

# Avaliação do efeito da referencia em estudos farmacológicos mediante EEG

Ana Fernández Márquez, Joan Francesc Alonso (Orientador)

Departamento de Engenharia de Sistemas, Automática e Informática Industrial (ESAII)  
Escola Universitaria de Engenharia Técnica Industrial de Barcelona (EUETIB)  
Universidade Politécnica de Catalunya (UPC)

ana.marquez@usp.br.com, joan.francesc.alonso@upc.edu

**Resumo** – Um dos problemas que apresenta o registro de electroencefalogramas (EEG) está relacionado com a referência usada durante a aquisição dos dados. O presente artigo analisa o comportamento de três referências, o promédio mastoides (RPM), o promédio común (RPC) e o método de estandardização do eletrodo de referência (REST), usadas no registro de EEG num estudo farmacológico realizado com alprazolam (medicamento psicoativo). Os resultados foram analisados no dominio frequencial para avaliar a ação do fármaco e através da informação mútua cruzada para investigar a conectividade cerebral. Nenhuma das referências apresenta melhores resultados em todos os casos estudados, REST tem boa atuação nas variáveis espectrais e de conectividade enquanto que as outras duas trabalham melhor só em um dos casos.

**Palavras-chave:** electroencefalograma, referência promédio mastoides, referência promédio común, referência do método de estandardização do eletrodo de referência.

## 1. Introdução

A electroencefalografia é o registro e análise dos potenciais elétricos gerados pelo cérebro mediante eletrodos colocados na superfície do couro cabeludo. O sinal elétrico registrado corresponde à soma dos potenciais postsinápticos de maior duração originados nos dendritos, e não, ao conjunto de potenciais de ação neuronais porque são breves e débeis.

O problema no registro de sinais biomédicos vem dos baixos valores de amplitude e gamas de frequência. Além disso, em sua grande parte, os sinais são contaminados por ruído que pode chegar a ter maior amplitude que os próprios. As magnitudes dos potenciais variam no tempo e também em indivíduos, mesmo entre sujeitos saudáveis, de maneira que é possível se obter valores muito distintos.

Independentemente do tipo de registro, sempre deve existir um eletrodo de referência no qual o potencial registrado é nulo. Na prática não é possível conseguir um valor igual a zero, por essa razão existem diferentes métodos para se ter uma referência aproximada.

Atualmente, as referências mais utilizadas são a referência localizada nas apófises mastoides (RPM) e a referência promédio común (RPC). A RPM assume que na região das apófises mastoides a atividade neuronal é quase nula, de modo que o sinal registrado nesse ponto corresponde ao resto das interferências existentes no órgão. Existem diversos métodos para obter o valor do sinal de referência, no entanto, a forma mais comum consiste em promediar os dois

sinais obtidos pelos eletrodos colocados em cada mastoide. O problema apresentado por essa referência é que pode ser registrado um volume maior de condução nas zonas adjacentes, podendo assim incluir dentro da linha base atividade cerebral de interesse [6]. A RPC realiza um promédio de todos os sinais registrados em relação a um eletrodo designado como referência. Mediante esse procedimento é criado um valor médio igual à zero ao eliminar a informação comum de todos os eletrodos. O fator limitante se deve ao número de eletrodos usados para fazer o registro, quanto maior o número de eletrodos melhor será o valor promédio de referência [6].

O método REST é uma técnica implementada nos últimos anos baseada na aproximação da referência dos registros a um ponto no infinito. Para determinar a referência, REST usa os potenciais medidos no couro cabeludo da atividade neuronal e das fontes geradoras equivalentes, que são independentes da referência, para reconstruir a referência no infinito sem interferir no registro original do EEG [9, 10]. A ideia matemática consiste em reduzir as interferências a partir da reconstrução, no entanto, diferentes autores tem analisado o método e criticam a imprecisão geométrica do modelo para a simulação da cabeça [7]. Essa referência ainda não foi aplicada para analisar o comportamento farmacológico, de modo que não se conhece o desempenho dela nesse tipo de exames.

O objetivo principal do estudo foi analisar o efeito da referência em tratamentos farmacológicos mediante EEG aplicando os três

métodos descritos anteriormente para determinar qual é mais adequado para revelar mudanças produzidas pelo fármaco alprazolam.

Alprazolam é amplamente prescrito para o tratamento de transtornos de ansiedade e de pânico. As concentrações plasmáticas de pico são entre 0,5 e 2 horas após a ingestão [5]. Sendo uma benzodiazepina, o alprazolam induz a uma melhoria das vias inibitórias através da sua atividade no complexo receptor de GABA, favorecendo a entrada de íons de cloreto nos neurônios.

## 2. Base de dados

Foi administrada uma dose oral única de 1 mg alprazolam a 9 voluntários (com idades entre 20 e 32 anos, média de 23 anos) em um estudo cruzado controlado por placebo, duplo-cego randomizado. Os voluntários eram saudáveis e não foram autorizados a tomar drogas psicoativas, cafeína, álcool e tabaco desde duas semanas anteriores às sessões experimentais até o final do experimento.

O estudo foi realizado em conformidade com a Declaração de Helsinki e respeitando a experimentação em seres humanos; foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital e do Ministério da Saúde Espanhol.

Foram registrados sinais de EEG, durante 3 minutos, em diversas etapas: antes da ingestão da droga, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1,5 horas, 2,5 horas e 4 horas após a administração. Foram registrados o electrooculograma vertical e horizontal e 19 canais de EEG (Fp1/2, F7/8, F3/4, Fz T3/4, C3/4, Cz, T5/6, P3/4, Pz, e O1/2, seguindo o internacional 10/20 sistema), registro referenciado mediante o promédio mastóides (A1 e A2). Foram usados eletrodos de EEG padrão banhados em ouro, mantendo impedâncias abaixo dos 5 k $\Omega$ . Os sinais foram filtrados analogicamente por um filtro passa - banda (0,1 a 45 Hz) e gravado em uma frequência de amostragem de 100 Hz.

## 3. Metodologia

Inicialmente, foi realizado um pré-processamento dos sinais. Todas as gravações de EEG foram submetidas ao método de redução de artefato ocular seguindo os procedimentos descritos por [8]. Dado que os principais efeitos do alprazolam em ritmos cerebrais se encontram nas bandas  $\alpha_1$  (7,5 - 10,5 Hz) e bandas  $\beta$  (13 a 35 Hz) [2], as gravações foram filtradas utilizando o filtro de

Chebyshev inverso de ordem 16 para obter os sinais correspondentes.

Para conseguir os registros referenciados ao promédio comum, calculou-se a média de todos os canais de EEG e foi subtraído o valor das medidas originais dos sinais. Para obter os resultados referenciados do modelo REST, foi utilizado o software *REST*, que realiza a transformação matemática e retorna o sinal referenciado adaptado ao registro do estudo (software disponível no site do autor: <http://www.neuro.uestc.edu.cn/rest> [9]).

A análise espectral foi examinada mediante o periodograma de Welch posto que permite realizar a estimação espectral de forma não paramétrica aplicando a transformada rápida de Fourier (FFT) [4]. Foi aplicada uma janela Hanning de 1000 mostras (10 s) com uma superposição aplicada de 250 mostras e 1024 pontos para o cálculo da FFT.

A análise não linear de conectividade foi feita através da função de informação mútua cruzada seguindo a metodologia explicada em [1]. A função permite obter a informação que tem em comum dois sinais e caracterizar o acoplamento linear e não linear mediante a área inferior a curva dos componentes lineares e não lineares respectivamente.

Uma vez que esses parâmetros foram calculados, os efeitos farmacológicos foram avaliados por meio de mapas topográficos da cabeça (*statistical parametric maps*), que representam diferenças significativas obtidas no estudo. Nesse projeto foram utilizados dois tipos de mapas:

- Mapas espectrais: representam a atividade farmacológica a partir da análise frequencial.
- Mapas de conectividade: representam as diferenças obtidas na análise de conectividade entre as situações de placebo e da droga como linhas que ligam as localidades do couro cabeludo.

Foi aplicado o teste não paramétrico de postos sinalizados de Wilcoxon, assinando um limiar baseado no teorema binomial [1, 3] para detectar os mapas significativos considerando comparações múltiplas.

Abaixo encontram-se os mapas topográficos:



Figura 1. Mapas topográficos para representar a atividade (eixo com os p-values)



**Figura 2.** Mapas topográficos para representar a conectividade (eixo com os p-values)

Para que o mapa de conectividade fosse considerado significativo, tinham que ser mostradas no mínimo 25 conexões.

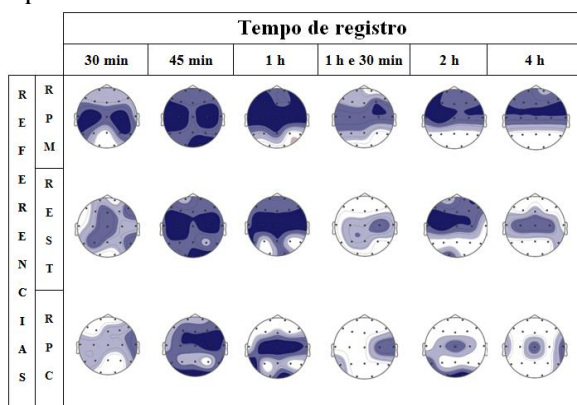
## 4. Resultados

Os resultados mostrados correspondem aos três tipos de referência considerando os seis tempos de registro (não é apresentado o basal).

### 4.1. Avaliação da potência espectral

Os mapas espectrais mostram a variação da potência para as duas bandas de frequência afetadas pelo fármaco  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ . A escala de cores fixada representa no limite superior o incremento de ondas  $\beta_1$  e no limite inferior o decremento de  $\alpha_1$ . O efeito do fármaco é melhor observado nos registros com doses alta de fármaco (1 mg). Os resultados confirmam o esperado, o fármaco começa a atuar 45 minutos após a ingestão [1, 2].

Em relação às referências, a RPM mostra mais atividade para  $\alpha_1$  que RPC e REST. No caso de  $\beta_1$  as três referências têm um comportamento similar. Nas duas bandas de frequência, a RPM evidencia a evolução progressiva do fármaco marcando o efeito até a zona frontal. O caso contrário é apresentado pela RPC, mostrando mais intensamente as mudanças na zona de origem do potencial (zona occipital). REST conserva o comportamento das duas, porém reflete menor intensidade. A figura 3 exemplifica como foi feita a análise dos mapas espectrais:



**Figura 3.** Mapas estatísticos para potencia espectral em  $\alpha_1$  para alta dose de fármaco

### 4.2. Avaliação da conectividade

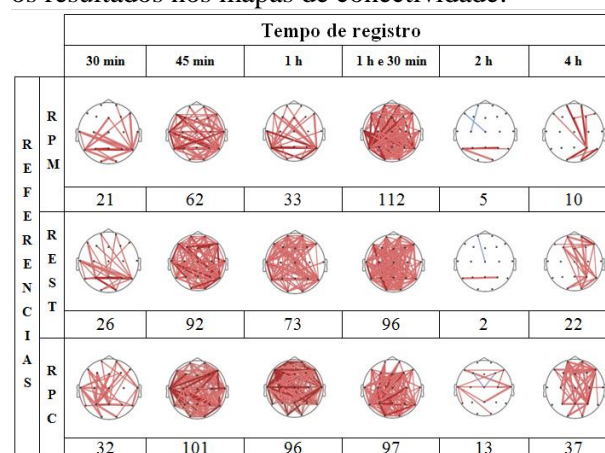
Os resultados correspondem aos efeitos provocados para a alta dose de fármaco. Ainda que não seja possível relacionar diretamente as mudanças obtidas nas potências espectrais e as variáveis derivadas da informação mútua, as diferenças estatísticas calculadas evidenciam tendências análogas entre a área linear com  $\alpha_1$  e a área não linear com  $\beta_1$ , i.e., observam-se incrementos na área não linear e decrementos na área linear.

O valor que aparece abaixo de cada cabeça representa o número de diferenças significativas.

Em relação à área linear, a referência com maior número de conexões é a REST, seguida de RPM e por último RPC, apesar de RPC conter mais linhas com maior intensidade. As zonas de maior intensidade aparecem na zona frontal para a RPM, na zona occipital para RPC e na zona central para REST.

A área não linear é melhor representada pela RPC (maior número de linhas e maior intensidade), seguida da REST e por último RPM.

A figura 4 mostra como foram comparados os resultados nos mapas de conectividade:



**Figura 4.** Mapas de conectividade para a área não linear da informação mútua cruzada

### 4.3. Estudo comparativo entre os resultados obtidos e a concentração plasmática

Calculou-se a correlação cruzada normalizada entre a curva promédio das concentrações plasmáticas do fármaco para todos os voluntários e a curva promédio de cada uma das variáveis utilizadas para caracterizar os efeitos do alprazolam. No caso das variáveis espectrais, o promédio foi calculado para os valores de toda a cabeça. No caso das variáveis de conectividade,

o promédio foi calculado unicamente para as duplas interhemisféricas já que estudos anteriores mostraram melhor correlação nessa região [1].

**Tabela 1.** Valores de correlação normalizada

	$\alpha_1$	$\beta_1$	Área lineal interhemisférica	Área no lineal interhemisférica
RPM	0,9670	0,9211	0,8596	0,8423
REST	0,9643	0,9512	0,9028	0,8627
RPC	0,9643	0,9581	0,9202	0,9279

A tabela 1 mostra que os melhores resultados para representar a banda  $\alpha_1$  são de RPM seguida da REST. O comportamento de  $\beta_1$  por sua vez é melhor representado pela RPC, seguida também de REST. Em relação as medidas de conectividade, a RPC claramente é a melhor referência.

## 5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos, provou-se a atuação do fármaco nos três tipos de referências estudados obtendo comportamentos bastante semelhantes. Não é possível afirmar, no entanto, que qualquer uma dessas referências utilizadas seja inteiramente superior às demais no escopo dos estudos de fármaco-EEG.

Em relação à RPM, uma das vantagens é a propagação dos efeitos farmacológicos observada com maior facilidade, marcando com maior intensidade os momentos nos quais o fármaco está no ponto máximo de efetividade. Uma das limitações é a diminuição da intensidade para apresentar a atividade da banda  $\alpha_1$ . Esta diminuição é possivelmente produzida pela proximidade da localização física da referência nos mastoídes na zona de geração das ondas  $\alpha_1$ . RPM é a melhor das três referências na análise espectral.

Em relação à RPC, a maior contribuição reside na localização precisa da região de origem das ondas. Os mapas topográficos de conectividade são destacáveis porque em outros estudos não se havia conseguido mostrar o efeito dessa referência.

Por último, em relação à REST, é possível afirmar que a medida consegue preservar tanto o comportamento a nível farmacológico (como a RPM) quanto à gradação do fármaco no tempo (como a RPC). É importante ressaltar que este foi o primeiro estudo farmacológico que utilizou a REST.

Finalmente, este estudo reitera que no campo das referências do EEG ainda não existe um

método que seja indiscutivelmente superior aos outros.

## Referências

- [1] Alonso JF, Mañanas MA, Romero S, Hoyer D, Riba J, Barbanoj MJ. Drug Effecton EEG connectivity assessed by linear and nonlinearcouplings. *Human Brain Mapping* 31, 2010; 487 – 497.
- [2] Barbanoj MJ, Antoni Joan R, Riba J, Valle M, Romero S, Jané F, 2006. Quantifying drug-drug interactions in pharmaco-EEG, *Clinical EEG and Neuroscience* 37: 108–120.
- [3] Cross E, Chaffin W, 1982. Use of the binomial theorem in interpreting results of multiple tests of Significance, *Educational and Psychological Measurement* 42: 25–34.
- [4] Echeverry JD, Guarnizo C, Orozco AA. Análisis de la densidad espectral de potencia en registros MER. *Universidad Tecnológica de Pereira*, 2007.
- [5] Greenblatt D, Wright C, 1993. Clinical pharmacokinetics of alprazolam. *Therapeutic implications*, *Clinical Pharmacokinetics* 24: 453–471.
- [6] Katznelson, RD. EEG recording, electrodeplacement, and aspects of generator localization.
- [7] Nunez, PL. REST: A good idea butnotthegold standard. *Clin Neurophysol*, 2010; 2177-2180.
- [8] Romero S, Mañanas MA, Barbanoj M. Estudio comparativo de técnicas automáticas para el filtrado ocular en señales EEG simuladas. Depto. ESAII, *Universidad Politécnica de Catalunya*, 2008.
- [9] Yao D. A method to standardize a reference of scalp EEG recordings to a point at infinity. *Physiol Meas* 2001; 22(4):693–711.
- [10] Zahi Y, Yao D. A study on the reference electrode standardization technique for a realistic head model. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 2004; 76, 229-238.