dados gerados e processamentos preliminares da informação neuronal.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS

Vários ajustes de otimização do processo de fabricação e especificação de dimensões do eletrodo tipo *cuff* foram feitos para se chegar ao procedimento descrito. Anteriormente a esta abordagem, a fabricação consistia basicamente em utilizar um tubo de silicone comercial e um fio de Pt-Ir, que era desencapado em uma pequena extensão, a qual era “costurada” dentro do tubo para fazer o contato metálico na superfície interna da braçadeira. Por fazer uma área de superfície de contato muito pequena, era comum que esses eletrodos não passassem pelo teste de impedância elétrica, tornando o processo, mesmo sendo simples, demorado para alcançar eletrodos totalmente funcionais, por motivo de retrabalho.

Aquele processo, por ser mais simples, deixava a desejar na variabilidade de aplicações, pois suas dimensões não eram configuráveis/ajustáveis e ainda havia imprecisão do contato elétrico com o nervo, associado à incerteza do quanto de fio desencapado estaria em contato com o tecido nervoso. Com a emergente intenção de se investigar nervos do membro anterior do rato, requerendo diferentes dimensões, a nova metodologia se fez imprescindível.

A primeira etapa do processo de fabricação dos eletrodos envolve a solda do fio de liga metálica baseada em cobalto na pequena placa retangular de Pt-Ir. Essa união é feita em escala microscópica, e o dispositivo resultante é manipulado macroscopicamente em várias etapas até a sua implantação no nervo do animal, sendo sujeito a tensões no decorrer do experimento. Para diminuir o risco de falha mecânica, por exemplo durante o procedimento cirúrgico, o teste de tensão mecânica é realizado em cada conjunto fio-contato antes de proceder a manufatura dos eletrodos em suas braçadeiras. O teste foi realizado no laboratório de biomecânica do departamento de Engenharia Biomédica da Purdue University que recebe a demanda de ensaios do departamento. Para ter como referência um padrão de qualidade mecânica da ligação entre o fio e o contato, eletrodos (apenas o contato-fio) comerciais da Precision Joining Technologies foram testados. Cinco eletrodos comerciais foram ensaiados até a falha e os resultados apontaram para um módulo de elasticidade característico de 865MPa e tensão de falha de 4,7MPa.

Foram enviados 40 fios soldados em contatos de Pt-Ir conforme especificado no protocolo deste trabalho para teste de rigidez da solda. O ensaio não foi de

fratura, e sim de teste para saber se, ao submeter uma tensão de até 4,7MPa, ocorre falha. Caso não ocorra a falha (fratura da solda), o eletrodo é tido como mecanicamente conferido para os próximos passos da fabricação do eletrodo tipo *cuff*. Dos 40 elementos ensaiados, 11 apresentaram falha antes de 4,7MPa, dos quais a média de tensão de fratura foi de 3,45MPa. Os outros 29 que resistiram apresentaram comportamento aproximadamente linear com módulo de elasticidade médio de 863,5MPa.

De acordo com o aproveitamento obtido, podemos dizer que houve uma taxa de sucesso mecânico de 72,5%. As Figuras 5.1 e 5.2 mostram gráficos resultantes para dois eletrodos testados (um em que a falha ocorreu antes dos 4,7MPa, mais precisamente aos 3,88MPa, e outro exemplificando um caso em que eletrodo resistiu sem fratura ao carregamento máximo).

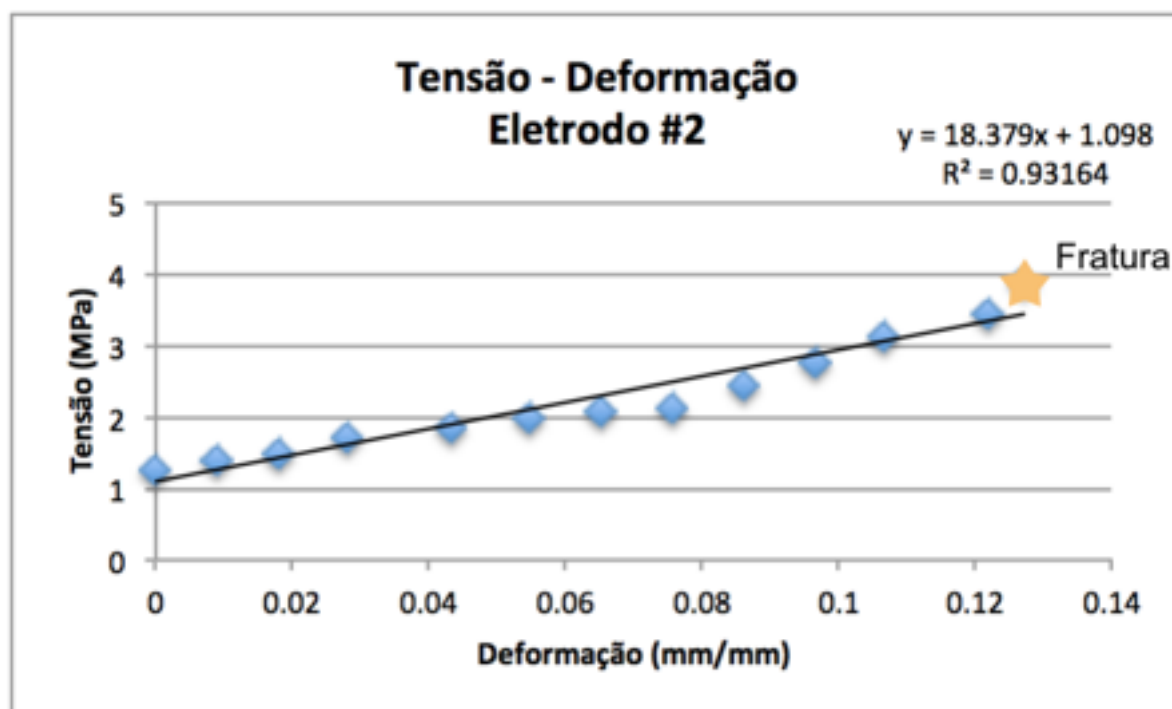


Figura 5.1 - Tensão-deformação do eletrodo fabricado (#2). Exemplo de ensaio que culminou em falha do eletrodo em esforço menor que o especificado.

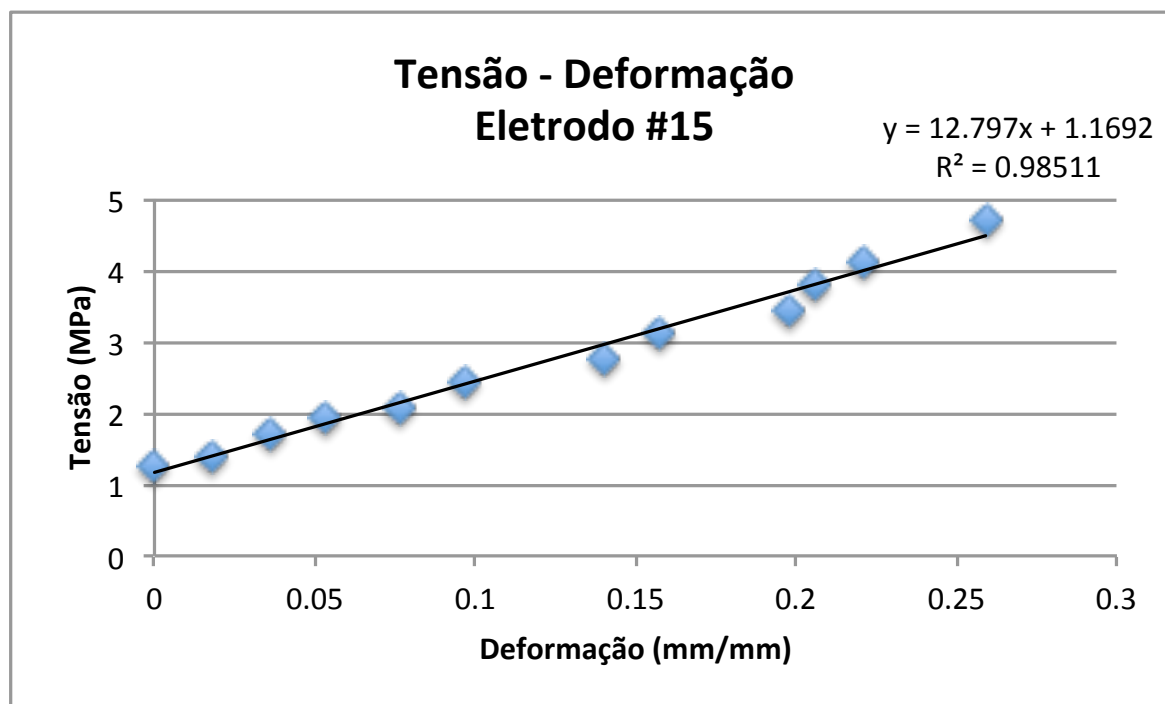


Figura 5.2 - Tensão-deformação do eletrodo fabricado (#15). Exemplo de ensaio em que a solda do eletrodo resistiu ao carregamento exigido (4.7MPa) sem falhar.

Um total de 25 pares de eletrodos foram fabricados (utilizando apenas conjuntos de fio-contato com teste mecânico aprovado) no período de 2 semanas, em 6 horas diárias de trabalho, totalizando uma média de fabricação de 1.2 horas/eletrodo. É importante lembrar que algumas etapas do processo exigem tempo de cura do polímero superior a 12h, mas como vários eletrodos podem ser feitos em uma única braçadeira, em média o resultado final da produtividade pode assumir um valor como de 1,2h/eletrodo. Essa produtividade foi menor do que a taxa de fabricação com a metodologia anterior, que, segundo registros de planilhas de controle de manufatura, era em média de 0,85 horas/eletrodo, uma diferença de 30%, levando em consideração todas as etapas que antecedem a caracterização elétrica do eletrodo.

O teste de impedância elétrica satisfatório para atender às especificações de instrumentação do arranjo experimental aponta para um valor desejável menor que $3k\Omega$, depois que o segundo ciclo de pulso de oxidação seja aplicado (quando a superfície de contato já está maximizada com a formação de óxido de irídio). Em 5 casos, a impedância após o segundo ciclo de pulso foi ainda superior a $3k\Omega$ e foi indicada a necessidade de verificar excessos de silicone por cima do contato metálico e a sua remoção manual com pinça ao microscópio. Testes subsequentes, gerando mais pulsos de oxidação foram feitos nesses 5 eletrodos, dos quais, 2

persistiram com alta impedância e conduziram ao descarte de dois pares de eletrodos.

A funcionalidade satisfatória do par de eletrodos considera também que a impedância não seja inferior a $1\text{k}\Omega$. Essa limitação se dá apenas por ser indicativa de que o contato da placa de Pt-Ir pode estar desacoplada da braçadeira, duplicando a área de contato metálico do eletrodo com os fluidos fisiológicos e possibilitando a ocorrência de curto circuito entre um par de eletrodos. Nos 3 casos em que a impedância menor que $1\text{k}\Omega$ foi observada, apenas em 1 verificou-se o desacoplamento, que foi solucionado com uma nova aplicação de silicone biocompatível MED2-4420 entre o contato e a braçadeira. A repetição do teste confirmou uma impedância entre $1\text{k}\Omega$ e $3\text{k}\Omega$.

Assim, do total de 25 pares produzidos e testados eletricamente, 23 pares foram tidos como integralmente funcionais para uso cirúrgico com segurança elétrica e mecânica garantida. Esse resultado conduz a um aproveitamento de 92% em relação à propriedade de impedância elétrica. Se levado em consideração o aproveitamento condicionado do desempenho mecânico, a taxa de sucesso cai para 66,7%.

O gráfico mostrado na Figura 5.3 sumariza os resultados obtidos em relação à produtividade do eletrodo tipo *cuff* (comparada com técnica adotada anteriormente), ao desempenho mecânico e ao elétrico. Uma conclusão tirada a partir desses dados é de que o aproveitamento total da implementação da nova metodologia atinge, baseada nesses parâmetros, um valor de 78,2%.

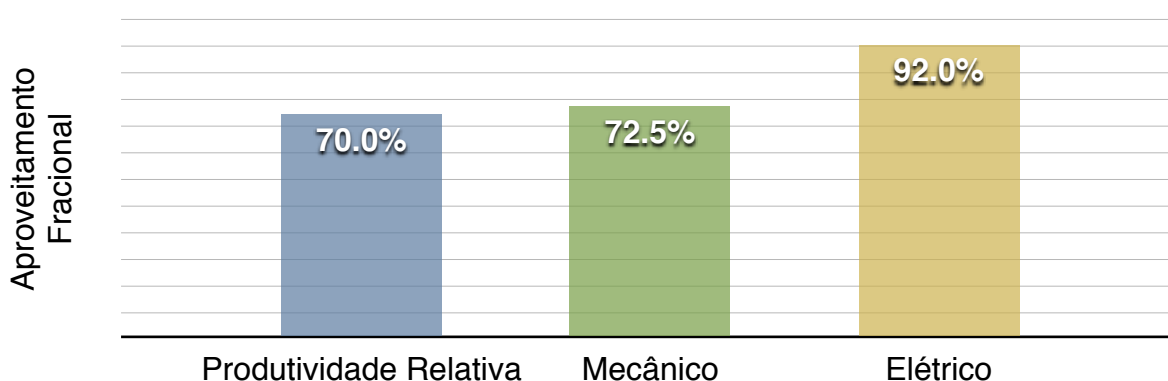


Figura 5.3 - Aproveitamento da produção de eletrodos. Gráfico de barras mostrando o aproveitamento da metodologia proposta para fabricação dos eletrodos tipo *cuff*, com base na produtividade (comparada à metodologia anterior), no desempenho mecânico e no elétrico.

5.2 RESULTADOS PRELIMINARES

5.2.1 Registro de nervo mediano e estimulação tátil da pata de rato

Um primeiro teste de experimentação foi posto em prática com um rato Long-Evans, sexo feminino, de 295g, para validar a capacidade do sistema proposto em coletar dados, isso é, testar a habilidade de registrar funcionalmente potenciais de ação compostos diante de estímulo tátil com filamento de von Frey. Tomando como referência a Figura 4.1 do procedimento experimental, podemos dizer que o experimento preliminar foi feito utilizando apenas o caminho superior daquela imagem, destacado aqui na Figura 5.4 a seguir.

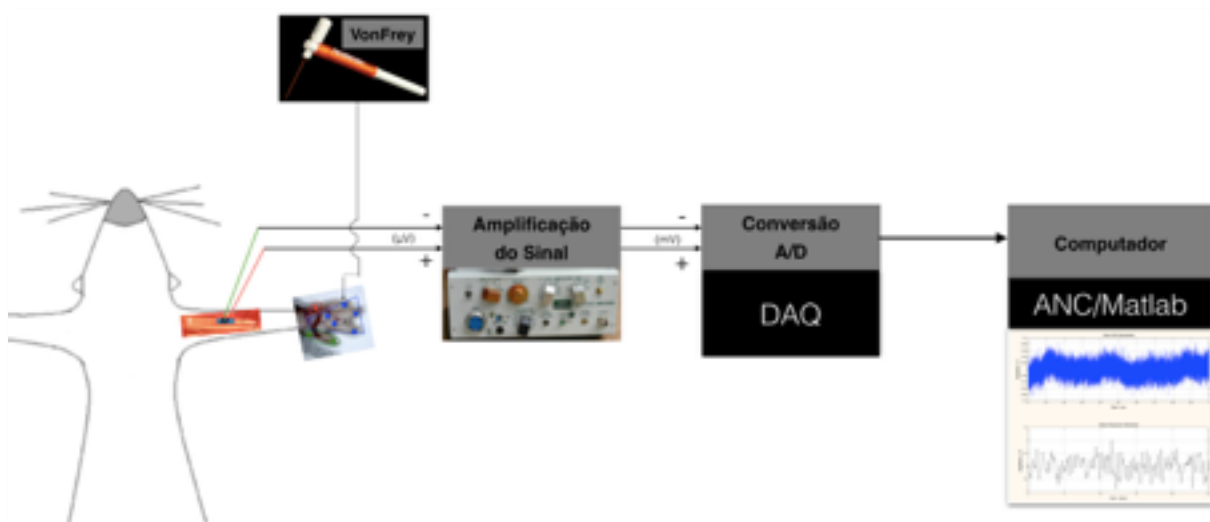


Figura 5.4 - Esquema experimental utilizado. Modelo experimental de teste para registro funcional de PAC usando a metodologia proposta.

Para tanto, o nervo mediano foi escolhido para o registro, e apenas o ponto 6 (Figura 5.5) foi estimulado mecanicamente com o filamento de von Frey de 98mN, cuja pressão nominal especificada pelo fabricante é de 669.3KPa. Um dos pares de eletrodos fabricados foi escolhido para a implantação no nervo mediano.

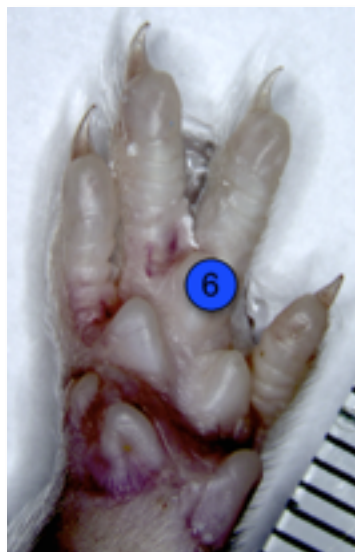


Figura 5.5 - Ponto de estimulação utilizado. Pata do rato evidenciando o ponto 6 de estimulação realizada no procedimento experimental preliminar.

Foram feitas 38 estimulações táteis com o filamento de von Frey, espaçadas temporalmente uma da outra em aproximadamente 1 minuto (tempo superior ao necessário, conforme especificado no protocolo para evitar a sensibilização de nociceptores). Isso porque, como o ensaio foi realizado utilizando apenas um filamento em um único ponto de aplicação da força, para cada estímulo efetuado um arquivo de dados foi gerado individualmente e, assim, permitindo maior tempo de descanso do campo receptor.

5.2.2 Dados obtidos

O tratamento dos dados foi feito posterior ao experimento no MATLAB 2014R e teve como base a construção de filtros passa-faixa (entre 0.3kHz e 10kHz), suavização de curvas (atenuando frequências mais altas), após o pré-tratamento já incluído no ANC para rejeição de artefato. O gráfico mostrado na Figura 5.6 mostra a coleta feita no nervo mediano diante dos 38 estímulos, em uma janela de tempo dos 25ms iniciais.

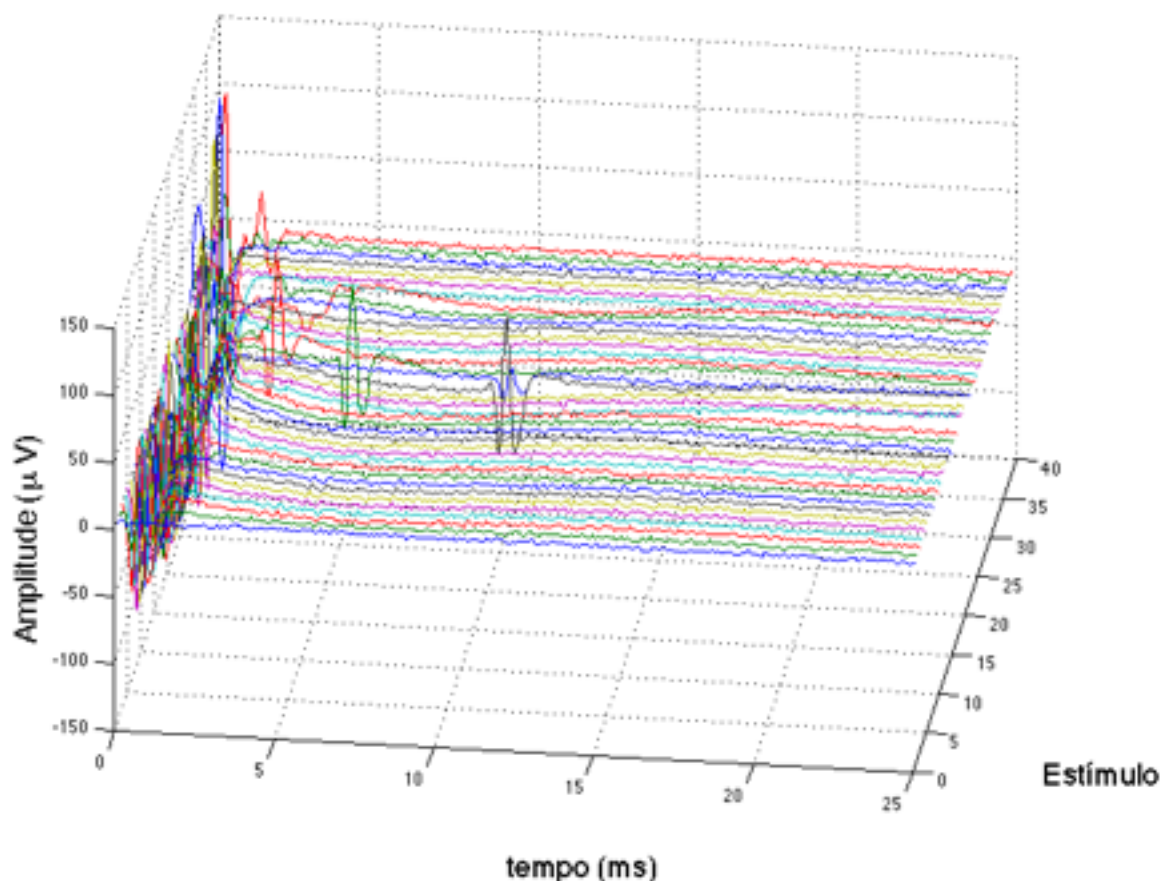


Figura 5.6 - Representação gráfica de todos os registros realizados. Sinais eletrofisiológicos feitos no nervo mediano quando estimulação mecânica foi realizada em 38 tentativas.

O passo seguinte foi a busca por curvas em que o sinal apresentasse amplitude de pelo menos 3dB em relação ao nível basal, desde que não excedesse 100µV (essa magnitude seria característica de um artefato e não de sinal desejado) ou que ocorresse muito próximo ao zero temporal, sinal intrinsecamente associado a artefato de iniciação do sistema de coleta de dados (*trigger* de inicialização do ANC). Diante desses requisitos, da amostra coletada, de 38 tentativas, 14 sinais atenderam a essa especificação e estão representados isoladamente na Figura 5.7.

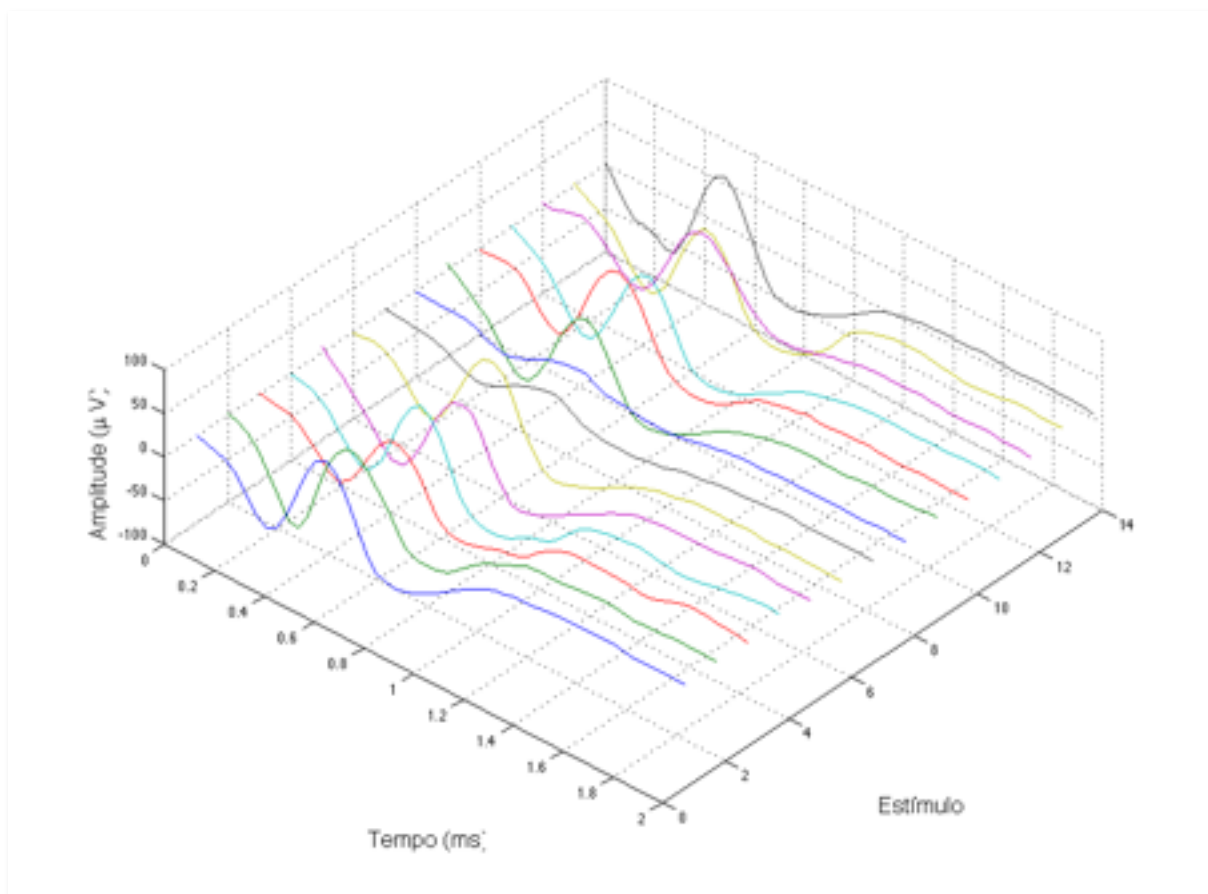


Figura 5.7 - Visão 3D das curvas de PAC obtidas. Representação das janelas (cada uma de 2ms) dos 14 potenciais de ação compostos observados dentre as 38 tentativas de evocar essa atividade via estimulação tátil.

O fato de a estimulação com o filamento de von Frey ter sido realizada de forma manual, a precisão associada ao ponto em que força é aplicada é comprometida, podendo evocar a ativação de fibras distintas a cada interação realizada. Por isso, podemos observar no gráfico da Figura 5.7 curvas com formas de onda distintas.

Uma outra maneira de visualizar a similaridade entre os PACs gerados nessas 14 coletas, é como ilustra a Figura 5.8, em que os PACs são plotados em sobreposição e uma curva da média desses 14 registros é destacada em preto com a linha mais espessa e repetida em um gráfico isolado, mostrado à direita.

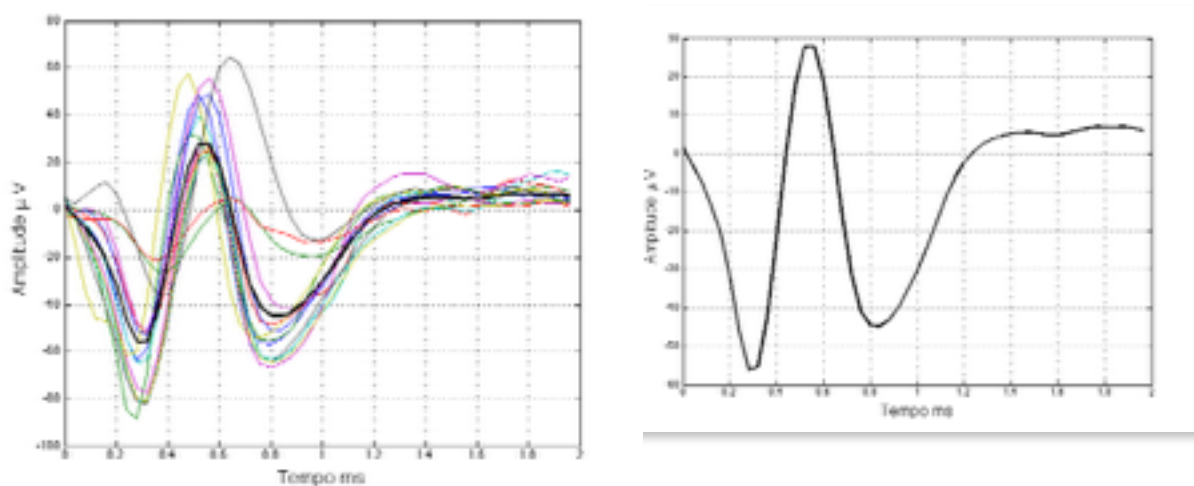


Figura 5.8 - Os PACs obtidos e a curva média calculada. À esquerda: representação gráfica das curvas de PACs sobrepostas incluindo a curva representativa da média dos 14 potenciais obtidos. À direita: em destaque a curva da média dos PACs.

Com base nos gráficos obtidos podemos apontar algumas tendências em comum aos sinais. A amplitude do sinal, em relação ao estado basal é, em média, de $36.5\mu\text{V}$ positivo ou negativo e sua duração, em torno de 1ms. A região de hiperpolarização (deflexão negativa inicial) está associada ao artefato gerado devido à própria perturbação mecânica nos eletrodos quando a pressão é feita sobre a pata do rato. A deflexão positiva subsequente é característica de quando o PAC chega ao primeiro eletrodo de registro. Tal eletrodo torna-se transientemente negativo em relação ao outro eletrodo do par de registro. A diferença de potencial entre os dois eletrodos é detectada e a forma de onda é vista como uma deflexão para cima. Com o tráfego do PAC entre o par de eletrodos, o potencial gravado retorna ao nível basal (sem diferença de potencial entre os eletrodos) e, em seguida, passa pelo segundo eletrodo, e uma deflexão de sinal oposto é registrada.

As singularidades observadas, como diferentes amplitudes, período de ocorrência do PAC e a própria forma da onda obtida são dependentes do tamanho do segmento do axônio despolarizado por PAs e da velocidade de condução desses axônios. Considerando a estimulação feita manualmente, podemos inferir que a discrepância entre as curvas é dada pelo fato de a estimulação, a cada tentativa, ter excitado mecanorreceptores diferentes, cujas vias aferentes trafegam por axônios distintos. As curvas que se apresentam com o comportamento similar, ou seja, com amplitudes próximas e forma de onda igual, muito provavelmente são derivadas de um estímulo que evocou atividade da mesma fibra.

5.3 DISCUSSÕES

O teste mecânico é importante para diminuir o risco de se trabalhar com um eletrodo que frature no momento do experimento, o que pode comprometer a coleta de sinais eletrofisiológicos. O teste feito primou por selecionar os eletrodos com as soldas tão resistentes quanto aquela de um eletrodo comercial de qualidade certificada. A desvantagem desse teste é que a tensão submetida age longitudinalmente ao longo do eixo do fio do eletrodo, mas forças críticas, no seu uso prático, ocorrem quando a força é aplicada perpendicularmente na extremidade do fio (durante a manipulação em uma implantação cirúrgica, por exemplo). Além disso, o teste é feito com a placa de Pt-Ir reta, mas em etapas subsequentes na fabricação do eletrodo, o contato é encurvado, o que expõe mais a solda, tornando-a mais susceptível à ruptura.

A proposta metodológica mostrou que é possível fazer a coleta de dados com uma porcentagem de 37%. Das 38 tentativas de estímulo mecânico tátil, houve extração de informação de potencial de ação composto em 14. Esse valor tende a aumentar com o aprimoramento de um sistema de automatização, por exemplo utilizando um microcontrolador e atuadores em uma armadura estereotáxica que teria o filamento de von Frey acoplado para garantir: 1. precisão na posição de aplicação da força nos pontos especificados da pata do rato e 2. sincronização do estímulo com o gatilho de iniciação do sistema de coleta de dados (que também, posteriormente, controla a estimulação elétrica artificial).

Com esse direcionamento futuro, melhorias da metodologia podem ser aplicadas e o trabalho tem potencial para expansão do projeto de mapeamento de padrões de PACs deflagrados nos nervos radial, ulnar e mediano, associados a diferentes e controladas intensidades de força, bem como a localização precisa da aplicação da força. Com um levantamento completo, a predição de pulsos de estímulo elétrico que devem evocar os mesmos padrões de atividade elétrica será possível tendo como base as respostas fisiológicas anteriormente mapeadas, dando maior respaldo para o refino das estimulações e suas respectivas respostas nas sensações provocadas.

6 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho foi possível abordar diversas esferas do conhecimento tangentes à Engenharia Biomédica, caracterizando-se fortemente pela integração da tecnologia com sistemas biológicos. Essa integração foi ainda associada ao estudo da neurociência, que está em plena produtividade. Existem muitas perguntas não respondidas de como o cérebro - e o sistema nervoso como um todo - computa informações e como podemos aplicar conhecimento para gerar novas ferramentas em prol da saúde. Diante do exposto, a busca por novas abordagens em pesquisa e desenvolvimento tecnológico, nessa área, foi o que motivou a realização deste trabalho.

Sendo possível decodificar padrões de atividade eletrofisiológica registrados em nervos periféricos e, com isso, modular estimulações elétricas do sistema nervoso para provocar respostas controladas no organismo, pesquisadores do CID investigam, em diversos sistemas fisiológicos, formas de fazer interfaces artificiais de controle para interagir com o cérebro e nervos periféricos.

Pensando em aplicações para próteses bidirecionais, ou seja, dando funcionalidade sensorial aos dispositivos de reabilitação motora, este trabalho teve início com a concepção de um modelo experimental para viabilizar pesquisas nesse sentido. Com a metodologia proposta, o registro eletrofisiológico de nervos periféricos, a estimulação mecânica de força controlada para interação tátil e a estimulação elétrica que busca mimetizar as respostas naturais durante um estímulo mecânico foram concebidos para estudo das vias aferentes responsáveis pela informação sensorial tátil em pata de rato Long-Evans.

A metodologia proposta exigiu embasamento teórico em instrumentação elétrica e mecânica, além de conhecimento do sistema sensorial, abrangendo peculiaridades anatômicas aplicadas para o modelo animal sugerido.

A fabricação de eletrodos é uma etapa crítica para a condução de experimentos no CID para viabilizar a adequação dos sinais coletados e os de estimulação. O protocolo de fabricação foi todo repensado para atender às especificações necessárias ao estudo dos nervos radial, ulnar e mediano, garantindo a qualidade do produto final baseado em biocompatibilidade, resistência mecânica e impedância elétrica.

A experimentação preliminar confirmou a viabilidade de se registrar os sinais do nervo mediano de rato enquanto uma estimulação tátil era deflagrada na palma de sua pata. Mais além, justificativas acerca das diferenças e similaridades encontradas nos potenciais de ação compostos registrados são sugeridas, levantando também possíveis reajustes na melhor configuração experimental para evitar erros quanto à localização precisa do estímulo tátil.

Em suma, com esse trabalho foi possível compreender relações anatômico-funcionais do sistema nervoso periférico e como as respostas sensoriais são processadas, subsidiando a concepção da metodologia proposta. A especificação dos procedimentos experimentais para registrar atividade eletrofisiológica de nervo periférico em modelo de rato, a elaboração do protocolo para uso animal, a caracterização da fabricação do eletrodo necessário à aplicação; a fabricação propriamente dos eletrodos com os respectivos testes mecânico e elétrico foram etapas realizadas para esse trabalho. Além disso, a concepção do método de estimulação tátil, a especificação da instrumentação necessária no aparato experimental foram detalhadamente descritos. A verificação da viabilidade da metodologia proposta foi ainda um dos feitos para mostrar que é possível mapear padrões de potenciais de ação compostos registrados no nervo periférico, sendo possível identificar lacunas/problemas da proposta com sugestão de abordagens futuras.

Uma vez que a investigação prossiga, e se possa confirmar uma decodificação consistente de padrões de potenciais de ação compostos nos nervos radial, mediano e ulnar, correlacionados diretamente à posição exata do estímulo e sua intensidade, o legado deste trabalho pode se expandir para diversas outras investigações que associem estimulação tátil e padrões de respostas eletrofisiológicas em nervos periféricos. Outros nervos, outras sensações e outros modelos animais podem ser usados com as devidas adequações.

REFERÊNCIAS

ALO, K. M., HOLSHEIMER, J. New trends in neuromodulation for the management of neuropathic pain. **J. of Neurosurgery**, n. 50, p. 690–703, 2002.

BADI, A. N., KERTESZ, T. R., GURGEL, R.K., SHELTON, C., NORMANN, R. A. Development of a novel eighth-nerve intraneural auditory neuroprosthesis. **The Laryngoscope**, n. 113, p. 833–842, 2003.

BENNET, G. J., XIE, Y. K. A Peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, n. 33, p. 87-107, 1988.

BESIO, W., SHARMA, V., SPAULDING, J. The effects of Concentric Ring Electrode Electrical Stimulation on Rat Skin. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 3, p. 1111-1118, 2010.

BOVE, G. Mechanical sensory threshold testing using nylon monofilaments: The pain field's Tin Standard. **J of Pain**, n. 124, p. 13-17, 2006.

BRANNER, A., STEIN, R. B., NORMANN, R. A. Selective stimulation of cat sciatic nerve using an array of varying-length micro-electrodes. **J . of Neurophysiology**, n. 85, p. 1585–1594, 2001.

CAMPBELL, M. Paralyzed limbs revived by hacking into nerves. **New Scientist**, 2010.

CHEUNG, K. C. Implantable microscale neural interfaces. **Biomed Microdevices, Springer Science**, 2007.

CHU, J., SONG, K., HAN, S., LEE, S. H., KIM, J., KANG, J. Y., HWANG, D., SUH, J., F., CHOI, K., YOUN, I. Improvement of signal-to-interference ratio and signal-to-noise ratio in nerve cuff electrode systems. **Physiol. Meas.** n. 33, p. 943–967, 2012.

CODERE, T. J., MELZACK, R. Cutaneous hyperalgesia: contributions of peripheral and central nervous system to the increase in pain sensitivity after injury. **Brain Res.** n. 404, p. 95-106, 1987.

DILORENZO, D. J., BRONZINO J. D. **Neuroengineering**. New York: CRC Press, 2008.

Distant education of University of New England. Disponível online: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/u4-l37-brachial-plexus/deck/3099772>. Acesso em 20 de maio de 2015.

DONOGHUE, J.P. Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces. **Nature Neuroscience**, n. 5, p. 1085–1088, 2002.

FLEISCHER, E., HANDWERKER, H. O., JOUKHADAR, S. Unmyelinated nociceptive units in two skin areas of the rat. **Brain Res.**, n. 267, p. 81-92, 1983.

FRUHSTORFER H., GROSS W., SELBMANN, O. Von Frey hairs: new materials for a new design. **European Journal of Pain**, n. 5, p. 341-343, 2001.

ALBERT, G. C., COOK, C. M., PRATO, F. S., THOMAS, A. W. Deep brain stimulation, vagal nerve stimulation and transcranial magnetic stimulation: An overview of stimulation parameters and neurotransmitter release. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 33, p. 1042–1060, 2009.

GASSER, H. S. The classification of nerve fibers. **The Ohio Journal of Science**, New York, p. 145-159, 1941.

GILAT, A. **MATLAB com aplicações em Engenharia**, 4. ed. São Paulo: Bookman, 2011.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed. Washington, D.C.: Nat. Acad. Press, 2011.

HANDWERKER, H. O., ANTON, F., REEH, P. W. Discharge Pattern of Afferent Cutaneous Nerve Fibers From the Rat's Tail During Prolonged Noxious Mechanical Stimulation. **Exp. Brain Res.**, n. 65, p. 493-504, 1987.

HANDWERKER, H. O., KILO, S. REEH, P. W., Unresponsive afferent nerve fibers in the sural nerve of the rat. **J. of Physiol. Lond.**, n. 435, p. 229-242, 1991.

HELLON, R. F., HENSEL, H., SCHAFEER, K. Thermal receptors in the scrotum of the rat. **J. Physiol. Lond.**, n. 248, p. 349-357, 1975.

IRAZOQUI, P. **Vagus Nerve Stimulation for Treating Drug Resistant Neuropathologies** APPROVED COEUS PROTOCOL: 1112000390A007, 2014.

KIERNAN, J. **Neuroanatomia humana de Barr.** 7. ed. São Paulo: Manole, 2002.

KIM, S. H., CHUNG, J. M. An experimental model of peripheral neuropathy induced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, n. 50, p. 355-363, 1992.

KOW, L. M., PFAFF, D. W. Responses of single units in 6th lumbar dorsal root ganglion of female rats to mechanostimulation relevant for lordosis reflex. **J. Neurophysiology**, n. 42, p. 203-213, 1983.

LAUER, R.T., PECKHAM, P.H., KILGORE, K.L., HEETDERKS, W.J. Applications of cortical signals to neuroprosthetic control: a critical review. **IEEE Trans Rehabil. Eng.**, n. 8, p. 205–208, 2000.

LAWRENCE, S.M., DHILLON, G.S., JENSEN, W., YOSHIDA, K. H. Acute peripheral nerve recording characteristics of polymer-based longitudinal intrafascicular electrodes. **IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng.**, n. 12, p.345–348, 2004.

LECHNER, S.G., LEWIN, G.R. Hairy Sensation. **Physiology**, n. 28, p.142-150, 2013.

LEEM, J. W., Willis W. D., Chung, J. M. Cutaneous receptors in the rat foot. **Journal of Neurophysiology**, v. 69, n.5, 1993.

LEVITAN, I. B., KACZMAREK, L. K. **The Neuron: cell and molecular biology**, 3.ed., New York: Oxford University Press, 2001.

LI, R., HETTINGER, P. C., MACHOL, J. A., LIU, X., STEPHENSON, J. B., PAWELA, C. P., YAN, J. G., MATLOUB, H. S., HYDE, J.S. Cortical plasticity induced by different degrees of peripheral nerve injuries: a rat functional magnetic resonance imaging study under 9.4 Tesla. **Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury**, n. 8, p. 4, 2013. doi:10.1186/1749-7221-8-4.

LYNN, B., CARPENTER, S. E., Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb. **Brain Res.**, n. 238, p. 29-43, 1982.

MANZANO, G. M., GIULIANO, L. M. P., NÓBREGA, J. A. M. A Brief Historical Note on the Classification of Nerve Fibers. **Arq Neuropsiquiatr**, n. 66, p. 117-119, 2008.

McCREERY, D. B., YUEN, T. G. H., AGNEW, W. F., BULLARA, L. A. A characterization of the effects of neuronal excitability due to prolonged microstimulation with chronically implanted microelectrodes. **IEEE Trans. Biomed. Eng.**, v. 44, n. 10, p. 931–939, 1997.

McGill Physiology Virtual Lab. **Compound Action Potential**. Disponível em <<http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/cap/recording.htm>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2015.

NAVARRO, X., KRUEGER, T. B., LAGO, N. STIEGLITZ, T. DARIO, P. A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems. **J. of Periph. Nervous System**, n. 10, p. 229-258, 2005.

NDUBAKU, U., BELLARD, M. E. Glial cells: Old cells with new twists. **Acta histochemica Elsevier** n. 110, p. 182-195, 2008.

NECKER, R. Dependence of Mechanoreceptor Activity on Skin Temperature in Sauropsids II Pigeon and Duck. **J. comp. Physiol.**, n. 92, p. 75–83, 1974.

NICOLELIS, M. A. Actions from thoughts. **Nature**, n. 409, p. 403–407, 2001.

NORDHAUSEN, C.T., MAYNARD, E. M., NORMANN, R. A. Single unit recording capabilities of a 100 microelectrode array. **Brain Res**, n. 726, p.129–140, 1996.

PROCHAZKA, A., MUSHAHWAR, V.K., MCCREERY, D.B. Neural prostheses. *J. of Physiology*, n. 533, p. 99–109, 2001.

PURVES, D. **Neuroscience**, 5.ed. Sunderland: Sinauer, 2012.

SANDERS, K. H., ZIMMERMAN, M. Mechanoreceptors in rat glabrous skin: redevelopment of function after nerve crush. **J. Neurophysiol.**, n. 44, p. 644-659, 1986.

SHIR, Y., SELTZER, Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. **Neurosci. Lett.**, n. 115, p. 62-67, 1990.

TORTORA, J. G., DERRICKSON, B., **Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**, 8. ed., São Paulo: Artmed, 2010.

Ugo Basile http://www.ugobasile.com/catalogue/product/37450_dynamic_plantar_aesthesiometer.html

WARD, M. P., QING, K. Y., OTTO, K. J., WORTH, R. M., SIMON W. M. J., IRAZOQUI, P. P. A Flexible Platform for Biofeedback-Driven Control and Personalization of Electrical Nerve Stimulation Therapy. **IEEE Transactions On**

Neural Systems And Rehabilitation Engineering, v. 23, n. 3, 2015. DOI: 10.1109/TNSRE.2014.2351271

WOODBURY, D. M., WOODBURY, J. W., Effects of vagal stimulation on experimentally induced seizures in rats. **Epilepsia**, v. 31, pp. 7–19, 1990.

YOSHIDA, K., JOVANOVIĆ, K., STEIN, R. B. Intrafascicular electrodes for stimulations and recording from mudpuppy spinal roots. **J Neurosci Methods**, n. 96, p.47–55, 2000.

ZUR, V. F. M. Physiologie der Juckempfindung. **Arch Neerl Physiol.** n. 7, p. 142-145, 1922.