

CARLOS EDUARDO DE ARAUJO

IMPLANTE NEURAL CONTROLADO EM MALHA FECHADA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de “Doutor em Ciências”. Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo José Abatti

CURITIBA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A663i Araújo, Carlos Eduardo de
2015 Implante neural controlado em malha fechada / Carlos
Eduardo de Araújo.-- 2015.
109 f.: il.; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês.
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal
do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Elétrica e Informática Industrial, Curitiba, 2015.
Bibliografia: f. 84-91.

1. Neuropróteses. 2. Dopamina. 3. Estimulação neural.
4. Interface cérebro-computador. 5. Controle automático.
6. Software - Desenvolvimento. 7. Simulação (Computadores).
8. Engenharia biomédica. 9. Engenharia elétrica -
Teses. I. Abatti, Paulo José, orient. II. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. III.
Título.

CDD: Ed. 22 -- 621.3

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial

Título da Tese Nº. _____

Implante Neural Controlado em Malha Fechada

por

Carlos Eduardo de Araujo

Orientador: Prof. Dr. Paulo José Abatti

Esta tese foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: **Engenharia Biomédica**, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às **10:30h** do dia **15 de Dezembro de 2015**. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos doutores:

Prof. Dr. Paulo José Abatti
(Presidente – UTFPR)

Prof. Dr. Claudio da Cunha
(UFPR)

Profa. Dra. Patrícia Andréia Dombrowski
(UFPR)

Prof. Dr. Pedro Miguel Gewehr
(UTFPR)

Prof. Dr. Cícero Martelli
(UTFPR)

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Emilio Carlos Gomes Wille
(Coordenador do CPGEI)

Às energias que guiam nossos passos para o bem...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a conclusão desta tese ao professor orientador Dr. Paulo José Abatti.

Agradeço também ao Professor Dr. Cláudio da Cunha pelo espaço cedido em seu laboratório, Dra. Patrícia Dombrowski pelas cirurgias e Dr. Alexander Gomez por ajudar nos experimentos.

Agradeço especialmente ao colega Engenheiro André Oliveira da National Instruments pela colaboração no desenvolvimento de *softwares*.

Agradeço aos colegas do Instituto Federal do Paraná pela compreensão durante a elaboração deste trabalho: Alexandre, Felizari, Nishimura e Wilerson.

Em especial aos meus filhos Maria Eduarda e João Pedro pela paciência enquanto o papai “trabalhava no computador”.

E agradeço mais especialmente a minha esposa Bernadete Negrelli pelo incondicional e sempre presente incentivo para finalização deste trabalho.

Os sábios são em número tão escasso que nem vale a pena falar deles, e eu desejaria saber mesmo se é possível descobrir algum.
(ROTerdã, Erasmo, 1509).

RESUMO

ARAÚJO, Carlos Eduardo de. Implante Neural Controlado em Malha Fechada. 2015. 109 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná). Curitiba, 2015.

Um dos desafios propostos por pesquisadores em neurociência aos engenheiros biomédicos é a interação cérebro-máquina. O sistema nervoso comunica-se interpretando sinais eletroquímicos, e circuitos implantáveis podem tomar decisões de modo a interagir com o meio biológico. Sabe-se também que a doença de Parkinson está relacionada a um déficit do neurotransmissor dopamina. Para controlar a concentração de dopamina diferentes técnicas tem sido empregadas como estimuladores elétricos, magnéticos e drogas. Neste trabalho obteve-se o controle da concentração do neurotransmissor de maneira automática uma vez que atualmente isto não é realizado. Para tanto, projetou-se e desenvolveu-se quatro sistemas: a estimulação cerebral profunda ou *deep brain stimulation* (DBS), a estimulação transmagnética ou *transmagnetic stimulation* (TMS), um controle de bomba de infusão ou *infusion pump control* (IPC) para a entrega de drogas e um sistema de voltametria cíclica de varredura rápida ou *fast scan cyclic voltammetry* (FSCV) (circuito que detecta variações de concentração de neurotransmissores como a dopamina - DA). Também foi necessário o desenvolvimento de softwares para a visualização de dados e análises em sincronia com acontecimentos ou experimentos correntes, facilitando a utilização destes dispositivos quando emprega-se bombas de infusão e a sua flexibilidade é tal que a DBS ou a TMS podem ser utilizadas de maneira manual ou automática além de outras técnicas de estimulação como luzes, sons, etc. O sistema desenvolvido permite controlar de forma automática a concentração da DA. A resolução do sistema é de 0.4 $\mu\text{mol/L}$ podendo-se ajustar o tempo para correção da concentração entre 1 e 90 segundos. O sistema permite controlar concentrações entre 1 e 10 $\mu\text{mol/L}$, com um erro de cerca de $\pm 0,8 \mu\text{mol/L}$. Embora desenhado para o controle da concentração de dopamina o sistema pode ser utilizado para controlar outros neurotransmissores. Propõe-se continuar o desenvolvimento em malha fechada empregando FSCV e DBS (ou TMS, ou infusão), utilizando modelos animais parkinsonianos.

Palavras Chave: Implante Eletromagnético, DBS, TMS, FSCV, Neurônios Dopaminérgicos.

ABSTRACT

ARAUJO, Carlos Eduardo de. Closed Loop Controlled Neural Implant. 2015. 109 f. Thesis. (Graduate Program in Electrical and Computer Engineering of Federal University of Technology - Paraná). Curitiba, 2015.

One of the challenges to biomedical engineers proposed by researchers in neuroscience is brain machine interaction. The nervous system communicates by interpreting electrochemical signals, and implantable circuits make decisions in order to interact with the biological environment. It is well known that Parkinson's disease is related to a deficit of dopamine (DA). Different methods has been employed to control dopamine concentration like magnetic or electrical stimulators or drugs. In this work was automatically controlled the neurotransmitter concentration since this is not currently employed. To do that, four systems were designed and developed: deep brain stimulation (DBS), transmagnetic stimulation (TMS), Infusion Pump Control (IPC) for drug delivery, and fast scan cyclic voltammetry (FSCV) (sensing circuits which detect varying concentrations of neurotransmitters like dopamine caused by these stimulations). Some softwares also were developed for data display and analysis in synchronously with current events in the experiments. This allowed the use of infusion pumps and their flexibility is such that DBS or TMS can be used in single mode and other stimulation techniques and combinations like lights, sounds, etc. The developed system allows to control automatically the concentration of DA. The resolution of the system is around $0.4 \mu\text{mol/L}$ with time correction of concentration adjustable between 1 and 90 seconds. The system allows controlling DA concentrations between 1 and $10 \mu\text{mol/L}$, with an error about $\pm 0.8 \mu\text{mol/L}$. Although designed to control DA concentration, the system can be used to control, the concentration of other substances. It is proposed to continue the closed loop development with FSCV and DBS (or TMS, or infusion) using parkinsonian animals models.

Keywords: Electromagnetic Implant, DBS, TMS, FSCV, Dopaminergic neurons.

LISTA DE FIGURAS

1	Transmissão sináptica.....	22
2	Sistemas neuronais de trato longo, circuito local e divergente de fonte única.....	24
3	Vias dopaminérgicas e colinérgicas.....	26
4	Núcleos basais.....	28
5	O circuito gânglio-basal-talamocortical sob condições normais e em doença de Parkinson. As conexões inibitórias são mostradas em cinza e preto. As excitatórias em rosa e vermelho. GPe = Segmento externo do globo palido; GPi = Segmento interno do globo palido; SNc = Substância Negra Compacta; STN = Núcleo subtalâmico.....	29
6	Implante para DBS acionado por estimulador alojado no peito.....	33
7	Protótipo de um equipamento DBS com eletrodos utilizados para detectar crises de epilepsia buscando um controle em malha fechada. A direita o microcontrolador e seus periféricos e a esquerda o sistema protegido pela carcaça de titânio do dispositivo....	34
8	Bobina sujeita a campo magnético.....	36
9	Anel condutor e induções magnéticas.....	38
10	Acoplamento indutivo.....	41
11	Circuito básico de um estimulador neural aplicado em ser humano ou Transcranial Magnetic Stimulator.....	43
12	Modelo para avaliação das densidades de correntes circulantes em tecido nervoso provocado por disparos de TMS em função das distâncias.....	28
13	A - múltiplas variações de potencial – aproximadamente em 10 Hz. B - A rampa ou pirâmide de potencial, a variação de REDOX somada a corrente background e por último a corrente REDOX após subtração de corrente de background. C - um voltamograma (em cima) e o gráfico tridimensional de vários voltamogramas.....	44
14	Microeletrodo comercial da Invilog Research Ltda.....	49
15	Camada de capacitância de Helmholtz num eletrodo onde IHP representa o plano de Helmholtz interior e OHP o plano exterior.....	50
16	Variação de potencial ao longo da dupla camada elétrica. xH - referencial dentro da camada compacta (Helmholtz). x - referencial na camada difusa a partir de OTH.....	51
17	Arco estereotáxico para uso em humanos.....	52
18	Cortes radiográficos por tomografia para confirmação de coordenadas estereotáxicas.....	53
19	Concepção final do sistema proposto para estimulação - DBS, TMS e por infusão de GDNF com realimentação FSCV.....	55
20	Diagrama em blocos do circuito FSCV.....	57
21	Diagrama esquemático do circuito analógico.....	58

22	Foto do circuito analógico montado sobre o sistema microcontrolado e conectado ao comunicador Bluetooth.....	59
23	Circuito parcial do estimulador tipo DBS e Eletrodo de par trançado implantável da Plastics One.....	60
24	Estimulador TMS aplicando pulsos em rato em caixa de esQUIVA com a realização de FSCV simultaneamente.....	61
25	Circuito eletrônico de TMS para controle de carga de capacitores e descarga em bobinas estimuladoras.....	61
26	Estimulador de bancada AMPI e sistema de aquisição de dados eDAQ.....	62
27	Foto de um animal durante cirurgia estereotáxica para implante de eletrodos de referencia, auxiliar, de registro e estimulador.....	63
28	Localização de furação do crânio para colocação dos implantes de eletrodos nas estruturas cerebrais alvo.....	64
29	Gaiola de Faraday construída para realização dos procedimentos estereotáxicos e de medições de concentração de neurotransmissores in vitro e in vivo – no detalhe a conexão de cabo de aterramento que segue à área externa para ligação às hastes tipo cooperweld.....	64
30	Diagrama esquemático do sistema para controle em malha fechada controlando bombas de infusão. “Volt Ref.” é a tensão de referência, MCU – Microcontroller Unit, DAC – Digital to Analog Converter, ADC - Analog to Digital Converter, FCM – Micro Fiber Carbon, UART Universal asynchronous receiver/transmitter.....	66
31	MCU 3 e MCU 4 com reguladores de tensão e <i>drivers</i> de potência para acionamento das bombas de infusão.....	67
32	Equipamentos no laboratório de farmacologia da UFPR.....	68
33	Software de aquisição: no alto da esquerda para direita: Voltamograma de corrente de <i>Background</i> em função da tensão aplicada, Corrente de oxidação (na tensão de 700mV) para solução salina começando em 20 µmol/L (linha de base), subindo para 40 µmol/L de dopamina (primeiro pico) caindo a zero na sequência, e gráfico de correntes em função do tempo durante as voltametrias cíclicas. Em baixo: Gráfico 3D colorimétrico total e por último Gráfico 3D colorimétrico final.....	69
34	Controle manual ou automático (A), ajuste de tempo de resposta do processo (B), controle dos bytes de saída para a velocidade das bombas (C), gráfico de concentração (D), comparador que recebe os valores de dados crus já subtraídos do <i>background</i> (E)....	70
35	Em cima da esquerda para a direita: voltamograma da corrente de <i>background</i> , voltamograma em análise corrente e voltamograma final. Em baixo: Gráficos tridimensionais total e final.....	71

36	Voltamogramas típicos de dopamina na concentração de 10 μmol . Na vertical a corrente medida em nA. Na horizontal a tensão aplicada ao eletrodo em Volts.....	73
37	Corrente medida na tensão de oxidação de 700 mV para concentrações de 1 $\mu\text{mol/L}$ e 5 $\mu\text{mol/L}$	73
38	Voltametria tridimensional com a tensão em volts nas ordenadas e o número das varreduras nas abcissas. As correntes são representadas por cores e estão em nA. Neste experimento o sistema esta controlando automaticamente a concentração de dopamina entre o tempo 200 e 800 aproximadamente.....	74
39	Voltametria tridimensional com a tensão em volts nas ordenadas e o número das varreduras nas abcissas. As correntes são representadas por cores e estão em nA.....	74
40	A interface gráfica do usuário (GUI), onde em A: o usuário seleciona o manual (manu) ou controle de malha fechada (auto) usando o botão MODE, e em B o usuário seleciona a corrente de oxidação usando um controle deslizante. Também em B a (linha branca), selecionados e medidos (linha vermelha), as concentrações valores são exibidos. Observar que logo acima da região 'A' há uma "sequência de caracteres para escrever", que o pesquisador pode usar para ligar estimuladores como um DBS ou uma TMS.....	75
41	Sequência de uma filmagem mostrando o controle automático da concentração de dopamina em torno do valor selecionado (aproximadamente 7 $\mu\text{mol/L}$) Este e outro experimento em https://www.youtube.com/watch?v=e9qt4eOcZmU https://www.youtube.com/watch?v=tVUgP1jjZiw	76
42	Corrente medida no estriado durante DBS realizadas pelo protótipo (frequência de estimulação de 10 Hz). Escala de corrente em nA.....	77
43	Voltametria no NAc resultante da estimulação do núcleo subtalâmico com o protótipo DBS.....	77
44	Voltametria cíclica durante estimulação magnética transcranial.....	78
45	Concepção do sistema sem fio de estimulação cerebral profunda - WDBS e de voltametria cíclica de varredura rápida sem fio - WFSCV. Em A: Controle em malha fechada externo via PC. Em B: controle realizado no próprio microcontrolador.....	83

LISTA DE TABELAS

1	Neurotransmissores atuantes em sistemas neuronais divergentes de fonte única e suas funções	26
2	Trabalhos propondo malha fechada.....	32
3	Fluxo das bombas de Infusão.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	<i>Analog to digital converter</i> (Conversor analógico para digital)
AO	<i>Operational Amplifier</i> (Amplificador operacional)
BCI	<i>Brain Computer Interface</i> (Interface cérebro máquina)
Cdl	Capacitância de Dupla Camada
CFM	Microeletrodo de fibra de carbono
CEUA	Comitê de experimentação em uso animal
CFI	Célula de fluxo contínuo
DAC	Conversor digital para analógico
DA	Dopamina
DBS	<i>Deep brain stimulation</i> (Estimulação cerebral profunda)
DC	<i>Direct current</i> (Corrente contínua)
DP	Doença de Parkinson
FEM	Força eletro-motriz
FSCV	<i>Fast scan cyclic voltammetry</i> (Voltametria cíclica de varredura rápida)
FMM	Força magneto-motriz
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> (Fator neurotrófico de células gliais)
GPe	Segmento externo do globo pálido;
GPI	Segmento interno do globo pálido;
HITL	<i>Human in the loop</i> (Homem no controle)
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IHP	Plano de Helmholtz interior
INA	<i>Instrumentation amplifier</i> (Amplificador de Instrumentação)
LED	<i>Light emission diode</i> (Diodo Emissor de Luz)
NST	Núcleo subtalâmico
MCU	<i>Microcontroller unit</i> (Microcontrolador)
MEMS	<i>Micro electro mechanical sensor</i> (Micro sensor eletromecânico)
OHP	Plano de Helmholtz exterior
PC	Computador pessoal
Rm	Relutância magnética
REDOX	Redução e oxidação
SMD	<i>Surface montage device</i> (Dispositivo de montagem de superfície)

SNC	Sistema nervoso central
SNC _c	Substância negra compacta
SNP	Sistema nervoso periférico
STN	Núcleo subtalâmico
TMS	<i>Transmagnetic stimulators</i> (Estimuladores magnéticos transcranianos)
UART	Universal asynchronous receiver/transmitter.
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VIM	Núcleo intermediário ventral do tálamo
WINCS	<i>Wireless interface instantaneous neurotransmitter concentration</i> (Interface instantânea sem fio de concentração de neurotransmissor)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ESTIMULADORES NEURONAIS INVASIVOS E NÃO INVASIVOS.....	17
1.2 MEDIÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES.....	18
1.3 OBJETIVO DESTE TRABALHO.....	19
1.4 ORGANIZAÇÃO DO TEXTO.....	19
2 SISTEMA NERVOSO	21
2.1 NEUROTRANSMISSORES.....	21
2.2 TRANSMISSÃO SINÁPTICA.....	21
2.3 DIVISÃO DO SISTEMA NERVOSO.....	22
2.4 ORGANIZAÇÃO CELULAR DO SISTEMA NERVOSO.....	22
2.4.1 Organização Neuronal de Trato Longo.....	24
2.4.2 Organização Neuronal de Circuito Local.....	24
2.4.3 Organização Neuronal Divergente de Fonte Única.....	25
2.5 DOENÇA DE PARKINSON.....	26
2.6 CONCLUSÕES.....	29
3 ESTADO DA ARTE	31
3.1 CONTROLE EM MALHA FECHADA.....	31
3.2 ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA.....	32
3.3 ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA DE TECIDO NERVOSO.....	34
3.4 VOLTAMETRIA CÍCLICA EM NEUROCIÊNCIAS.....	34
3.5 ELETRODOS.....	48
3.6 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	51
3.7 CONCLUSÕES.....	53
4 DESENVOLVIMENTO	55
4.1 DESCRIÇÃO GERAL DO CIRCUITO FSCV.....	55
4.2 DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DO CIRCUITO FSCV.....	56
4.3 CIRCUITO ESTIMULADOR IMPLANTÁVEL – CIRCUITO DBS.....	59
4.4 DISPOSITIVO PARA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA TRANSCRANIANA...	60
4.5 CIRURGIA PARA IMPLANTE DE ELETRODOS PARA FSCV E DBS.....	62
4.6 BOMBAS DE INFUSÃO.....	65

4.7 SOFTWARE DE AQUISIÇÃO.....	68
4.8 SOFTWARE DE LEITURA.....	70
4.9 CONCLUSÃO.....	71
5 RESULTADOS.....	72
5.1 RESULTADOS DE MEDIÇÃO DE DOPAMINA IN VITRO POR FSCV.....	72
5.2 CONTROLE DE BOMBAS DE INFUSÃO EM MALHA FECHADA.....	75
5.3 RESULTADOS DE ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA.....	76
5.4 RESULTADOS DE ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA TRANSCRANIANA.....	78
5.5 CONCLUSÕES.....	79
6 CONCLUSÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO ATUAL E PROPOSTA DE CONTINUIDADE.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICE A.....	92
APÊNDICE B.....	97
APÊNDICE C.....	99
APÊNDICE D.....	101
APÊNDICE E.....	106
APÊNDICE F.....	107

Capítulo 1

Introdução

1.1 ESTIMULADORES NEURONAIS INVASIVOS E NÃO INVASIVOS

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo afetando quase 0,5% da população acima de 60 anos (WIRDEFELDT et al., 2011). É caracterizada por déficits cognitivos e motores, incluindo acinesia que é a dificuldade para iniciar movimentos. Estas dificuldades aparecem após a degeneração de mais de 70% dos neurônios da Substância Negra Compacta (SNc) que liberam o neurotransmissor dopamina (DA) no corpo do estriado (SCHAPIRA; JENNER, 2011). Não existe tratamento para curar a DP, mas os sintomas motores melhoram quando utilizado medicamento com substâncias precursoras de DA incluindo uso de injeção de *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) visando a regeneração celular de neurônios dopaminérgicos afetados na DP (GRONDIN; GASH, 1998) e também com estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico (KALIA; SANKAR; LOZANO, 2013; RASCOL et al., 2011; VOLKMANN et al., 2013).

Atualmente os dispositivos de estimulação cerebral profunda ou *deep brain stimulation* (DBS) são utilizados principalmente para regular os problemas de movimento associados à DP, tendo sua introdução clínica sido realizada por Benabid (BENABID et al., 1987). Outras aplicações incluem o tratamento de distúrbios motivacionais, depressão severa, transtornos obsessivo compulsivo e problemas relacionados a convulsões e epilepsia (FRIEHS et al., 2005).

Dispositivos DBS promovem disparos de potencial de ação em neurônios sendo que, no tratamento de DP, é preferencialmente aplicado no núcleo subtalâmico (STN). O STN forma uma retroalimentação com o globo pálido externo (GPe), e este último recebe entrada a partir do corpo estriado, o qual, por sua vez, é modulado pela SNc, local onde se localizam as células produtoras de dopamina (PLENZ; KITAL, 1999).

Ainda que largamente utilizada, não estão claros os mecanismos biológicos que são afetados pela estimulação dos núcleos basais, de qualquer forma o certo é que ela diminui os efeitos da DP (LOZANO et al., 2002). Assim, apesar de muito invasivos, quando não restam alternativas, os pacientes com DP acabam se submetendo a cirurgia para obter melhoria na qualidade de vida.

Já os estimuladores magnéticos transcranianos ou *transmagnetic stimulators* (TMS) foram propostos por Barker e Freeston em 1985, que desenvolveram um estimulador magnético para tecidos nervosos, capaz de gerar pulsos magnéticos suficientemente adequados para a obtenção de potenciais elétricos em tecidos nervosos e motores (MALMIVUO; PLONSEY, 1995).

Ambas as técnicas uma invasiva e outra não acabam por gerar efeitos colaterais na audição, visão, deglutição e na fala por manterem-se ativos de maneira contínua, ou seja, estão sempre estimulando seus alvos mesmo nos momentos em que as crises não estão presentes nos pacientes.

1.2 MEDIÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES

Para se conhecer a concentração de determinado neurotransmissor algumas técnicas estão disponíveis entre elas a microdiálise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) que tem um tempo de análise e resposta entre 5 e 15 minutos e a voltametria cíclica de varredura rápida - *Fast Scan Cyclic Voltammetry* (FSCV), que proporciona a análise em poucos segundos. Assim, quando se buscam leituras mais rápidas e utilizando um método menos invasivo, a FSCV mostra-se como uma melhor alternativa. De maneira geral a FSCV consiste na aplicação de um potencial em um eletrodo que por meio de oxirredução terá uma corrente resultante proporcional à concentração do neurotransmissor onde o eletrodo está inserido (WANG, 2000).

1.3 OBJETIVO DESTE TRABALHO:

O objetivo deste trabalho é apresentar um sistema que controla automaticamente a concentração de determinado neurotransmissor. Para tanto, realiza-se a medição da concentração do neurotransmissor empregando FSCV. O sistema, dotado de capacidade de análise de dados, é automatizado, possibilitando a aplicação de fármacos, a estimulação profunda do cérebro ou a estimulação magnética transcraniana. O intuito final é colaborar nas pesquisas neurológicas para controle de doenças psíquicas e motoras relacionadas a alteração das concentrações de neurotransmissores.

1.4 ORGANIZAÇÃO DO TEXTO

O texto apresentado está dividido em 6 capítulos, sendo que o primeiro caracteriza a problemática relacionada aos estimuladores cerebrais invasivos e não invasivos.

No segundo capítulo os fenômenos biológicos envolvidos e uma breve revisão dos neurotransmissores do sistema nervoso são explanados. Assim descreve-se, algumas doenças e patologias que podem ser combatidas com estimulação profunda do cérebro.

Uma apresentação generalizada sobre o estado da arte em estimulação profunda do cérebro, técnicas eletroquímicas, bioeletromagnetismo, eletrodos e cirurgias estereotáxicas formam o capítulo três deste trabalho.

A utilização da FSCV em conjunto com sistemas atuadores visando o controle em malha fechada formam o cerne deste trabalho. As técnicas de engenharia elétrica e engenharia biomédica aplicadas neste desenvolvimento para obtenção dos circuitos de estimulação, controle e eletroquímica são apresentadas no capítulo quatro. Neste mesmo capítulo são descritos também os procedimentos cirúrgicos para implantar os eletrodos em animais vivos.

Ainda no capítulo quatro a técnica construtiva de dispositivo de TMS é discorrida bem como os experimentos aplicando TMS em ratos de laboratório.

No capítulo 5 descreve-se os resultados obtidos com as aplicações dos equipamentos de DBS, TMS, Infusão de substâncias e FSCV.

Finalmente as conclusões deste trabalho e propostas para sua continuidade são tratadas no capítulo seis. Nele são apresentadas as dificuldades encontradas e uma breve comparação entre TMS e DBS além do controle de bombas de infusão para consecução de um implante neural controlado em malha fechada.

Capítulo 2

2 SISTEMA NERVOSO

2.1 NEUROTRANSMISSORES

Os neurônios comunicam-se através da liberação de pequenas moléculas, ou peptídios, chamados de neurotransmissores podendo ser liberados na circulação para atuar em órgãos distantes, ou difundir-se nas sinapses. A transmissão sináptica integra sinais elétricos (variações de tensão na membrana da célula pré-sináptica) com sinais químicos (liberação de neurotransmissor pela célula pré-sináptica e subsequente ligação do transmissor com receptores existentes na célula pós-sináptica). Por esse motivo, a transmissão sináptica é denominada transmissão eletroquímica (GOLAN, 2009).

2.2 TRANSMISSÃO SINÁPTICA

A transmissão sináptica divide-se em uma série de etapas que integram a despolarização elétrica do neurônio pré-sináptico e a sinalização química entre as células pré-sinápticas e pós-sinápticas. A descrição a seguir se refere a figura 1 (GOLAN, 2009).

1. O neurônio sintetiza a partir de um precursor um neurotransmissor armazenando-o em vesículas.
2. Um potencial de ação propagado pelo neurônio despolariza a terminação pré-sináptica.
3. Ocorre a despolarização da membrana que ativa os canais de Ca^{2+} dependentes de tensão, permitindo a entrada de Ca^{2+} na terminação pré-sináptica.
4. O aumento do Ca^{2+} citosólico predispõe a fusão da vesícula com a membrana plasmática do neurônio com a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica.

5. O neurotransmissor atravessa a fenda e liga-se a um de dois tipos de receptores pós-sinápticos (5a na figura 1). A ligação do neurotransmissor a receptores ionotrópicos provoca a abertura dos canais e mudanças na permeabilidade da membrana pós-sináptica a íons. Isso também pode resultar em mudança no potencial de membrana pós-sináptica (5b na figura 1). A ligação do neurotransmissor a receptores metabotrópicos na célula pós-sináptica ativa sinalizações intracelulares.
6. O término do sinal é efetuado com a remoção do neurotransmissor da fenda sináptica (6a na figura 1). O transmissor pode ser degradado por enzimas (E) na fenda ou o neurotransmissor pode ser reciclado na célula pré-sináptica (6b da figura 1).
7. O término do sinal também pode ser efetuado por enzimas (como a fosfodiesterase deste exemplo), que degradam as moléculas de sinalização intracelulares pós-sinápticas.

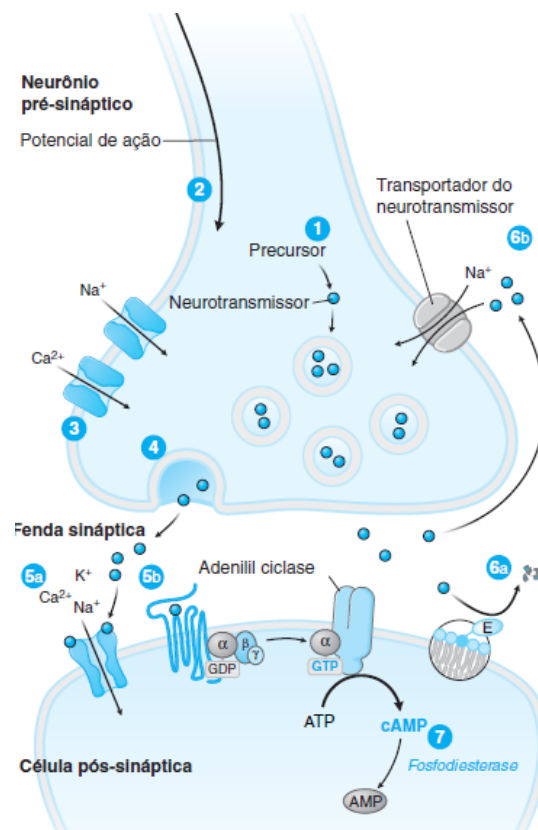


Figura 1 - Transmissão sináptica.

Fonte: Adaptado de Golan (2009).

2.3 DIVISÃO DO SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso pode ser dividido estrutural e funcionalmente, em periférico e central. O sistema nervoso periférico inclui todos os nervos entre o sistema nervoso central (SNC) e as regiões somáticas e viscerais. O sistema nervoso autônomo (involuntário) e o sistema nervoso sensitivo e somático (voluntário) formam o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é composto de cérebro, diencefalo, cerebelo, tronco encefálico e medula espinal. O SNC transmite e processa sinais recebidos do SNP e, este processamento, resulta em respostas retransmitidas à periferia. O SNC é responsável pela linguagem, consciência e estado de vigília além do processamento sensitivo, auditivo e visual (GOLAN, 2009, GUYTON; HALL, 2006).

2.4 ORGANIZAÇÃO CELULAR DO SISTEMA NERVOSO

A organização celular do sistema nervoso central é complexa sendo que, em geral, as informações são transmitidas de uma área para outra. Na maioria das vezes os neurônios centrais recebem e distribuem informações de numerosas fontes e alvos. Centenas de milhares de neurônios podem realizar sinapses a partir de um único neurônio. Algumas destas conexões são excitatórias e outras inibitórias, o que leva a uma ponderação dos valores de cada informação – as chamadas redes neurais. Existem neurônios que se projetam em um neurônio-alvo modulando a excitabilidade relativa da célula, alterando a resposta do neurônio pós-sináptico a outros sinais. Essa grande e complexa variabilidade resulta nos processos realizados pelo cérebro. Apesar desta complexidade e variabilidade de conexões, são utilizados apenas três modelos para explicar os neurônios como unidades funcionais: os sistemas neuronais de trato longo, os circuitos locais e os sistemas divergentes de fonte única (figura 2). O SNP é organizado exclusivamente como sistema de tratos longos, enquanto o SNC utiliza os três modelos: trato longo, local e divergente (GUYTON; HALL, 2006; GOLAN, 2009).

2.4.1 Organização Neuronal de Trato Longo

A organização neuronal de trato longo é aquela onde vias neurais conectam áreas distantes do sistema nervoso (figura 2-A). É a organização utilizada pelo sistema nervoso periférico, responsável pela transmissão de sinais entre regiões. No sistema nervoso periférico, os sinais são transmitidos com pouca modificação. Os neurônios sensitivos respondem a estímulos e, se a despolarização da membrana inicial ultrapassar o limiar, é enviado um potencial de ação para a medula espinal. Os neurônios sensitivos da medula espinal fazem sinapses com neurônios motores somáticos, formando arcos reflexos, e com neurônios espinais ascendentes para transmitirem a informação aos níveis superiores. Os neurônios motores transportam a informação da medula espinal por meio das raízes ventrais e projetam-se diretamente nas placas motoras terminais dos músculos. Os tratos axônicos longos dos neurônios sensitivos e motores periféricos são reunidos em feixes formando nervos periféricos (GOLAN, 2009).

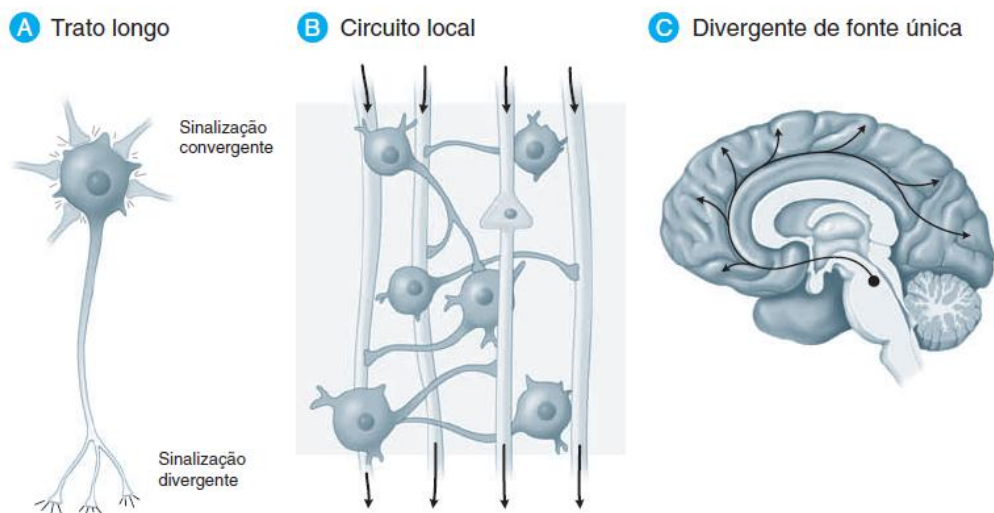


Figura 2 - Sistemas neuronais de trato longo (A), circuito local (B) e divergente de fonte única (C).

Fonte: Adaptado de Golan (2009).

2.4.2 Organização Neuronal de Circuito Local

Os neurônios de circuito local estão conectados principalmente na área proximal. Em geral, esses neurônios são responsáveis pela modulação da transmissão de sinais (figura 2-B). Neurônios do córtex cerebral estão

organizados em camadas com a ligação entre as mesmas formando circuitos locais. Tais ligações processam e interpretam de maneira localizada as informações. As conexões sinápticas locais podem ser excitatórias e também inibitórias, gerenciando a transmissão de determinados padrões excitatórios e/ou inibitórios (GOLAN, 2009).

2.4.3 Organização Neuronal Divergente de Fonte Única

Os núcleos no tronco encefálico, no hipotálamo e no prosencéfalo basal seguem a organização em circuito divergente de fonte única (figura 2-C), em que os neurônios que se originam de um núcleo inervam numerosas células-alvo. Na organização neuronal divergente de fonte única que envolve a ação de sinais de uma ampla variedade de neurônios, designa-se normalmente como um sistema difuso de organização. Os neurônios divergentes não estimulam diretamente seus alvos, exercendo sua influência pela utilização de aminas biogênicas atuando como neurotransmissores.

Tais receptores alteram o potencial de repouso e a condutância dos canais iônicos das membranas neuronais, alterando os limiares de despolarização desses neurônios. Os axônios destes neurônios são muito ramificados, acarretando em um grande número de conexões sinápticas em seus alvos. A tabela 1 relaciona os principais sistemas neuronais divergentes de fonte única.

Os neurônios dopaminérgicos pigmentados, que dão origem à substância negra, inervam amplamente o estriado e são responsáveis pela regulação da atividade de neurônios que controlam ações voluntárias (figura 3). Especificamente, os neurônios no trato nigroestriatal excitam vias distais que iniciam o movimento, enquanto inibem as vias que o suprimem. Outros neurônios dopaminérgicos mediais à substância negra projetam-se no córtex pré-frontal e influenciam os processos de pensamento (GUYTON; HALL, 2006; GOLAN, 2009; KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000).

Tabela 1 - Neurotransmissores atuantes em sistemas neuronais divergentes de fonte única e suas funções.

ORIGEM	NEUROTRANSMISSOR	FUNÇÕES
Substância negra (mesencéfalo)	Dopamina	Possibilita o movimento voluntário; emoção, pensamento, armazenamento da memória
<i>Locus ceruleus</i> (ponte)	Norepinefrina	Vigilância; responsividade a estímulos inesperados
Núcleos da rafe (medula oblonga, ponte e mesencéfalo)	Serotonina	Percepção da dor; responsividade dos neurônios corticais; humor
Núcleo basal de Meynert	Acetilcolina	Estado de alerta
Núcleo tegmental pedunculopontino	Acetilcolina	Ciclo de sono/vigília
Núcleo túbero-mamilar (hipotálamo)	Histamina	Reatividade do prosencéfalo

Fonte: Adaptado de Golan, (2009).

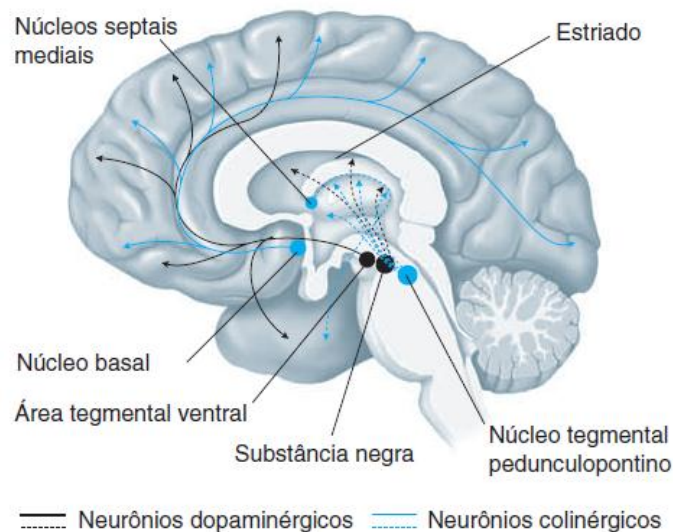


Figura 3 - Vias dopaminérgicas e colinérgicas.

Fonte: Adaptado de Golan (2009).

2.5 DOENÇA DE PARKINSON

O exame anatomopatológico de pacientes com doença de Parkinson, doença de Huntington e hemibalismo revela alterações patológicas nos núcleos

subcorticais. Estas doenças têm três tipos característicos de distúrbios motores: tremores e outros movimentos involuntários; mudanças na postura e tônus muscular, e a pobreza e a lentidão de movimentos sem paralisia. Assim, os distúrbios dos gânglios da base resultam em movimentação diminuída (como na doença de Parkinson), ou o movimento excessivo (como na doença de Huntington). Além destes distúrbios de movimento, danos aos gânglios basais estão associados com distúrbios neuropsiquiátricos cognitivos e comportamentais, refletindo um papel mais amplo desses núcleos. Por serem comuns, os distúrbios dos gânglios da base são importantes em neurologia clínica. A doença de Parkinson foi a primeira doença do sistema nervoso a ser identificada como uma doença molecular causada por um defeito específico no metabolismo de um neurotransmissor (GOLAN, 2009).

Além de fornecer informações importantes sobre o controle motor, o estudo dos gânglios da base ajuda a esclarecer doenças do humor, problemas de cognição e comportamento. A utilização de uma variedade de técnicas de imagem anatômicas, molecular e neural, bem como modelos animais de desordens dos gânglios basais, levou a grandes avanços na compreensão da organização e função destes núcleos (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000).

Os núcleos basais consistem de núcleos interligados com projeções importantes para o córtex cerebral e tálamo. Eles recebem entrada principalmente a partir do córtex cerebral e tálamo e enviam respostas de volta para o córtex (através do tálamo) e do tronco cerebral (figura 4) (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000).

Os quatro núcleos principais dos gânglios da base são o corpo estriado, o globo pálido (ou pallidum), a substância negra (que consiste em pars reticulata e pars compacta), e o núcleo subtalâmico ilustrados na Figura 4 (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000).

O corpo estriado é composto por três subdivisões importantes: o núcleo caudado, o putâmen e o estriado ventral (que inclui o núcleo accumbens). Com exceção apenas no pólo mais anterior, o corpo estriado é dividido em núcleo caudado e putâmen pela cápsula interna, uma importante coleção de fibras que correm entre o neocórtex e o tálamo em ambos os sentidos. O estriado é o receptor principal de entradas para os gânglios basais do córtex cerebral, o

tálamo, e tronco cerebral (GUYTON; HALL, 2006; KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000).

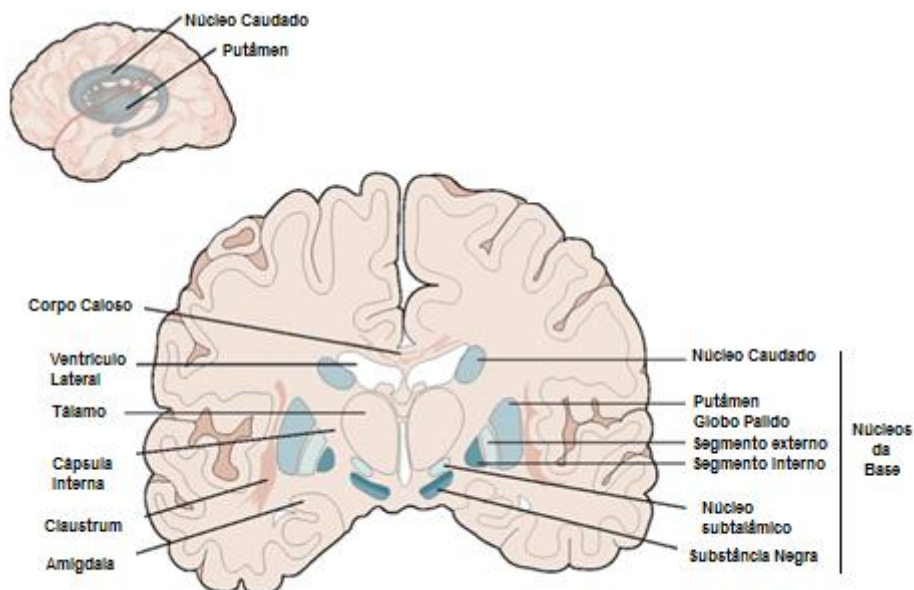


Figura 4 - Núcleos basais.

Fonte: Adaptado de Kandel; Schwartz; Jessel (2000).

A substância negra tem uma zona compacta - *pars compacta*. Esta zona é um núcleo distinto sendo que as células da *pars compacta* são dopaminérgicas e também contém neuromelanina, um pigmento escuro derivado de dopamina oxidado e polimerizado que se acumula com a idade promovendo a coloração escura desta estrutura. Células dopaminérgicas são também encontrados na área tegmental ventral, uma extensão medial da *pars compacta* (GUYTON; HALL, 2006; KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000).

O núcleo subtalâmico está ligado anatomicamente com ambos os segmentos do globo pálido e substância negra. Encontra-se logo abaixo do tálamo e acima da porção anterior da substância negra. As células glutaminérgicas deste núcleo são as únicas projeções excitatórias dos gânglios basais.

A degeneração dos caminhos dopaminérgicos na DP leva a mudanças nas atividades de suas projeções ao estriado. Na figura 5 as setas escuras indicam caminhos excitatórios com respectivo aumento da atividade neuronal

enquanto as setas mais claras correspondem a caminhos inibitórios, logo indicam diminuição da atividade. Num indivíduo normal há mais disponibilidade de dopamina nas sinapses e existe um equilíbrio natural nas vias excitatórias e inibitórias. Já no indivíduo com DP as vias excitatórias diminuem suas atividades enquanto as inibitórias tem sua atividade aumentada (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000).

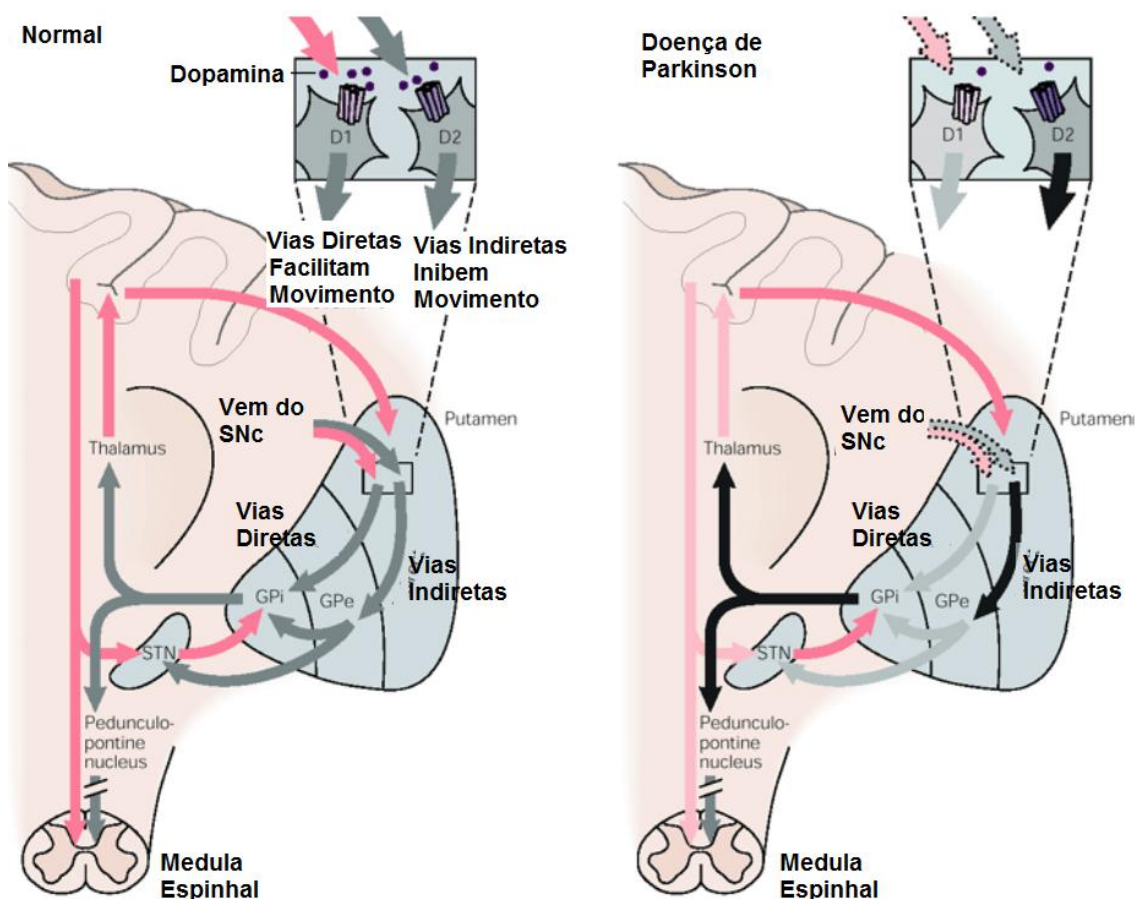


Figura 5 - O circuito gânglio-basal-talamocortical sob condições normais e em doença de Parkinson. As conexões inibitórias são mostradas em cinza e preto. As excitatórias em rosa e vermelho. GPe = Segmento externo do globo palido; GPi = Segmento interno do globo palido; SNC = Substância Negra Compacta; STN = Núcleo subtalâmico.

Fonte: Adaptado de Kandel; Schwartz; Jessel (2000).

2.6 CONCLUSÕES

Pela revisão em obras de fisiologia (GUYTON; HALL, 2006), de farmacologia (GOLAN, 2009) e de fundamentação em neurociências (KANDEL;

SCHWARTZ; JESSEL, 2000), evidenciam-se os processos de transmissão sináptica e alguns princípios de utilização de neurotransmissores. A interligação do SNC com a medula espinal expõe a dependência dos movimentos voluntários à perfeita harmonia necessária para realização destes. A geração da dopamina na substância negra e a projeção dos neurônios nesta última ao estriado explica parcialmente porque a excitação elétrica nos núcleos subtalâmicos aumenta a concentração do neurotransmissor no estriado. As projeções do estriado ao córtex motor são extremamente importantes na ordenação dos movimentos e a falta do neurotransmissor leva às condições de tremor e paralisia que caracterizam a DP. No próximo capítulo descreve-se o estado da arte de estimuladores capazes de excitar o STN e do detector de dopamina com emprego de FSCV, além de alguns trabalhos realizados na tentativa de agregar diferentes técnicas para obtenção de controle em malha fechada. Também faz-se uma revisão sobre eletromagnetismo e voltametria, estudos necessários para a concepção de sistemas em malha fechada visando a aplicação de fármacos ou estímulos energéticos para o controle da geração de dopamina.

Capítulo 3

3 ESTADO DA ARTE

3.1 CONTROLE EM MALHA FECHADA

A determinação da concentração dos neurotransmissores permite ao clínico ou pesquisador atuar na quantidade de entrega de drogas ou aplicação de estímulos e avaliar essas ações fazendo o controle conhecido como “*human in the loop*” (HITL). Todavia a técnica HITL não se mostra adequada para controles de concentração de neurotransmissor por períodos prolongados.

Há portanto, na literatura, várias abordagens que visam o desenvolvimento de sistemas automáticos em circuito fechado para controlar os sintomas de DP (POUSTINCHI; MUSALLAM, 2014; CHEN et al., 2013; STANSLASKI et al., 2012; BASU et al., 2011; LEE et al., 2010; KIMBLE et al., 2009; STANSLASKI et al., 2009; ROTENBERG et al., 2008). Alguns deles usam a avaliação direta da concentração de DA para controlar o fornecimento de drogas ou para ligar um estimulador. Ainda, Poustinchi e Musallam descrevem o ensaio *in vitro* de um sistema que utiliza o nível de concentração de DA, medido por FSCV, para controlar o fornecimento do fator neurotrófico derivado de células da glia (POUSTINCHI; MUSALLAM, 2014; GRONDIN; GASH, 1998), também, Kimble et al. mencionam a possibilidade de ligar um DBS usando do sistema de detecção da concentração do neurotransmissor por eles desenvolvido (KIMBLE et al., 2009).

Visando o controle em malha fechada os neurocientistas e pesquisadores têm empregado diferentes estratégias. Alguns sinais de realimentação utilizados são citados, entre eles: sinais de eletromiografia, sinais de crises de convulsão, eletroencefalografia, sinais de acelerômetros, sensores eletromecânicos miniaturizados ou *micro electro mechanical sensor* (MEMS). Para agir na planta de controle os atuadores empregados se diversificam com a aplicação de diferentes estímulos ou drogas: DBS, *Transmagnetic Stimulation* (TMS) e injeção de GDNF. A tabela 2 sintetiza

alguns trabalhos por autor, ano, sensor empregado, o modelo utilizado e o atuador do sistema.

Tabela 2 - Trabalhos propondo malha fechada.

Ano	Autor	Elemento sensor	Experimento	Atuador
2014	Poustinchi et al.	CFM - FSCV	<i>In vitro</i>	Infusão GDNF
2013	Chen et al .	Acelerômetro	Humanos	DBS
2012	Stanslaski et al.	EEG (convulsão)	Cabras	DBS
2011	Basu et al.	EMG de superfície	Humanos	DBS
2010	Lee et al.	Atividade Neural	Ratos	DBS
2009	Kimble et al.	CFM - FSCV	Ratos	DBS
2009	Stanslaski et al.	Campos Elétricos	Cabras	DBS
2008	Rotenberg et al.	EEG (convulsão)	Ratos	TMS

Fonte: Autoria própria.

3.2 ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA

A DBS vem sendo utilizada desde a década de 1980 com o propósito inicial de ter efeito similar a talamotomia, medida drástica quando a doença de Parkinson não regride mesmo com a utilização da Levodopa – um precursor químico do neurotransmissor dopamina. Desde então a retirada de regiões subtalâmicas vem sendo substituída pela estimulação elétrica de tais regiões (POLLAK et al., 1997; GERMANO, 1998). Os mecanismos de funcionamento de tais estímulos, a maneira como interferem e seus princípios não são completamente entendidos até o momento (AGNESI et al., 2009; BERGER et al., 2008). Porém, as consequências ficam evidentes quando pacientes com DP retomam suas atividades rotineiras com o uso dos implantes cerebrais acionados por dispositivos implantados no peito – figura 6 (BENABID et al., 1987).

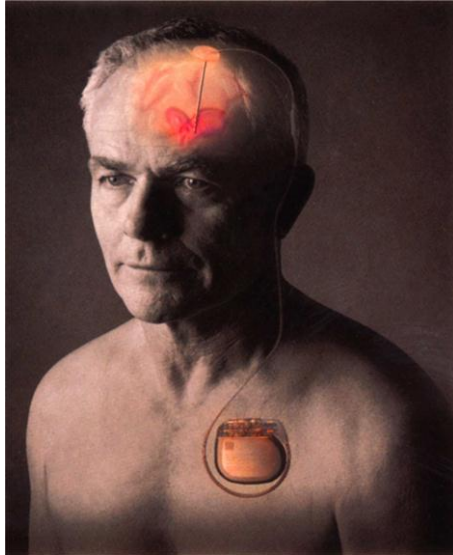


Figura 6 - Implante para DBS acionado por estimulador alojado no peito.

Fonte: Adaptado de Berger (2008).

O circuito do estimulador é microcontrolado e a configuração da onda estimuladora é feita por equipamentos portáteis com comunicação sem fio. Até o presente parâmetros como frequência, amplitude e polaridade entre outros são ajustados pelo clínico que observa os efeitos imediatos de tais ajustes durante a cirurgia (figura 7). Uma vez programado, o paciente obrigatoriamente espera até a próxima visita ao médico quando o mesmo decide, com base no relato do paciente, as alterações necessárias no dispositivo completando desta maneira o HILT (STANSLASKI et al., 2009).

Assim, os neurologistas aguardam pelo desenvolvimento de sistemas em malha fechada com os quais a DBS poderá ser provida de maneira a se adaptar automaticamente a cada paciente (KRINGELBACH; AZIZ, 2012).

Além da DP a DBS é indicada pelo menos para mais duas doenças neurológicas: o tremor essencial e a distonia. Os alvos comuns na DBS são o núcleo subtalâmico (NST), o núcleo intermediário ventral do tálamo (VIM), além do segmento interno no globo pálido (GPi). Mas a DBS não se restringe apenas as doenças que resultam em mau funcionamento motor. Ela também é utilizada quando tratamentos medicamentosos psicotrópicos não respondem satisfatoriamente aos sintomas comportamentais como, por exemplo, a depressão (BERGER et al., 2008; LIKER et al., 2008).

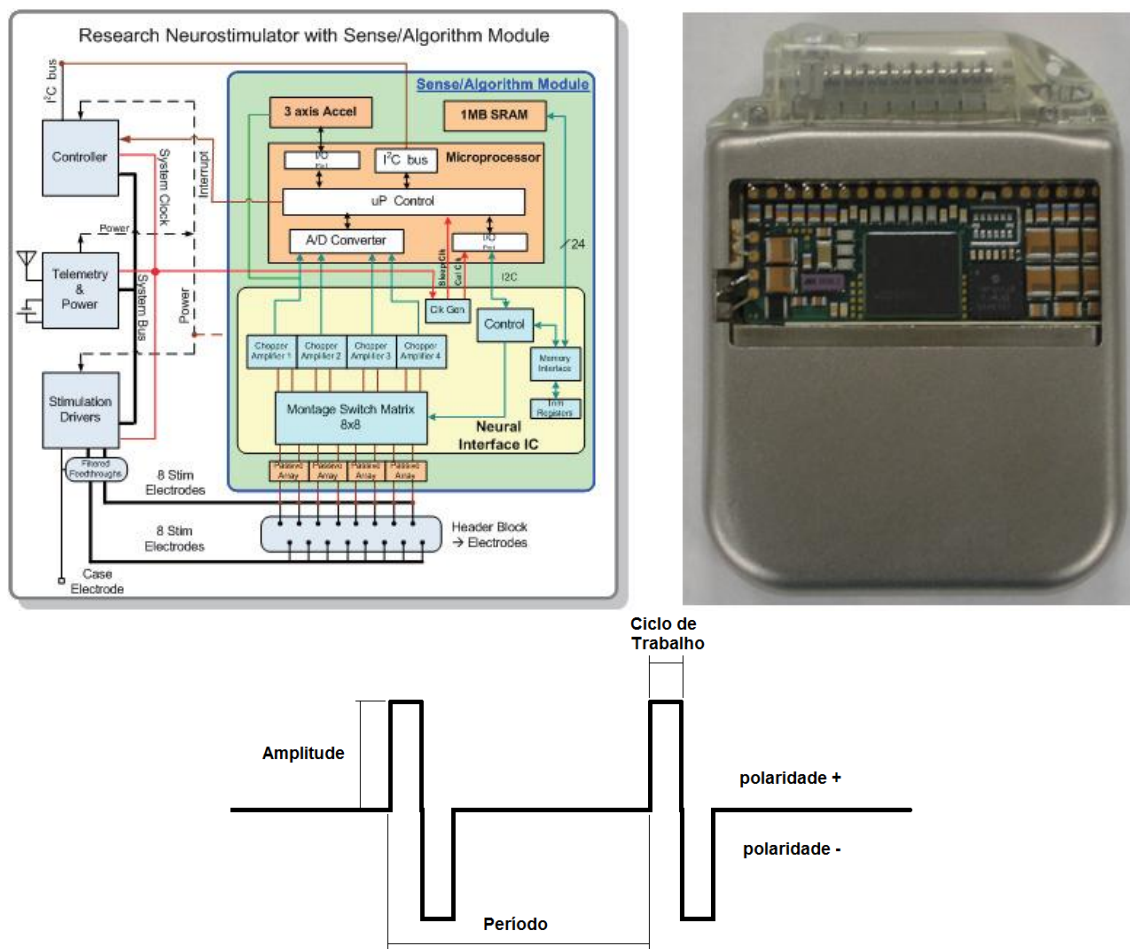


Figura 7 - Protótipo de um equipamento DBS com eletrodos utilizados para detectar crises de epilepsia buscando um controle em malha fechada. À direita o microcontrolador e seus periféricos, à esquerda o sistema protegido pela carcaça de titânio do dispositivo e abaixo a forma de onda de pulso de corrente ou tensão.

Fonte: Adaptado de Denison; Csavoy e Molnar (2009).

3.3 ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA DE TECIDO NERVOSO

Utilizando-se de dispositivos eletromagnéticos como o TMS, é possível influenciar regiões do córtex motor (WEBSTER, 1998), reduzindo ataques convulsivos (ROTENBERG et al., 2008). A tensão induzida nos axônios devido a variação do campo magnético é suficiente para estimular os neurônios nos métodos de estimulação magnética transcraniana. A intensidade de corrente, a forma de onda de corrente, o formato geométrico das bobinas, as distâncias

envolvidas e as variáveis elétricas do circuito afetam as intensidades dos campos elétricos induzidos (BARKER; GARNHAM; FREESTON, 1991; BASSER, 1994; MALMIVUO; PLONSEY, 1995).

A TMS estimula o tecido nervoso excitável com uma corrente elétrica induzida por um campo magnético externo variável no tempo. Os fenômenos eletromagnéticos e grandezas físicas que se seguem são, em sua maioria, campos vetoriais e não vetores isolados sendo, correlacionados por meio das equações de Maxwell (BASTOS, 2008).

O campo elétrico **E**: uma carga ou um conjunto de cargas elétricas **Q**, estáticas, tem a propriedade de criar, no volume que a envolve, a grandeza chamada campo elétrico **E**, que é um campo vetorial. Sua unidade no Sistema Internacional de Unidades é o Newton/Coulomb (N/C), embora comumente na prática utilize-se o Volt/metro (V/m) (ALEXANDER; SADIKU, 2003; HAYT, 1983).

O campo magnético **H**: Um conjunto de cargas elétricas em movimento leva a noção de corrente elétrica **I** cuja unidade é o Ampére (A) e, esta última, é a responsável pela criação de **H** cuja unidade é o Ampére por metro (A/m). Sempre que uma carga ou um conjunto de cargas elétricas **Q**, estejam em movimento, tem-se a formação do campo magnético **H**.

A permeabilidade magnética μ e a densidade de campo ou indução magnética **B**: A permeabilidade μ , de um meio, expressa a capacidade do mesmo em concentrar certo campo magnético **H**. A indução **B** (também chamado de intensidade magnética ou densidade magnética) cuja a unidade é o Tesla ou Weber por metro quadrado (Wb/m^2) se relaciona com **H** por meio da relação dada na equação 1.

$$B = \mu.H \quad (1)$$

Sendo **B** um campo vetorial, pode-se expressar o fluxo magnético Φ através de uma superfície **S** por meio de:

$$\Phi = \int_S B.ds \quad (2)$$

Observa-se, portanto que, por meio de \mathbf{I} cria-se \mathbf{H} , que associado a um meio de permeabilidade μ proporciona certa densidade \mathbf{B} . \mathbf{B} através de determinada superfície \mathbf{S} indica qual é o Φ na superfície em questão. Deste modo Φ é diretamente proporcional a \mathbf{I} .

A força eletromotriz (Fem) resultante da indução magnética é expressa pela Lei de Faraday – equação 3.

$$V_R = Fem = -\frac{d\phi}{dt} = -\frac{d(BS)}{dt} (V), \quad (3)$$

onde: V_R = tensão induzida (Volts) também chamada de força eletromotriz Fem (Volts), \mathbf{B} é a densidade de fluxo magnético e S é a seção transversal no plano x, y da bobina.

O circuito da figura 8 mostra uma bobina atravessada por um fluxo magnético de densidade \mathbf{B} conectada a um resistor sujeito a tensão V_R gerada nos terminais da bobina. A bobina é um enrolamento de material condutor feito por “N” voltas, ou espiras, em torno de um núcleo qualquer – podendo ser inclusive o vácuo e o ar.

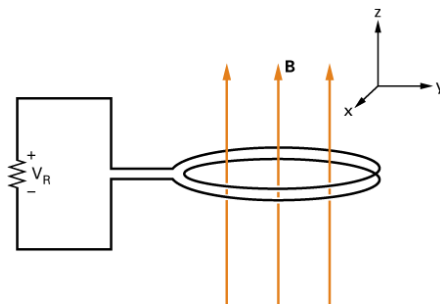


Figura 8 - Bobina sujeita a campo magnético.

Fonte: Adaptado de Alexander, 2004.

Três situações podem promover a ocorrência da Fem: a) quando \mathbf{B} varia temporalmente e S é constante; b) quando \mathbf{B} é constante e S varia no tempo; c) quando ambos, área e indução variam no tempo.

Para calcular a corrente que circulará numa espira, tomando como exemplo a figura 9 onde uma superfície S definida pelo condutor atravessada por um fluxo magnético variável estando a espira fechada em si mesmo,

observa-se que \mathbf{E} e \mathbf{B}_i induzidos se estabelecem, onde \mathbf{B}_i é a indução criada pela própria circulação de corrente devido ao campo elétrico \mathbf{E} . Ainda, admitindo que o diâmetro do fio condutor formador da espira é pequeno em relação ao raio da espira e considera-se que \mathbf{E} - e em conseqüência $\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E}$, onde \mathbf{J} é a densidade de corrente e σ é a condutividade elétrica do material (S/m) - é constante em sua seção. Admitindo-se também que a contra-indução \mathbf{B}_i é muito menor que a indução imposta $B(t)$, ou seja, na equação $Fem = -\frac{dB}{dt}$ apenas $\mathbf{B}(t)$ será considerado, aplicando a equação de Maxwell na sua forma integral, tem-se:

$$\oint_{L(S)} \mathbf{E} \cdot d\mathbf{l} = - \int_S \frac{dB}{dt} \cdot d\mathbf{s} \quad (5)$$

onde S é a superfície fechada definida pela espira circular e $L(S)$ o caminho que a envolve e observando-se que se \mathbf{B} só depender do tempo e que os pares de vetores \mathbf{E} , $d\mathbf{l}$ e $-\frac{dB}{dt}$, $d\mathbf{s}$ são colineares de mesmo sentido pode-se escrever:

$$E \cdot 2\pi R = - \frac{dB}{dt} \cdot \pi \cdot R^2, \text{ logo,}$$

$$E = - \frac{dB}{dt} \cdot \frac{R}{2} \quad (6)$$

Uma vez que:

$$J = -\sigma \cdot E \quad (7)$$

Tem-se:

$$J = -\sigma \cdot \frac{dB}{dt} \cdot \frac{R}{2} \quad (8)$$

O sinal negativo é devido a natureza das correntes elétricas serem tais que tendem a provocar um campo magnético contrário ao campo gerador inicial e, portanto, uma Fem em oposição ao sinal (campo) que lhe deu origem (HAYT, 1983).

Se este condutor, sendo cortado por um campo magnético, tiver N espiras então a tensão induzida será:

$$Fem = -N \cdot \frac{d\phi}{dt} \quad (9)$$

Pode-se calcular a corrente na espira (N=1) de outro modo, uma vez que a Fem será a integral de campo elétrico numa região fechada:

$$Fem = -\int_s \frac{dB}{dt} \cdot ds = \pi R^2 \cdot \frac{dB}{dt} \quad (10)$$

$$Fem = \oint_{L(S)} E \cdot dl \quad (11)$$

E a resistência de uma Espira R_e dada por

$$R_e = \frac{2\pi R}{\sigma \cdot Sf} \quad (12)$$

onde, Sf é a seção do fio condutor.

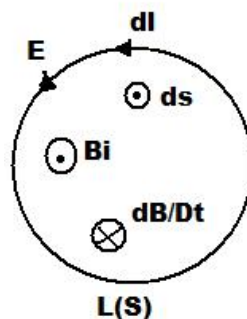


Figura 9 - Anel condutor e induções magnéticas.

Fonte: Adaptado de Alexander (2004).

Assim a corrente será a equação 11 dividida pela equação 12 resultando em:

$$I = \frac{R}{2} \cdot \frac{dB}{dt} \cdot \sigma \cdot Sf \quad (13)$$

Já a indução **B** depende da natureza do meio, ou seja, da permeabilidade magnética, pois $\mathbf{B} = \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{H}$. A permeabilidade magnética $\boldsymbol{\mu}$ é a permeabilidade relativa do meio μ_R multiplicada pela permeabilidade do vácuo μ_0 (ou por aproximação do ar) – equação 14.

$$\boldsymbol{\mu} = \mu_R \cdot \mu_0 \quad (14)$$

Considerando o ar como o núcleo da espira então o valor de $\mu_R = 1$, portanto $\boldsymbol{\mu} = \mu_0$ ($4 \cdot \pi \cdot 10^{-7}$ H/m), valor muito próximo a da permeabilidade em tecidos biológicos (MALMIVUO; PLONSEY, 1995).

Indutância:

Para definições de indutância geralmente se aplicam os fenômenos de origem dual comumente encontrados na natureza. Desta maneira a literatura ao explicar a indutância de uma bobina se apoia na dualidade com os capacitores de placas paralelas (HAYT, 1983). Define-se indutância L cuja unidade é o Henry como sendo:

$$L = N \cdot \frac{\phi}{i} \quad (15)$$

onde: i é a corrente que flui na bobina de N espiras que produz um fluxo magnético Φ que enlaça cada uma de suas espiras.

A substituição de 15 em 9 resulta em:

$$Fem = -\frac{d(L.i)}{dt} \quad (16)$$

Assumindo-se que a geometria do indutor não se modifique ao longo do tempo pode-se escrever 16 somente em função da variação de corrente logo obtem-se:

$$Fem = -L \cdot \frac{d(i)}{dt} \quad (17)$$

Como num circuito eletromagnético o fluxo será proporcional a Força Magneto Motriz dada pelo produto entre o número de espiras e a corrente que as percorrem ($Fmm = N.i$) e, sendo inversamente proporcional a Relutância magnética, Rm do circuito pode-se escrever:

$$\phi = \frac{Fmm}{Rm} \quad (18)$$

ou

$$\phi = N \cdot \frac{i}{Rm} \quad (19)$$

Isolando-se Φ e i e substituindo em 15 chega-se a:

$$L = \frac{N^2}{Rm} \quad (20)$$

Já Rm dependerá diretamente do comprimento do circuito magnético e será inversamente proporcional a seção magnética e a permeabilidade do circuito.

$$Rm = \frac{l}{\mu.S} \quad (21)$$

Ou ainda:

$$L = \frac{\mu_0 N^2 S}{l} \quad (22)$$

Uma definição equivalente para indutância também é dada pelo ponto de vista de armazenamento de energia elétrica W (Joules) tal que:

$$L = 2 \frac{W}{I^2} \quad (23)$$

Aproximando-se duas bobinas uma da outra (figura 10) e aplicando corrente em uma delas, de tal sorte que o fluxo magnético da primeira envolva a segunda (ϕ_{12}) provoca-se na segunda, certamente, uma Fem visto que suas espiras são cortadas pelas linhas de fluxo da primeira. Considerando-se que a segunda bobina possui carga então uma corrente circulará pela mesma provocando passagem de linhas de fluxo na primeira (ϕ_{21}).

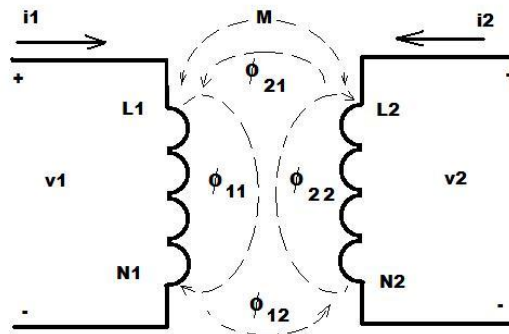


Figura 10 - Acoplamento indutivo.

Fonte: Retirado de Abatti, Pichorim e Schneider 2008.

Neste tipo de experimento pode-se concluir a existência de uma indutância mútua “M” entre os dois enrolamentos que pode-se definir:

$$M_{12} = N_2 \cdot \phi \cdot \frac{I_2}{I_1} \quad (24)$$

onde M_{12} é a indutância mútua entre as bobinas 1 e 2 também de unidade Henry.

Não se demonstra aqui, porém $M_{12} = M_{21} = M$, (HAYT, 1983; ALEXANDER; SADIKU, 2003; NILSSON; RIEDEL, 2009).

Pela existência da indutância mútua pode-se escrever:

$$V_1 = L_1 \frac{di_1}{dt} \pm M \frac{di_2}{dt} \quad (25)$$

$$V_2 = L_2 \frac{di_2}{dt} \pm M \frac{di_1}{dt} \quad (26)$$

Outra importante grandeza a ser considerada é o chamado coeficiente de acoplamento k que varia entre 0 e 1 e está associado a indutância mútua M através da equação 27, sendo k a medida de acoplamento magnético entre duas bobinas (ALEXANDER; SADIKU, 2003, ABATTI; PICHORIM; SCHNEIDER, 2008, NILSSON; RIEDEL, 2009).

$$M_{12} = M_{21} = M = k\sqrt{L_1 \cdot L_2} \quad (27)$$

Um dispositivo genérico de Estimulação Magnética Transcranial utiliza-se da passagem de altas correntes em curtos intervalos de tempo. Em aparelhos comerciais, que devem ser conectados a tomadas comuns de uso geral, para se obter correntes de grandes magnitudes, são necessários capacitores que armazenam energia elétrica que será liberada no momento oportuno. Tais capacitores serão descarregados pelas bobinas de estimulação por meio de chaves eletrônicas.

A magnitude da Fem induzida nos tecidos, decorrente da passagem da corrente pelas bobinas liberada pelos capacitores, é proporcional à taxa de variação da corrente, di/dt . O coeficiente de proporcionalidade é a indutância mútua M (entre a bobina de excitação e o tecido biológico). O termo di/dt depende da velocidade com que os capacitores são descarregados; que por sua vez depende de uma chave de estado sólido (isto é, um tiristor rápido) e do comprimento dos condutores. A indutância L , como visto, é determinada pela

geometria e propriedades como a forma da bobina, o número de voltas e a permeabilidade do núcleo.

A figura 11 ilustra um TMS com a bobina estimuladora posicionada próxima ao cérebro do paciente. Na figura 12 considera-se esta distância como sendo 10 mm e ilustram-se as correntes circulantes em uma esfera para efeito de visualização da densidade das correntes circulantes. As induções de tensão e as correntes circulantes são obtidas pelas equações acima demonstradas.

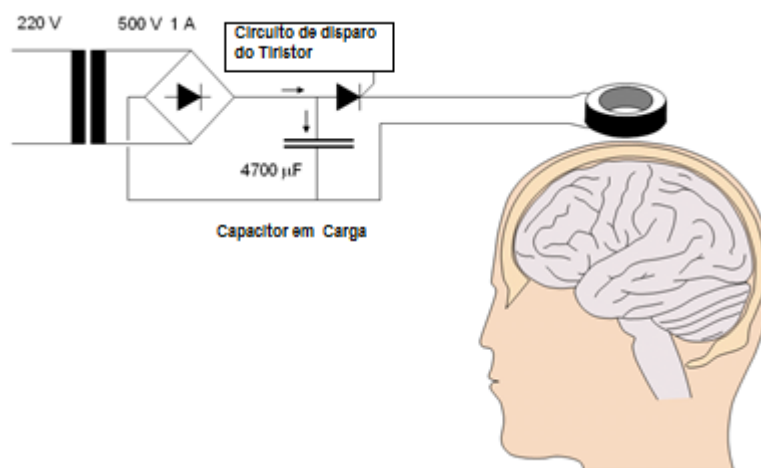


Figura 11 - Circuito básico de um estimulador neural aplicado em ser humano ou *Transcranial Magnetic Stimulator*.

Fonte: Adaptado de Malmivuo e Plonsey (1995).

A aplicação da TMS resulta em correntes circulantes no tecido nervoso como as ilustradas na figura 12.

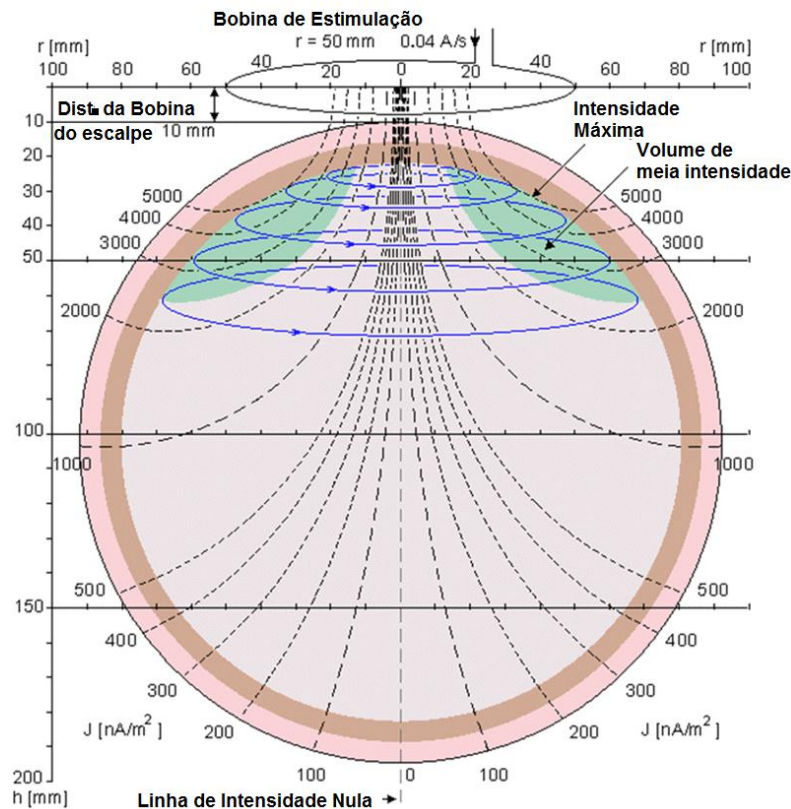


Figura 12 – Modelo para avaliação das densidades de correntes circulantes em tecido nervoso provocado por disparos de TMS em função das distâncias.

Fonte: Adaptado de Malmivuo e Plonsey (1995).

3.4 VOLTAMETRIA CÍCLICA EM NEUROCIÊNCIAS

As fundamentações teóricas da amperometria e da voltametria empregadas em neurociência atualmente, encontram suas raízes no trabalho de Jaroslav Heyrovsky, que recebeu o prêmio Nobel de química em 1959 pela descoberta e desenvolvimento dos métodos de análise polarográficos. A partir desta época a voltametria cíclica se estabeleceu como um dos métodos analíticos de grande sensibilidade. A voltametria é uma técnica eletroanalítica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie eletroativa são obtidas pela análise da curva corrente em função da tensão. A eletrólise ocorre em uma célula eletroquímica constituída por um eletrodo de trabalho – de pequena área – e de um eletrodo de referência – de área maior. O potencial é aplicado entre os eletrodos variando-o a uma velocidade constante registrando-se os valores para obtenção da curva chamada de voltamograma. O eletrodo

de trabalho é comumente constituído de material inerte e quando feito pela técnica de mercúrio gotejante chama-se tal técnica de polarografia. Uma das aplicações da técnica inclui seu uso em varreduras múltiplas e rápidas, a chamada FSCV (MICHAEL, 2007).

Uma das qualidades da FSCV é sua alta resolução temporal assim como uma ótima diferenciação química demonstrando-se útil no rastreamento ou detecção de neurotransmissores por meio das propriedades de redução e oxidação dos mesmos – REDOX (WANG, 2000).

Outras técnicas eletroquímicas como a cronoamperometria, a voltametria de pulso normal e a voltametria de pulso diferencial, entre outras estão também disponíveis, porém a FSCV tem encontrado ampla utilização em aplicações nas neurociências (MICHAEL, 2007).

Como o nome indica, o potencial no eletrodo é variado a partir de um valor inicial para um potencial final e, em seguida, retornando ao potencial inicial, geralmente a uma taxa de variação de 300 V/s (Figura 13-a). A corrente é continuamente medida durante a varredura sendo plotada em relação ao potencial aplicado (Figura 13-b). Devido a característica capacitiva do eletrodos utilizados e a variação de potencial uma corrente chamada de fundo (*background*) também é gerada pois a corrente i , varia em função da capacitância de dupla camada (C_{dl}) do eletrodo e da taxa de variação de tensão v no tempo t :

$$i = C_{dl} \frac{dv}{dt} . \quad (24)$$

Para obter a corrente REDOX deve-se retirar (por software ou hardware) esta corrente e a resultante é similar ao mostrado no último gráfico da figura 8-b. Como múltiplas varreduras são realizadas, uma visualização em gráfico tridimensional torna mais fácil a verificação das mudanças de REDOX. Esse gráfico (figura 13-c) demonstra a variação temporal nas abcissas com as varreduras de potencial nas ordenadas entre -0,4 e 1,0 volt, tendo as correntes em escala colorimétrica de ordem de grandeza de nA.

Desta maneira, a técnica proporciona informação voltamétrica (corrente versus potencial) característica da substância a ser detectada. Isto é útil para fins de identificação qualitativa, além da quantitativa, uma vez que o voltamograma de uma substância é geralmente único em sua forma. A FSCV ainda se mostra como a técnica mais rápida de voltametria disponível se levado em conta o tempo de resposta que é da ordem de milissegundos, sendo, superior a outras técnicas analíticas neste quesito (GARRIS et al., 2007).

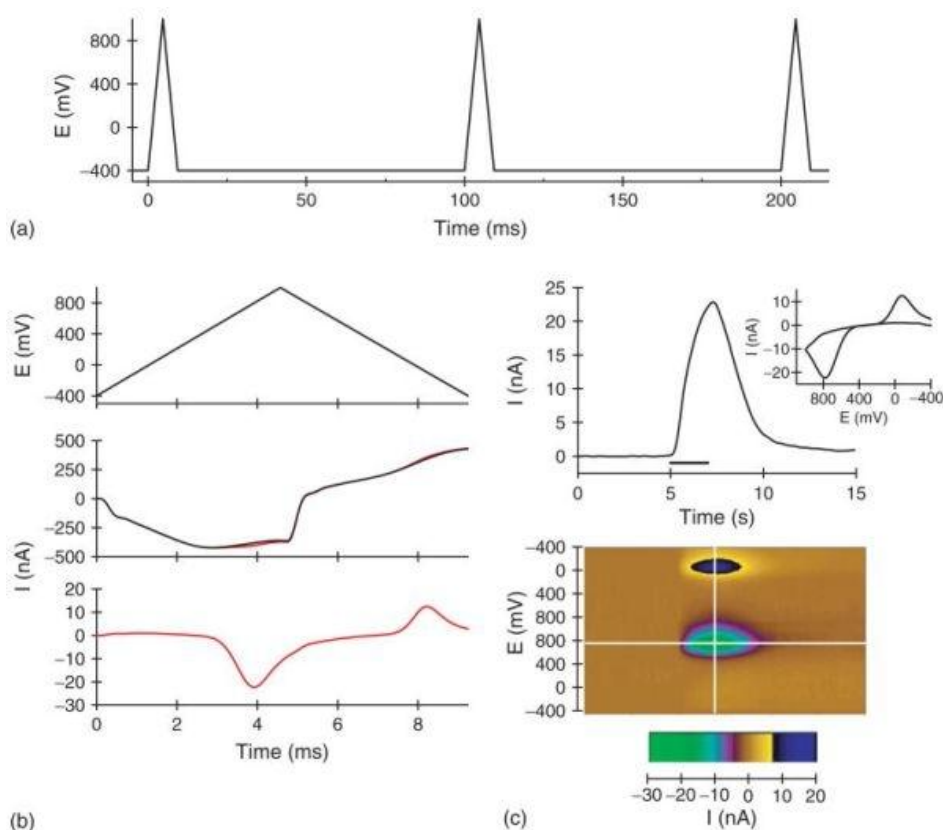


Figura 13 - A - múltiplas variações de potencial – aproximadamente em 10 Hz. B - A rampa ou pirâmide de potencial, a variação de REDOX somada a corrente *background* e por último a corrente REDOX após subtração de corrente de *background*. C - um voltamograma (em cima) e o gráfico tridimensional de vários voltamogramas

Fonte: Adaptado de Garris et al. (2007).

Os efeitos do potencial aplicado na voltametria e o comportamento REDOX da corrente são descritos por leis bem conhecidas. O potencial aplicado controla as concentrações REDOX na superfície do eletrodo

(concentrações de oxidação e redução Co e Cr) sendo que a taxa de reação k é descrita pela equação de Nernst. Quando se deseja conhecer as correntes de difusão resultantes do processo de REDOX – conhecidas como correntes Farádicas – é necessário correlacionar o fluxo de material na interface eletrodo solução descrita pela lei de Fick. O inter-relacionamento entre estes dois processos é responsável pelas características observadas nos voltamogramas (WANG, 2000).

Uma reação eletroquímica pode ser descrita por $O + ne^- \leftrightarrow R$, e com a aplicação de uma força eletromotriz altera-se as concentrações de O e R na superfície do eletrodo – a qual usando-se a equação de Nernst, pode ser escrita também sob a forma:

$$E_1 = E_0 - \frac{R.T}{z.F} \left\{ \ln \frac{[C_R]}{[C_O]} \right\}, \quad (25)$$

sendo E_1 o potencial final, E_0 o potencial inicial, R a constante universal dos gases (8,31 J/mol. Kelvin), T a temperatura absoluta, F a constante de Faraday ($9,65 \times 10^4$ C/mol (1F) e z a valência.

Para o cálculo da corrente no eletrodo (em Ampéres) deve-se aplicar a equação de Difusão de Fick,

$$J = -D \cdot \frac{\partial[C]}{\partial x}, \quad (26)$$

onde C é a concentração da espécie iônica sendo considerada ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$), D é a constante de difusão ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) e x é a distância (cm).

Multiplicando-se 26 pela área do eletrodo A e pelo número n de elétrons transferidos por molécula reagente e pela constante de Faraday F obtêm-se 27.

$$i = n \cdot F \cdot A \cdot D \frac{\partial[C]}{\partial x} |_{x_0}, \quad (27)$$

Um método eletroquímico dos mais simples é a cronoamperometria onde um degrau de tensão é aplicado à solução. Neste caso um gradiente de concentração é estabelecido durante um certo tempo cuja segunda lei de Fick permite escrever:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial J}{\partial x} = D \cdot \frac{\partial^2 [C]}{\partial x^2}, \quad (28)$$

onde J é a densidade de corrente da espécie iônica considerada.

Para se encontrar o valor da corrente em certo instante de tempo deve-se aplicar a Transformada de Laplace em 28 resultando em 29. A reação, também é influenciada pela distância entre os eletrodos, (considerando eletrodos esféricos), influenciando na medição da concentração.

$$i(t) = \frac{n.F.A.\sqrt{D}.C}{\sqrt{\pi.t}}, \quad (29)$$

que vem a ser a equação de Cottrell (MICHAEL, 2007). A corrente determinada por esta última equação deve-se somente a variação REDOX - chamada de corrente Farádica – (MICHAEL, 2007; WANG, 2000). A corrente total no eletrodo, para um pulso aplicado, vem a ser:

$$i_{total} = \left\{ C dl \frac{dv}{dt} \right\}_{parcela \text{ não farádica}} + \left\{ \frac{n.F.A.\sqrt{D}.C}{\sqrt{\pi.t}} \right\}_{parcela \text{ REDOX}} \quad (30)$$

Para avaliação da concentração de determinada substância a parcela de corrente não farádica deve ser subtraída por hardware ou software. Esta corrente é inerente ao circuito, com parcela superior a 90% da corrente de medição sendo conhecida também como corrente de *background*.

3.5 ELETRODOS

Eletrodos utilizados em neurociências tem dimensões diminutas e, desta forma, o mínimo de lesões é causado quando implantados no tecido nervoso. Microeletrodos típicos tem diâmetros que variam entre 5 a 30 micrometros e comprimento entre 25 a 400 micrometros (área exposta). A superfície que não entra em contato com o tecido biológico é protegida pelo vidro que compõe o isolamento do eletrodo (WEBSTER, 1998).

O comportamento de um microeletrodo é capacitivo, pois a dupla camada de cargas em sua superfície o caracteriza como tal dispositivo. Por esse efeito e pela magnitude das correntes REDOX ser pequena, mais de 90% da corrente de varredura num sistema voltamétrico é devido a capacitância do eletrodo. As características de interface eletrodo-eletrólito foram amplamente discutidas em diversos trabalhos sendo o microeletrodo modelado como um cabo coaxial e sua capacitância varia em função de suas características físicas dimensionais, além das características intrínsecas ao isolante constituinte do mesmo (WEBSTER, 1998; GEDDES; BAKER, 1989).

A capacitância de um eletrodo como o da figura 14, pode ser calculada na região com isolante por unidade de comprimento [F/m] aplicando-se:

$$\frac{C}{L} = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \pi \cdot d}{e}, \quad (31)$$

onde: C é a capacitância, L o comprimento, ϵ_r a constante dielétrica relativa do material isolante, ϵ_0 a constante dielétrica no vácuo, d o diâmetro do eletrodo 'e' é a espessura do isolante (WEBSTER, 1998).

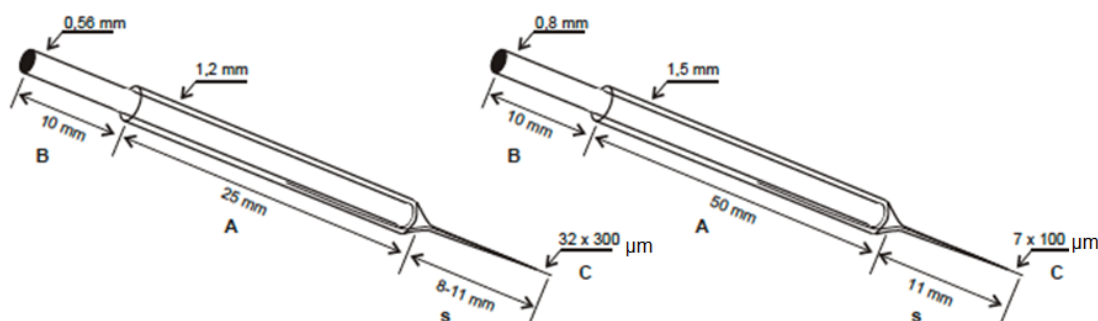


Figura 14 - Microeletrodo comercial da Invilog Research Ltda. A é o comprimento do eletrodo isolado, B a região para conexão e s a área exposta do eletrodo que deve entrar em contato para o experimento.

Fonte: Adaptado de Invilog (2013).

No entanto, tal capacitância de eletrodo não terá influência na voltametria sendo que a capacitância de dupla camada (C_{dl}) que forma-se em torno do eletrodo (área exposta s da figura 14) que entra em contato com a

substância iônica vem a ser de grande importância. Tal capacitância deve-se a diferença de concentração entre a camada compacta (junto ao eletrodo) e a camada difusa (distante do eletrodo). Valores típicos desta capacitância situam-se entre 10 e 40 $\mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$.

A camada interna, próxima ao eletrodo, conhecida como o plano de Helmholtz interior (IHP), contém moléculas de solvente, e especificamente íons adsorvidos (os quais não são completamente dissolvidos). É definido pelo lugar geométrico dos íons especificamente adsorvidos. A camada seguinte, o plano de Helmholtz exterior (OHP), é o plano imaginário que passa através do centro dos íons dissolvidos em sua maior aproximação à superfície por força Coulombianas de longo alcance. Ambas as camadas de Helmholtz representam a camada compacta (figura 15). Essa camada compacta de cargas é fortemente fixada pelo eletrodo e pode permanecer mesmo quando o eletrodo é retirado da solução (WANG, 2000).

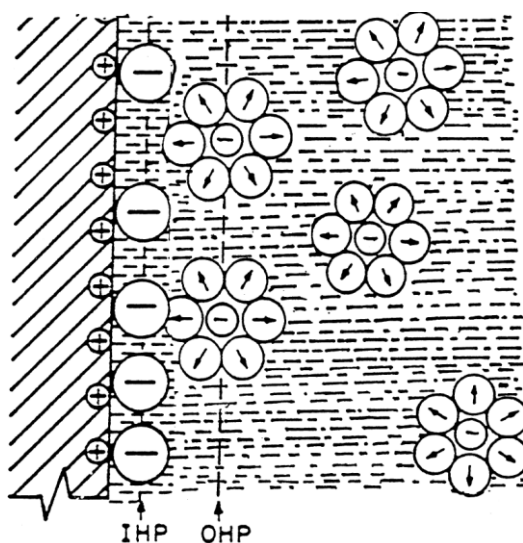


Figura 15 – Camada de capacitância de Helmholtz num eletrodo onde IHP representa o plano de Helmholtz interior e OHP o plano exterior.

Fonte: Adaptado de Wang (2000).

A camada exterior (para além da camada compacta), referida como a camada difusa, é uma região tridimensional de íons dispersos, que se estende a partir da OHP na solução. Tal distribuição iônica reflete o equilíbrio entre

cargas ordenadas devido ao campo elétrico e cargas desordenadas causadas pelo movimento térmico aleatório. Com base no equilíbrio entre estes dois efeitos opostos, a concentração de espécies iônicas a uma dada distância a partir da superfície, C_x decai exponencialmente (figura 16), de acordo com a equação de Nernst:

$$E = -\frac{RT}{z.F} \left\{ \ln \frac{[C_x]}{[C_o]} \right\}, \quad (32)$$

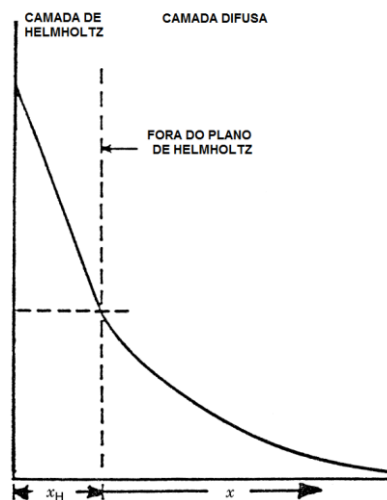


Figura 16 – Variação de potencial ao longo da dupla camada elétrica. x_H - referencial dentro da camada compacta (Helmholtz). x - referencial na camada difusa a partir de OTH.

Fonte: Adaptado de Wang (2000).

A capacitância de dupla camada consiste na combinação da capacitância de camada compacta ou Helmholtz (C_H), em série com a capacitância da camada difusa (C_d). Dessa maneira calcula-se C_{dl} usando 31:

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_d}, \quad (33)$$

3.6 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

A cirurgia estereotáxica é uma forma minimamente invasiva de intervenção cirúrgica que usa um sistema de coordenadas tridimensionais para

localizar pequenos alvos no interior do corpo e para executar nestes alguma atividade, tal como ablação, biópsia, lesão, injeção, estimulação, implante, radiocirurgia entre outras (SPIEGEL; WYCIS, 1952).

Numa cirurgia para implante de eletrodos visando aplicação de DBS necessita-se de uma exatidão milimétrica o que é alcançado com a utilização de um arco cirúrgico estereotáxico o qual é graduado para melhor localização dos alvos (figura 17). Por referenciais biológicos entre eles o bregma e o lambda, (marcas naturais nos ossos) o clínico determina as coordenadas necessárias para a realização dos orifícios necessários para passagem dos eletrodos de implante (SPIEGEL et al., 1947). Na primeira etapa da cirurgia em humanos o paciente permanece acordado, sem sentir dor, uma vez que o tecido nervoso cerebral que está sendo atingido não possui células nociceptoras. A anestesia é somente na região do crânio onde a pele naturalmente inervada gera sinais de dor. Pelo fato do paciente estar lúcido, o clínico obtêm respostas do mesmo para melhor localizar o implante ao mesmo tempo em que monitora possíveis efeitos colaterais, tais como desconforto ou dor em certas regiões do corpo, estímulo motor indevido, visão embaçada do paciente, etc. (BENABID et al., 2000).

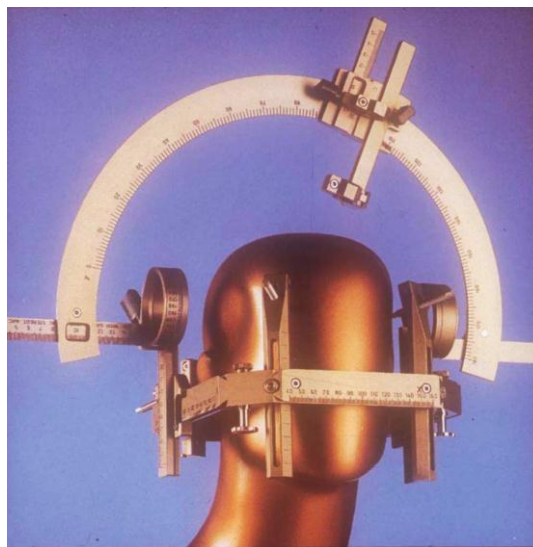


Figura 17 - Arco estereotáxico para uso em humanos.

Fonte: Adaptado de Berger (2008).

Por confirmação em imagens radiográficas como na figura 18 o médico tem certeza da localização do implante na região alvo (OBESO et al., 2000).



Figura 18 - Cortes radiográficos por tomografia para confirmação de coordenadas estereotáxicas.

Fonte: Adaptado de Berger (2008).

Após a confirmação do posicionamento dos eletrodos o paciente é submetido a anestesia geral para implante do dispositivo gerador de pulsos para DBS e FSCV (OBESO et al., 2000).

3.7 CONCLUSÕES

Foram discutidas neste capítulo algumas técnicas de cirurgia e de eletroquímica. Com o melhor entendimento dos princípios básicos de atuação da DBS, TMS e da importância do neurotransmissor dopamina envolvidos nos processos de movimentos neuromodulados - explanados no capítulo 2 - evidenciam-se os métodos e ferramentas iniciais para obtenção de estímulos neuronais e avaliação de seus impactos.

Pela leitura crítica de alguns trabalhos que procuram realizar o controle em malha fechada e, pela análise dos resultados destes, apresentam-se no capítulo 4 a seguir os circuitos de FSCV para fornecer o sinal de realimentação para controle da malha e três sistemas de atuação: DBS, TMS e Infusão de medicamentos.

Capítulo 4

4 DESENVOLVIMENTO

Para se obter o controle em malha fechada propõe-se a estrutura mostrada na figura 19 onde diferentes tipos de atuadores ou estimuladores podem ser utilizados conforme a seleção prévia (via *software*) entre eles: a TMS, a infusão de GDNF e a DBS no NST dos animais. O circuito é fechado com a realização de FSCV no estriado cabendo ao *software* as decisões de aumentar ou diminuir a aplicação do estímulo.

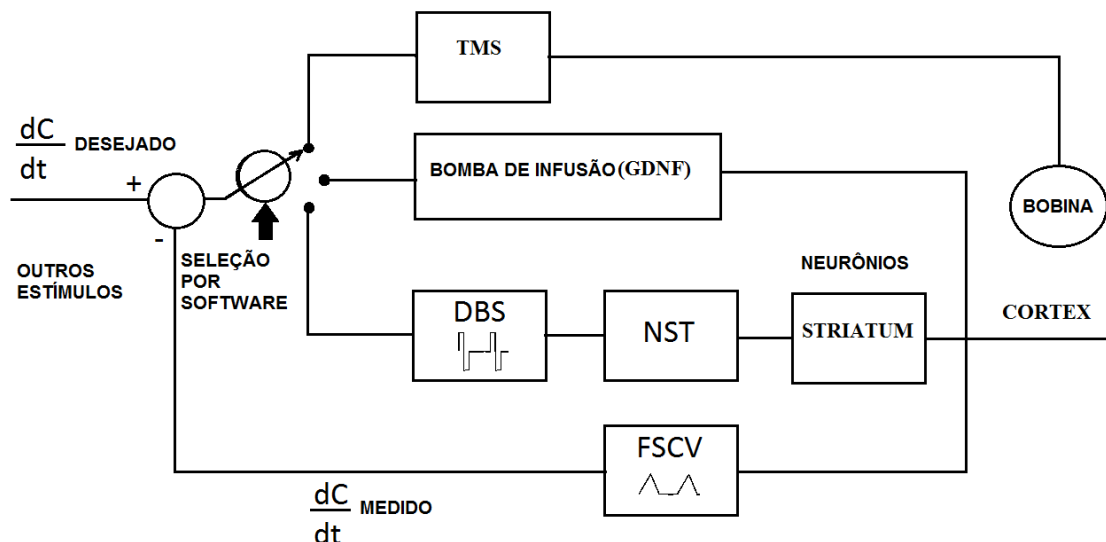


Figura 19 - Concepção final do sistema proposto para estimulação - DBS, TMS e por infusão de GDNF com realimentação por FSCV.

Fonte: Autoria própria.

4.1. DESCRIÇÃO GERAL DO CIRCUITO FSCV

O bloco de FSCV é composto basicamente da aplicação de uma variação de potencial (rampa) por meio de um circuito eletrônico em um microeletrodo de fibra de carbono – CFM, e um amplificador para converter a corrente gerada no CFM em sinal de tensão.

O circuito de amplificação foi adaptado do modelo apresentado por Garris et al. estando ilustrado pelo diagrama em blocos na figura 20 (GARRIS et al., 2004; GARRIS et al., 2007). A placa de voltametria consiste de um sistema alimentado por uma bateria, reguladores de tensão e controlador de potencial de referência para gerar as tensões necessárias para os amplificadores operacionais. No diagrama, um microcontrolador gera o sinal digital necessário para o conversor digital analógico - DAC – formando a rampa de potencial e permitindo controle de amplitude e ajuste de zero em relação a referência. Esta rampa é aplicada a uma etapa de amplificação das correntes elétricas provenientes do eletrodo de registro por meio de um sistema de conversão corrente para tensão (MILLMAN, 1981). Este sinal amplificado é posteriormente subtraído do mesmo sinal de rampa que é injetado em sua entrada inversora seguindo para conversão deste sinal analógico para digital no próprio sistema DAC do microcontrolador. Desta última etapa o sinal agora digitalizado é enviado por rádio-frequência para um computador de mesa para tratamento (filtragem, operação, armazenamento e análise).

O CFM recebe a rampa de potencial (uma varredura de forma de onda triangular de -0,4 a 1.0 V), e as correntes geradas pela oxidação e redução da dopamina são registradas pelo dispositivo (SHON et al., 2010).

4.2 DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DO CIRCUITO FSCV

O sinal analógico do microeletrodo, resultante de fenômenos de oxidação e redução no mesmo, consiste de uma corrente da ordem de nanoampéres que é amplificada por um amplificador operacional AO de instrumentação OPA 2340 (BURR BROWN, 2010) funcionando como transdutor corrente – tensão.

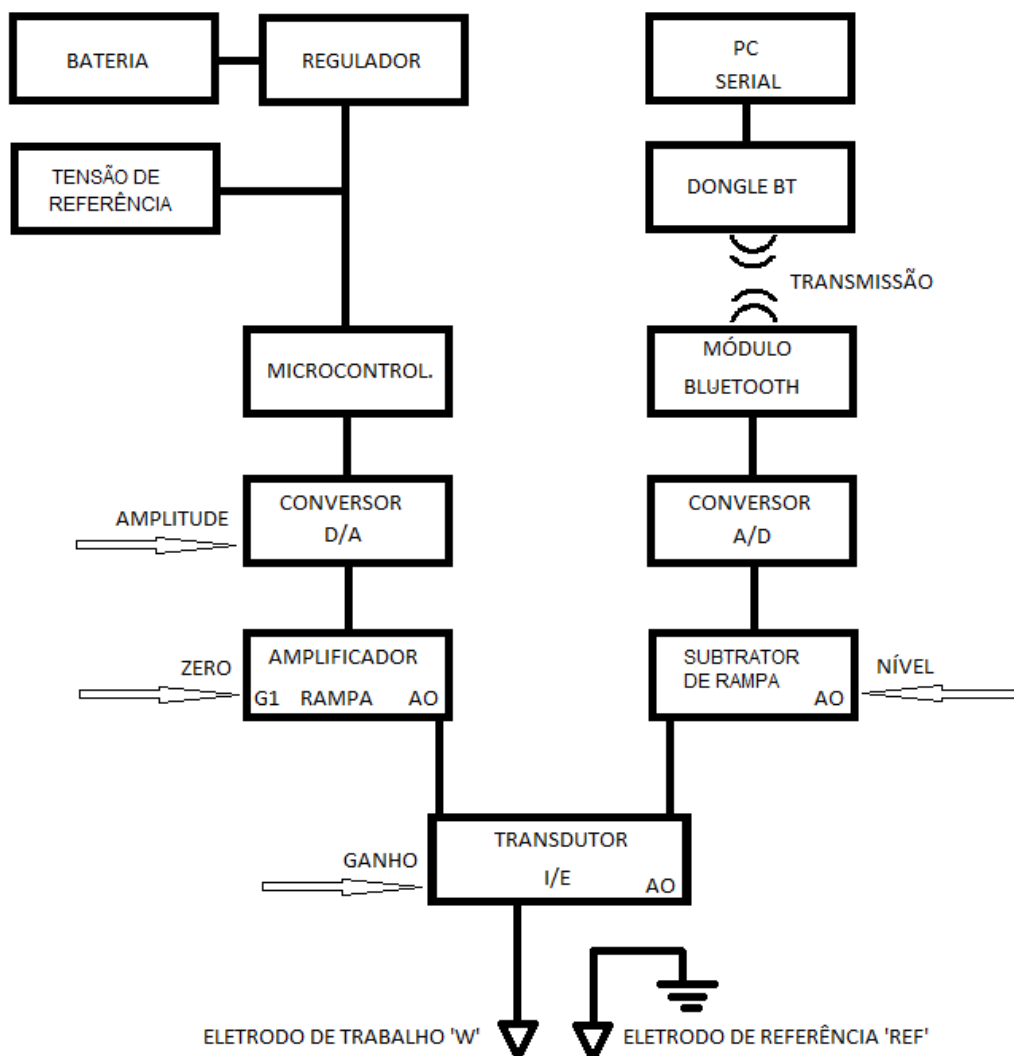


Figura 20 - Diagrama em blocos do circuito FSCV.

Fonte: Autoria própria.

A rampa proveniente de um conversor digital analógico - é aplicada nos dois AO's. O sinal obtido é convertido no módulo ADC do microcontrolador montado numa placa Arduino e programado em linguagem C. O sinal digitalizado segue para o módulo de comunicação serial do microcontrolador que está conectado ao LMX9830 (TEXAS INSTRUMENTS, 2012-a) de tecnologia de comunicação sem fio (Bluetooth). Os sinais enviados são captados por um módulo *dongle Bluetooth* no computador de mesa onde os dados podem ser armazenados e processados - ver figura 20.

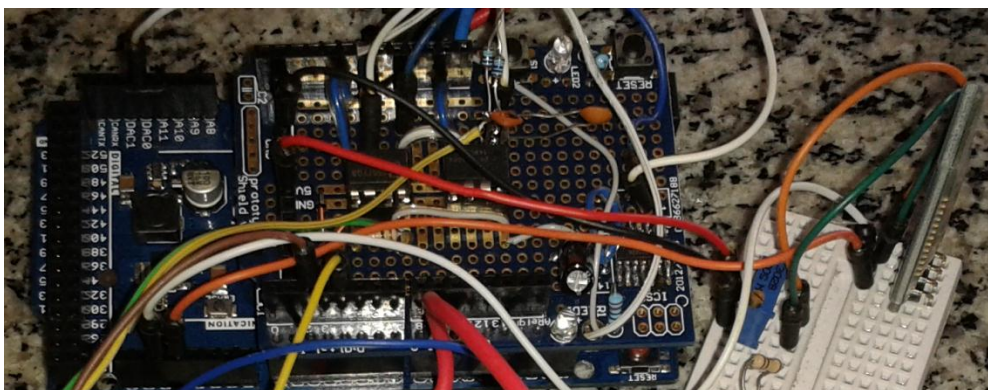


Figura 22 - Foto do circuito analógico montado sobre o sistema microcontrolado e conectado ao comunicador Bluetooth.

Fonte: Autoria própria.

4.3 CIRCUITO ESTIMULADOR IMPLANTÁVEL – CIRCUITO DBS

O estimulador consiste de um eletrodo de dois terminais trançados implantado no núcleo subtalâmico, ver figura 23. Este implante recebe pulsos bipolares de tensão limitando a níveis seguros ($\pm 800 \mu\text{A}$) as correntes provenientes de um amplificador operacional - AO LF-353 (TEXAS INSTRUMENTS, 2012-b) funcionando como *buffer* de tensão (SHANNON, 1992). A alimentação do mesmo é simétrica, provida por um conversor DC/DC DCP010515DBP (TEXAS INSTRUMENTS, 2012 c) que converte 5 volts em $\pm 15\text{V}$.

O AO recebe o sinal proveniente do conversor digital analógico – MCP 4725 (MICROCHIP, 2012) - para obtenção do nível de tensão selecionado na entrada do DAC. Esta seleção de nível ocorre de maneira serial via comunicação I2C proveniente do microcontrolador ATMEGA 328 (ATMEL, 2010) instalado em uma placa Arduino (figura 23). Os comandos do microcontrolador podem ser alterados via computador pessoal (PC) em qualquer instante, podendo ser manipulados o tempo de duração do pulso, a polaridade, frequência e a intensidade do mesmo.

Para a comunicação entre o microcontrolador e o PC um circuito sem fio é utilizado de tecnologia Bluetooth visando interferir o mínimo possível com

ruídos possivelmente conduzidos via cabo para o interior do campo de teste construído (câmara comportamental protegida por uma gaiola de Faraday, adequadamente aterrada), onde um circuito FSCV monitora as correntes circulantes no estriado do animal devido a alteração dos níveis dopaminérgicos (ABATTI et al., 2014).

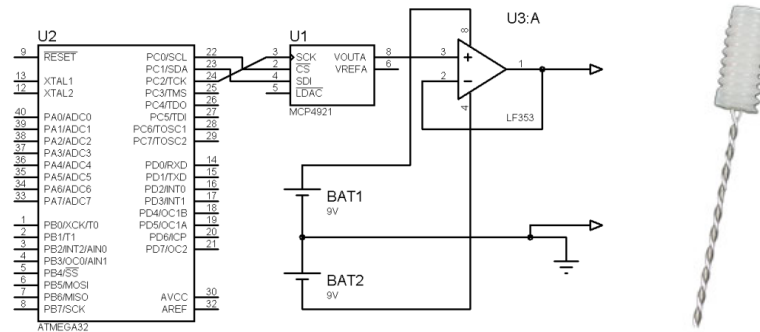


Figura 23 - Circuito parcial do estimulador tipo DBS e Eletrodo de par trançado implantável da Plastics One.

Fonte: Modificado de Plastics One 2013.

4.4 DISPOSITIVO PARA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA TRANSCRANIANA

Desenvolveu-se um TMS para aplicação de pulsos de magnitude superior a 400 volts numa bobina de 200 mm de diâmetro e 25 espiras com energia armazenada num banco de capacitores de 560 μ F chaveados por um Retificador Controlado de Silício - SCR - de alta potência – (ABATTI; ARAUJO, 2012) parâmetros estes, similares aos de equipamentos comerciais – figura 11 e figura 24 (MALMIVUO; PLONSEY, 1995).

Outro circuito de TMS realizado é similar ao da figura 25 onde se observam o transistor de efeito de campo com a função de carregar os capacitores de armazenagem de energia, e três transistores para descarga da energia nas bobinas de indução conforme o comando enviado pelo microcontrolador que está óticamente acoplado aos transistores de pulso.



Figura 24 - Estimador TMS aplicando pulsos em rato em caixa de esquila com a realização de FSCV simultaneamente.

Fonte: Autoria própria.

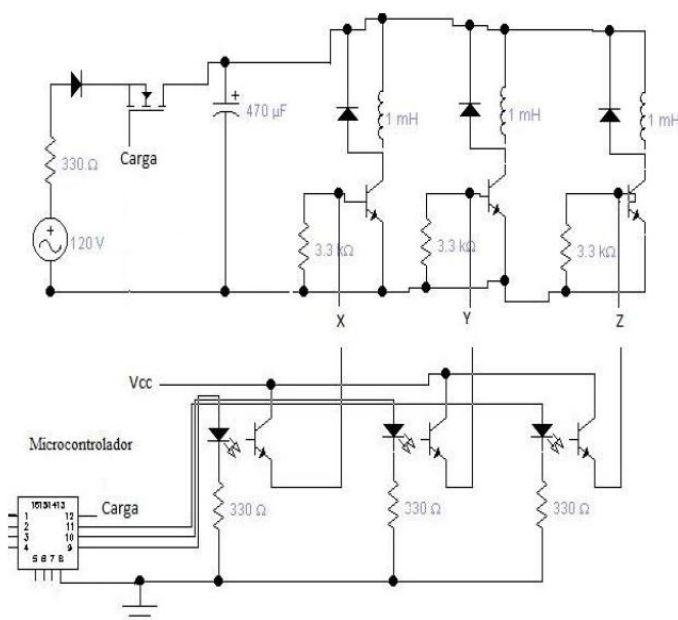


Figura 25 – Circuito eletrônico de TMS para controle de carga de capacitores e descarga em bobinas estimuladoras.

Fonte: (ABATTI; ARAUJO, 2012).

4.5 CIRURGIAS PARA IMPLANTE DE ELETRODOS PARA FSCV E ELETRODO PARA DBS

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados nos laboratórios de farmacologia da Universidade Federal do Paraná de acordo com o Comitê de Experimentação de Uso Animal sob número CEUA - 440.

A cirurgia nos ratos é realizada visando localização de três pontos específicos: o NST para introdução do eletrodo de estimulação, a SNc - para aplicação de droga depletora de neurônios dopaminérgicos para modelamento do animal com DP, e o Estriado (constituído pelo núcleo caudado, putâmen e núcleo acumbens) para medição de alteração de concentração de DA.

Para confirmação do posicionamento do eletrodo estimula-se o NST e verifica-se a resposta no estriado. Os parâmetros de ajuste são: tensão de 0,8V, 20 pulsos de 0,5 ms durante 400 ms utilizando o equipamento Master 8 (A.M.P.I., ISRAEL). Para registro, um sistema de aquisição de dados composto por eCorder 410 (Edaq Incorporated, EUA) e um optoisolador Isoflex (A.M.P.I., ISRAEL) - Figura 26. Os eletrodos de referência e auxiliar estão alocados em pipeta com solução salina 0,9% do lado oposto a linha central. O eletrodo de registro utilizado é de fibra de carbono confeccionado no Laboratório de farmacologia da UFPR.



Figura 26 - Estimulador de bancada AMPI e sistema de aquisição de dados eDAQ.

Fonte: Autoria própria.

As coordenadas utilizadas foram: NST: Antero posterior AP -3,8, Médio Lateral 2,50, Dorso Ventral - 7,0. Para o Estriado: CPu (caldado putamen) núcleo acumbens: AP 1,2; ML 3,7; DV -6,0 num ângulo de 20 graus.

Os anestésicos utilizados foram cetamina (100mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). O animal é mantido anestesiado até a finalização do procedimento – figura 27. Esses procedimentos cirúrgicos são realizados como rotina no laboratório de Farmacologia da UFPR (DA CUNHA et al., 2010, DOMBROWSKI et al., 2013).

Para realizar os orifícios nos crânios dos animais utilizou-se uma furadeira com broca de 2 mm. A figura 28 mostra os pontos de interesse no crânio (PAXINOS; WATSON, 2005).

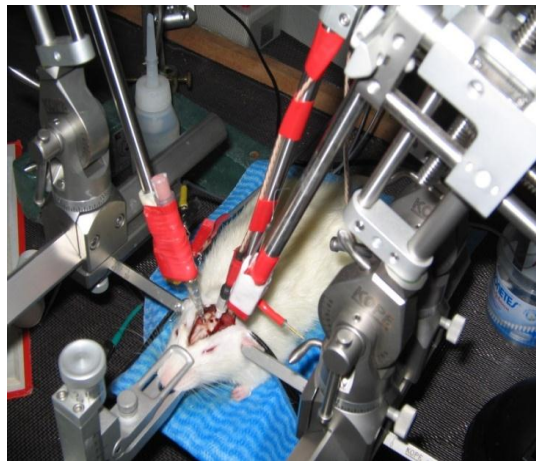


Figura 27 - Foto de um animal durante cirurgia estereotáxica para implante de eletrodos de referencia, auxiliar, de registro e estimulador.

Fonte: A autoria própria.

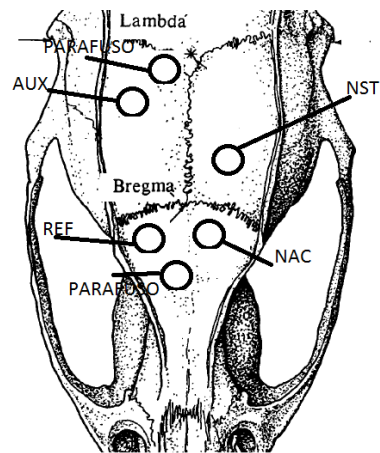


Figura 28 - Localização de furação do crânio para colocação dos implantes de eletrodos nas estruturas cerebrais alvo.

Fonte: Adaptado de Paxinos e Watson (2005).

Todas as cirurgias, bem como as medições *in vitro* foram realizadas dentro de gaiola de Faraday adequadamente aterrada uma vez que o ruído da rede (60 Hz) tem influência nos circuitos amplificadores (figura 27).



Figura 29 - Gaiola de Faraday construída para realização dos procedimentos estereotáxicos e de medições de concentração de neurotransmissores *in vitro* e *in vivo* – no detalhe a conexão de cabo de aterramento que segue à área externa para ligação às hastes tipo cooperweld.

Fonte: Autoria Própria.

4.6 BOMBAS DE INFUSÃO

Para obter um controle de concentração de dopamina duas bombas de infusão foram utilizadas com seringas com capacidade de 30 ml: uma contendo solução salina (0,9% de concentração de NaCl) e outra contendo dopamina (10 $\mu\text{mol/l}$). Estas duas soluções são então misturadas de maneira a se obter a concentração desejada que é previamente ajustada no software. A Tabela 3 mostra as taxas de fluxo calibrado das bombas de infusão.

Tabela 3 - Fluxo das bombas de Infusão.

Velocidade	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fluxo ml.min ⁻¹	0	0,25	0,55	0,81	1,15	1,45	1,89	2,31	2,70	3,05

Fonte: Autoria Própria.

O comando para aumentar ou diminuir a taxa de fluxo vem por sinal Bluetooth a partir do computador (equipado com uma programação de controle em LabView) chegando em MCU1 que tem as funções de comunicação sem fio, FSCV, e comunicação com fio. Em seguida, MCU1 comunica-se serialmente por fios informando a MCU 2 os comandos que devem ser enviados aos controladores de motores de passo. A comunicação entre MCU 2 e MCU 3 é realizada utilizando uma ligação por infravermelho para assegurar que os motores das bombas não introduzam ruído no sinal medido. O valor da taxa de fluxo de cada uma das bombas foi controlado por um microcontrolador (MCU3 e MCU4) cada um deles ligado a um amplificador de potência de corrente para alimentar os motores de passo das bombas de infusão (Insight, Brasil). Observa-se que a célula de fluxo contínuo (onde está contido o CFM) foi montada no interior de uma gaiola de Faraday – Figuras 30, 31 e 32 - (ARAÚJO et al., 2015). Os *firmwares* de MCU 1, 2, 3 e 4 seguem nos apêndices A, B, C e D.

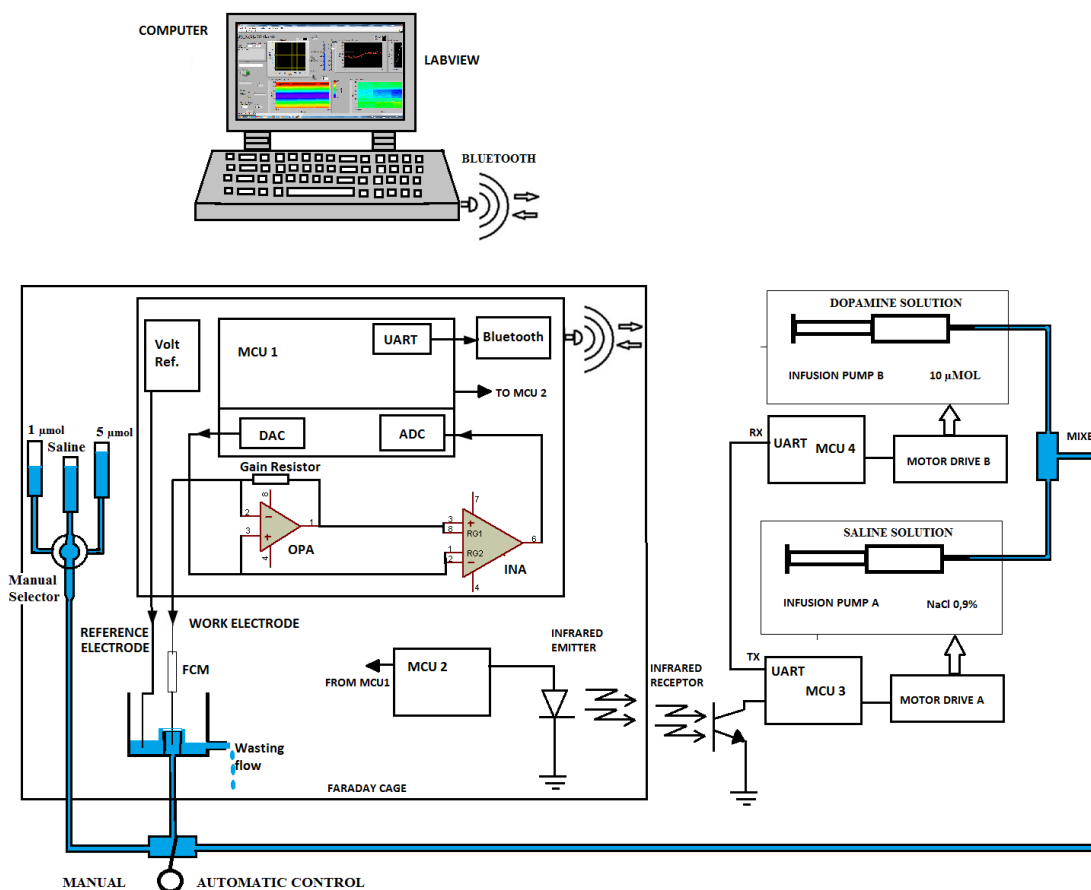


Figura 30 - Diagrama esquemático do sistema para controle em malha fechada controlando bombas de infusão. “Volt Ref.” é a tensão de referência, MCU – Microcontroller Unit, DAC – Digital to Analog Converter, ADC - Analog to Digital Converter, FCM – Micro Fiber Carbon, UART Universal asynchronous receiver/transmitter.

Fonte: Autoria própria.



Figura 31 - MCU 3 e MCU 4 com reguladores de tensão e *drivers* de potência para acionamento das bombas de infusão.

Fonte: Autoria própria.



Figura 32 - Equipamentos no laboratório de farmacologia da UFPR.

Fonte: Autoria própria.

4.7 SOFTWARE DE AQUISIÇÃO

A aquisição de dados é feita por comunicação serial onde o usuário configura velocidade de comunicação, taxa de transmissão, número da porta, etc. Uma Função de Detecção de Padrão (Labview) é utilizada para selecionar os valores de corrente transmitidos se referindo ao número da leitura (são realizadas 120 leituras por período, levando 9 ms na aquisição seguidos de um período de transmissão de 300ms) - figura 33. A cada período de 15 segundos os dados são salvos em arquivo na pasta especificada pelo usuário.

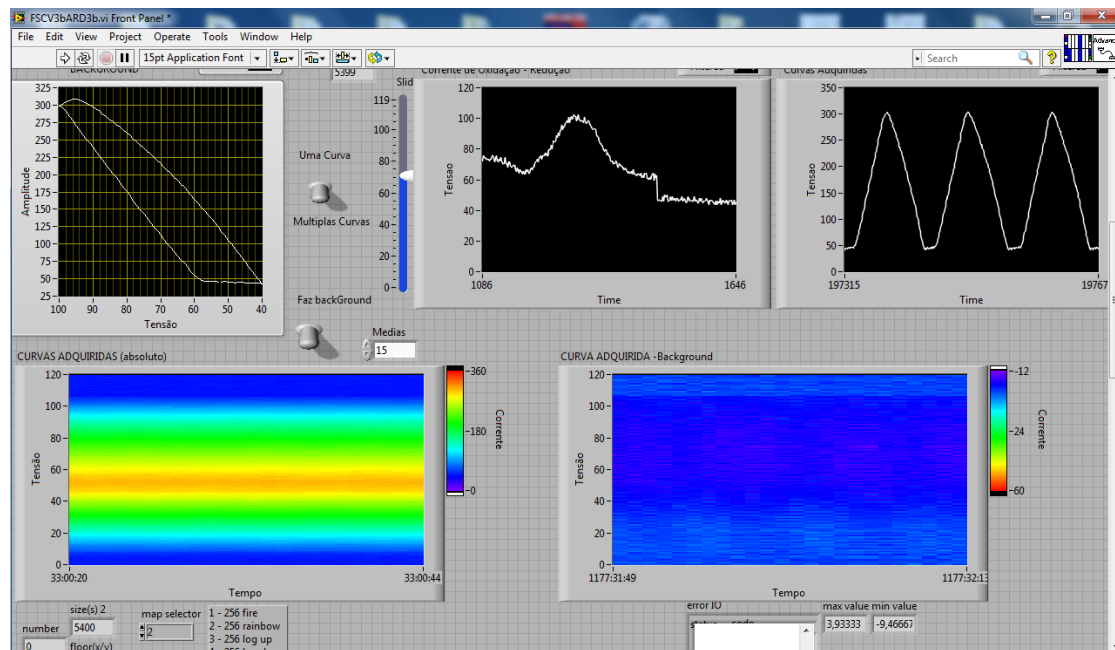


Figura 33 - Software de aquisição: no alto da esquerda para direita: Voltamograma de corrente de *Background* em função da tensão aplicada, Corrente de oxidação (na tensão de 700mV) para solução salina começando em 20 $\mu\text{mol/L}$ (linha de base), subindo para 40 $\mu\text{mol/L}$ de dopamina (primeiro pico) caindo a zero na sequência, e gráfico de correntes em função do tempo durante as voltametrias cíclicas. Em baixo: Gráfico 3D colorimétrico total e por último Gráfico 3D colorimétrico final.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 34 é parte da programação gráfica que mostra as partes principais da funções para a atuação das bombas de infusão, incluindo o modo de controle se manual ou automático (A), o ajuste de tempo de resposta do processo entre 1 e 90 segundos (B), O controle dos bytes de saída sendo “d” para descer a velocidade das bombas e “s” para subir (C), gráfico de concentração de saída (D), e o comparador que recebe os valores de dados crus já subtraídos do *background* (E).

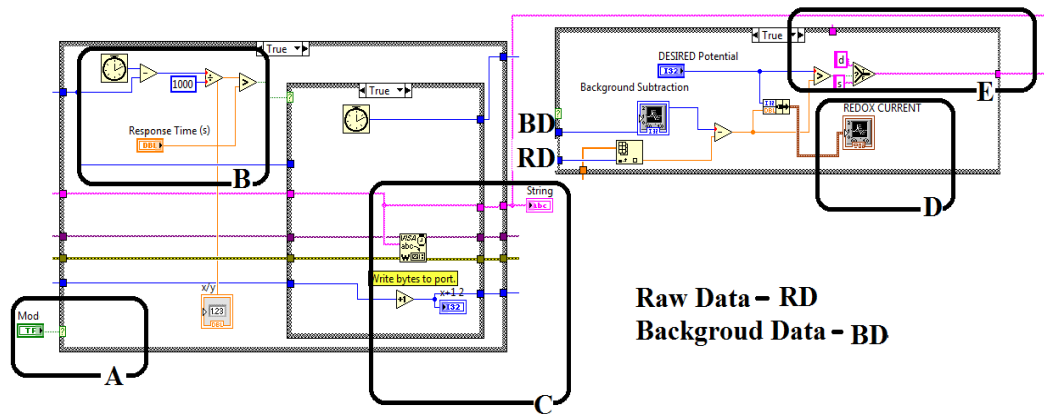


Figura 34 - Controle manual ou automático (A), ajuste de tempo de resposta do processo (B), controle dos bytes de saída para a velocidade das bombas (C), gráfico de concentração (D), comparador que recebe os valores de dados crus já subtraídos do *background* (E).

Fonte: Autoria própria.

4.8 SOFTWARE DE LEITURA

O *software* de leitura permite escolher o arquivo e selecionar a referência de leitura (o número da leitura realizada) para ser utilizada pelo programa. A partir deste ponto o voltamograma gerado é calculado pelo número de médias especificadas pelo usuário. Este procedimento gera o gráfico correspondente ao voltamograma de *background*. Esta corrente de fundo precisa ser retirada da medição. Feito isto o usuário seleciona a leitura, posterior ao tempo de *background*, desejada a ser analisada. O software então gera o voltamograma final que corresponde ao voltamograma de leitura menos o voltamograma de *background* médio (corrente devido a capacitância do eletrodo) (Figura 35). O *software* de leitura encontra-se no apêndice E.

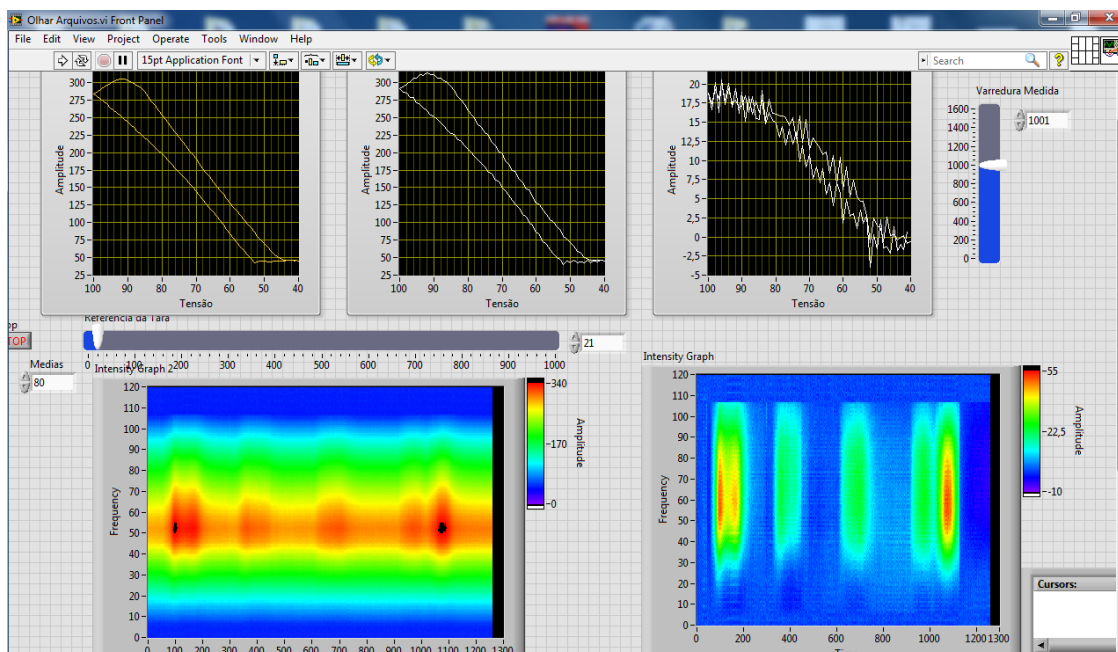


Figura 35- Em cima da esquerda para a direita: voltamograma da corrente de *background*, voltamograma em análise corrente e voltamograma final. Em baixo: gráficos tridimensionais total e final.

Fonte: Autoria própria.

4.9 CONCLUSÃO

Utilizando-se microcontroladores de baixo custo e um software flexível com muitas possibilidades de programação obteve-se uma apresentação gráfica de boa qualidade mostrando o processo de medição e um controle simples por meio da interface. A possibilidade de controle em modo automático ou manual será apresentada no capítulo 5 e vem demonstrar a simplicidade da interface. Por outro lado a necessidade de uma gaiola de Faraday é um fator limitador da aplicação do sistema.

CAPÍTULO 5

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DE MEDIÇÃO DE DOPAMINA *IN VITRO* POR FSCV

A figura 36 refere-se a diferentes voltamogramas obtidos com o protótipo FSCV. As diferentes soluções de dopamina são injetadas numa célula de fluxo preenchida inicialmente com solução salina. A sensibilidade estimada do eletrodo foi de 5 a 6 nA. μMol^{-1} .l (valor coerente aos eletrodos comerciais) e a corrente de *background* alcança um pico de 1220 nA.

A Figura 37 mostra o gráfico para duas concentrações diferentes de DA durante procedimento de calibração manual do sistema. Inicialmente, uma solução salina está preenchendo a célula de fluxo contínuo. Em seguida, durante 30 s uma solução de dopamina com concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ é injetado no sistema. Novamente durante 30 s ocorre a substituição completa da solução apenas por solução salina somente por atuação da força da gravidade devido às condições hidráulicas da célula. Na sequência a célula CFI é preenchida com solução de DA (5 $\mu\text{mol/L}$), e, finalmente, com solução salina novamente.

A representação dos laços de voltametria no modo tridimensional permite visualizar com clareza a injeção de fluxos de diferentes concentrações de neurotransmissor. As Figuras 38 e 39 ilustram em três dimensões a injeção de concentrações de dopamina com os picos e vales característicos da oxirredução da dopamina ocorrendo em valores próximos a + 0,7 e - 0,2 Volts.

Concentração de DA - Como já sabido as correntes de Oxidação tem picos característicos na tensão de 700 mV para DA. Evidentemente que existem variações em torno deste valor e, sabendo disso, programou-se no ambiente Labview uma função contendo um *slider* para seleção da tensão mais

adequada na faixa que interessa ser monitorada gerando desta maneira um gráfico que apresenta as correntes no potencial desejado (Figuras 36 e 37).

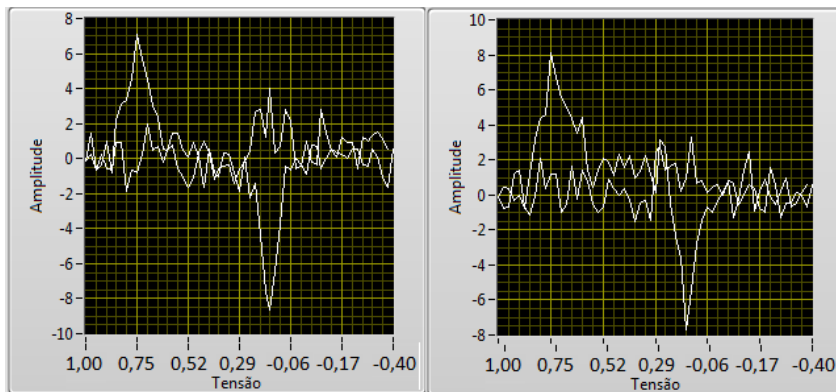


Figura 36 - Voltamogramas típicos de dopamina na concentração de 10 μmol . Na vertical a corrente medida em nA. Na horizontal a tensão aplicada ao eletrodo em Volts.

Fonte: Autoria própria.

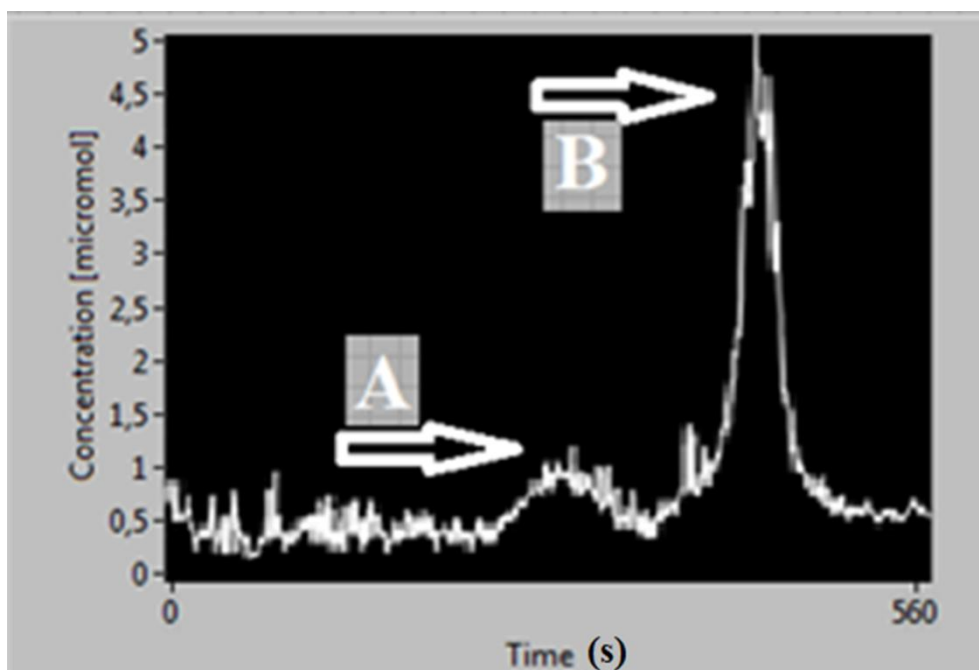


Figura 37 - Corrente medida na tensão de oxidação de 700 mV para concentrações de 1 $\mu\text{mol/L}$ e 5 $\mu\text{mol/L}$.

Fonte: Autoria própria.

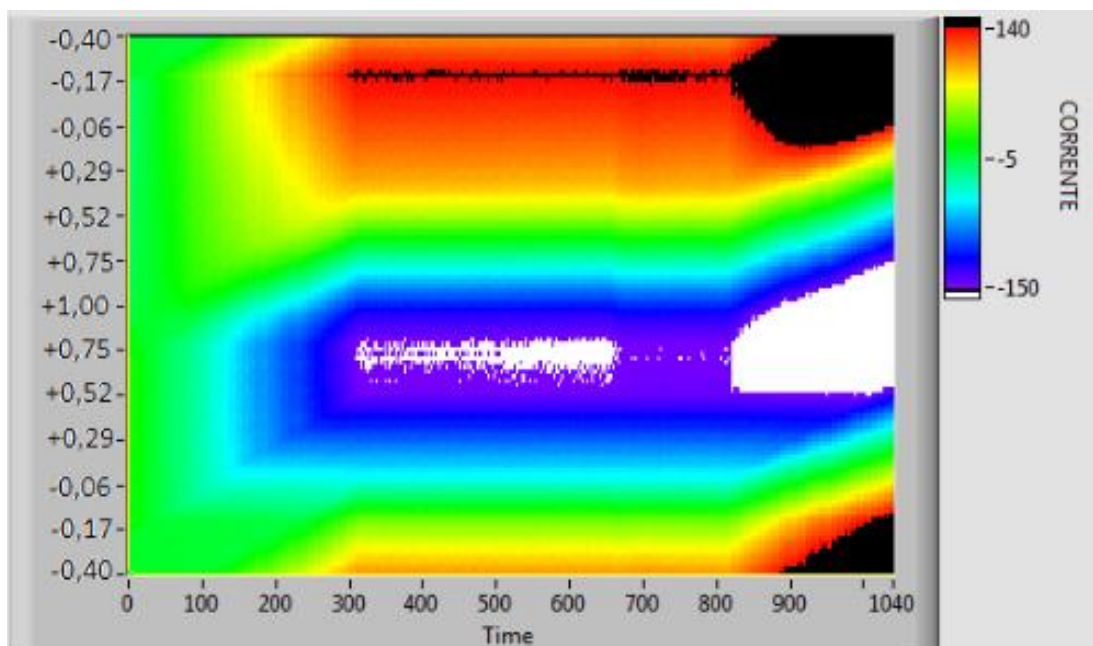


Figura 38 - Voltametria tridimensional com a tensão em volts nas ordenadas e o número das varreduras nas abcissas. As correntes são representadas por cores e estão em nA. Neste experimento o sistema está controlando automaticamente a concentração de dopamina entre o tempo 200 e 800 aproximadamente.

Fonte: Autoria própria.

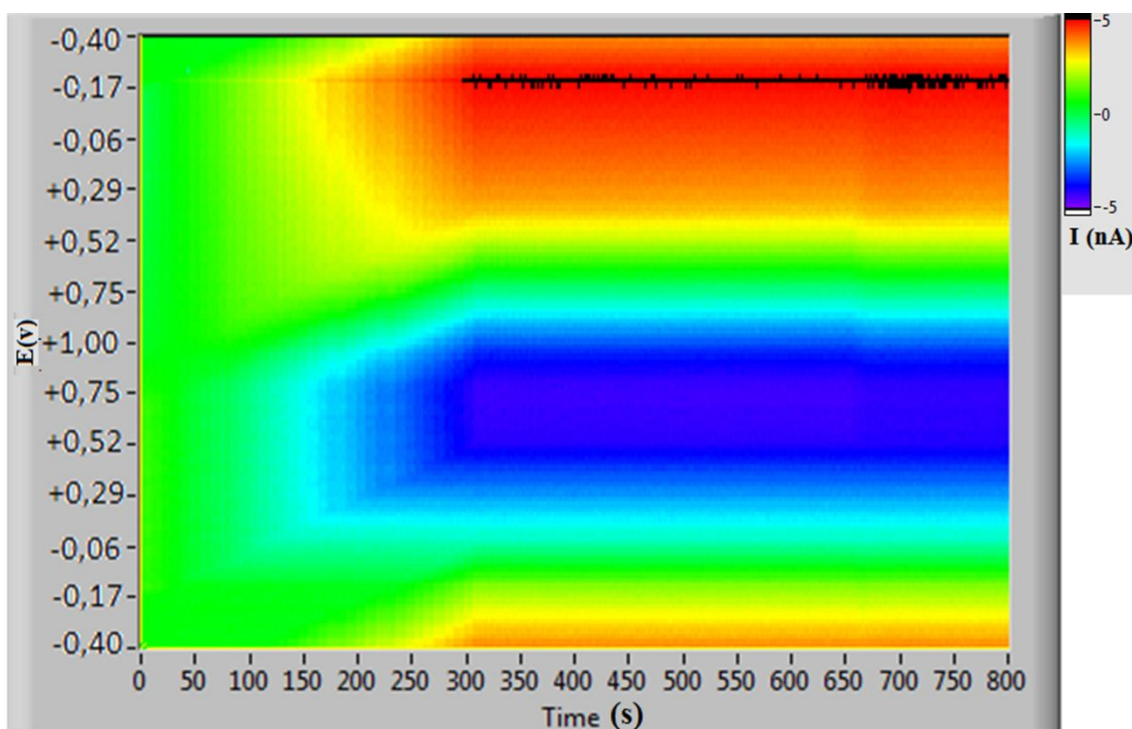


Figura 39 - Voltametria tridimensional com a tensão em volts nas ordenadas e o número das varreduras nas abcissas. As correntes são representadas por cores e estão em nA.

Fonte: Autoria própria.

5.2 CONTROLE DE BOMBAS DE INFUSÃO EM MALHA FECHADA

A Figura 40 mostra a tela de controle onde a concentração desejada de dopamina estava inicialmente acima de 3 $\mu\text{mol/L}$ sendo ajustada aproximadamente em 2,7 $\mu\text{mol/L}$. A figura foi capturada durante a leitura, portanto dinamicamente.

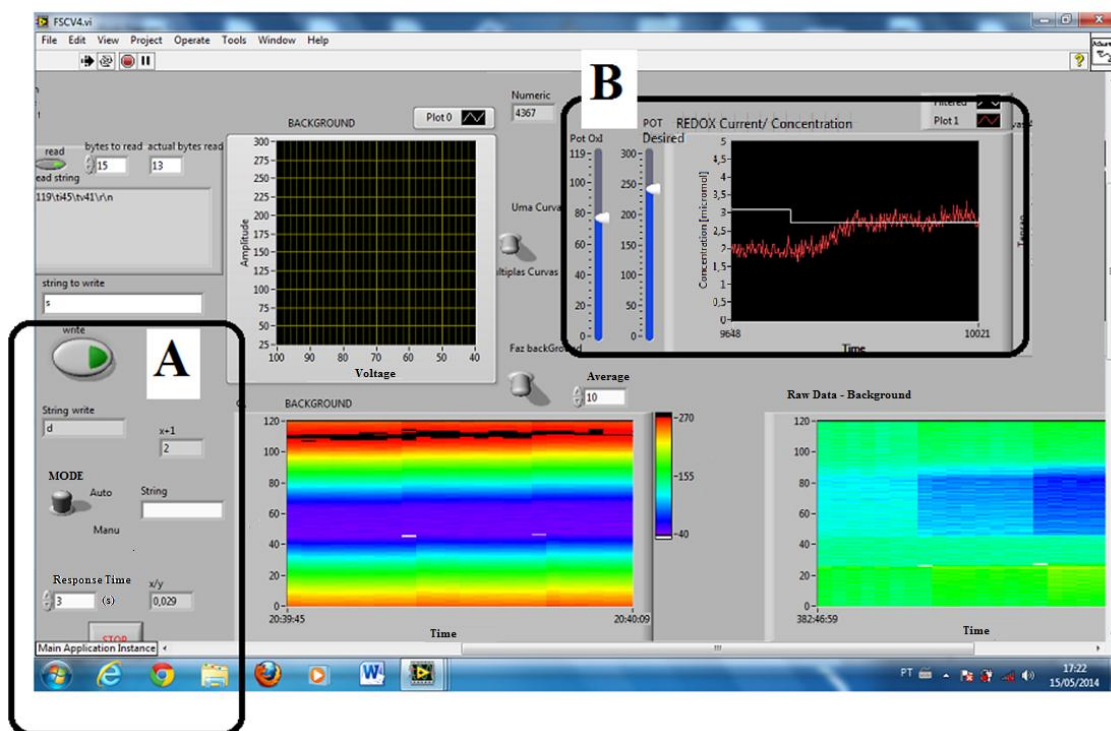


Figura 40 - A interface gráfica do usuário (GUI), onde em A: o usuário seleciona o manual (manu) ou controle de malha fechada (auto) usando o botão MODE, e em B o usuário seleciona a corrente de oxidação usando um controle deslizante. Também em B a (linha branca), selecionados e medidos (linha vermelha), os valores de concentrações são exibidos. Observar que logo acima da região 'A' há uma "sequência de caracteres para escrever", que o pesquisador pode usar para ligar estimuladores como um DBS ou uma TMS.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 41 mostra, numa sequência de imagens, uma experiência na qual, a partir de 5 $\mu\text{mol/L}$, a concentração de DA foi ajustada automaticamente para um novo valor de 7 $\mu\text{mol/L}$. A linha branca indica a concentração DA selecionada e linha vermelha a medida. O sistema executa três medições por segundo e envia sinais de controle para as bombas de infusão para ajustar a

concentração de DA no interior da célula CFI. Observa-se que a concentração é controlada dinamicamente ($7 \pm 0,8 \mu\text{mol/L}$) com um período de oscilação de aproximadamente 80 s.

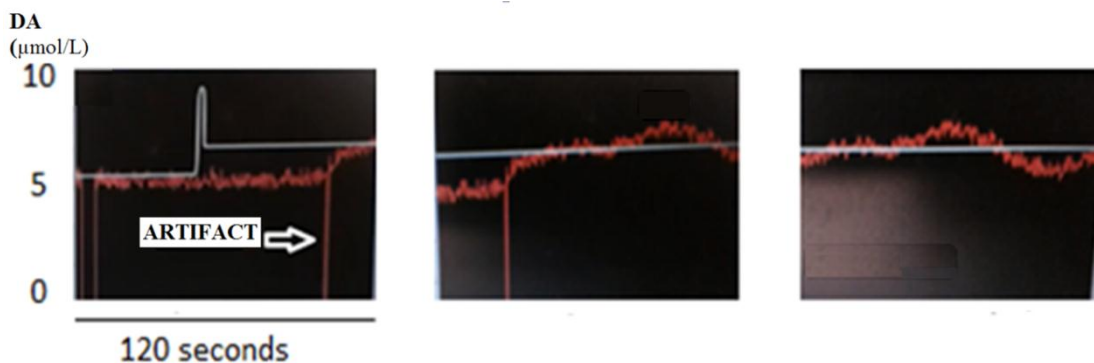


Figura 41 - Sequência de uma filmagem mostrando o controle automático da concentração de dopamina em torno do valor selecionado (aproximadamente $7 \mu\text{mol/L}$) Este e outro experimento em <https://www.youtube.com/watch?v=e9qt4eOcZmU> <https://www.youtube.com/watch?v=tVUgP1jjZiw> .

Fonte: Autoria própria.

5.3 RESULTADOS DE ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA

A figura 42 ilustra a corrente medida no eletrodo agudo aplicado ao núcleo accumbens, no estriado, com aquisição do sinal enquanto foram realizados estímulos com o protótipo DBS. O primeiro pulso empregou corrente de $300 \mu\text{A}$ diretamente no núcleo subtalâmico. O segundo pulso foi realizado com $500 \mu\text{A}$.

Uma coleta de dados de voltametria com o sistema Wireless Instantaneous Neurotransmitter Concentration - Wincs (SHON, 2010) também foi realizada durante a cirurgia com estimulação no núcleo subtalâmico em dois ratos com o protótipo DBS. A figura 43 ilustra o aumento da concentração da dopamina no estriado de um deles.

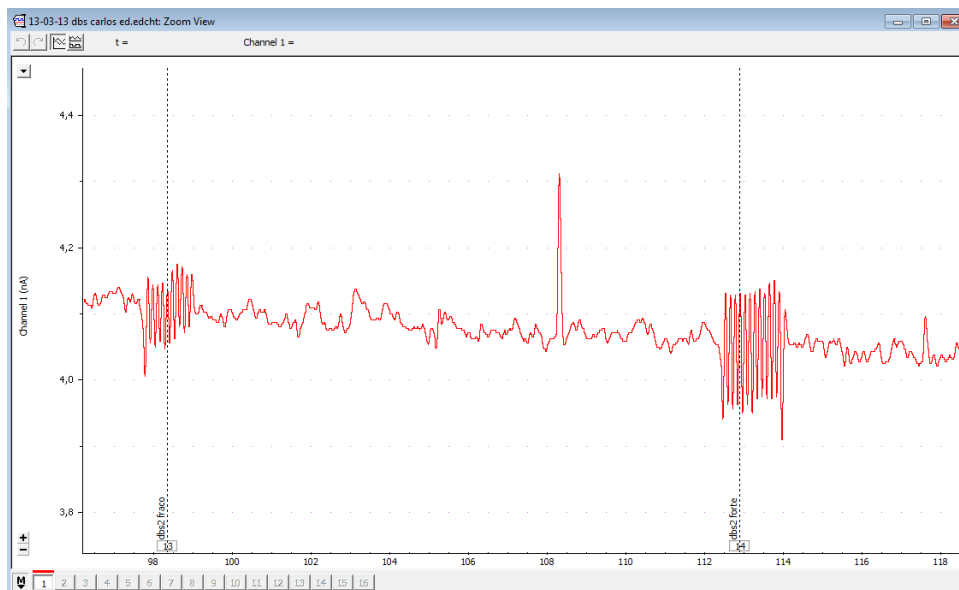


Figura 42 - Corrente medida no estriado durante DBS realizadas pelo protótipo (frequência de estimulação de 10 Hz). Escala de corrente em nA.

Fonte: Autoria própria.

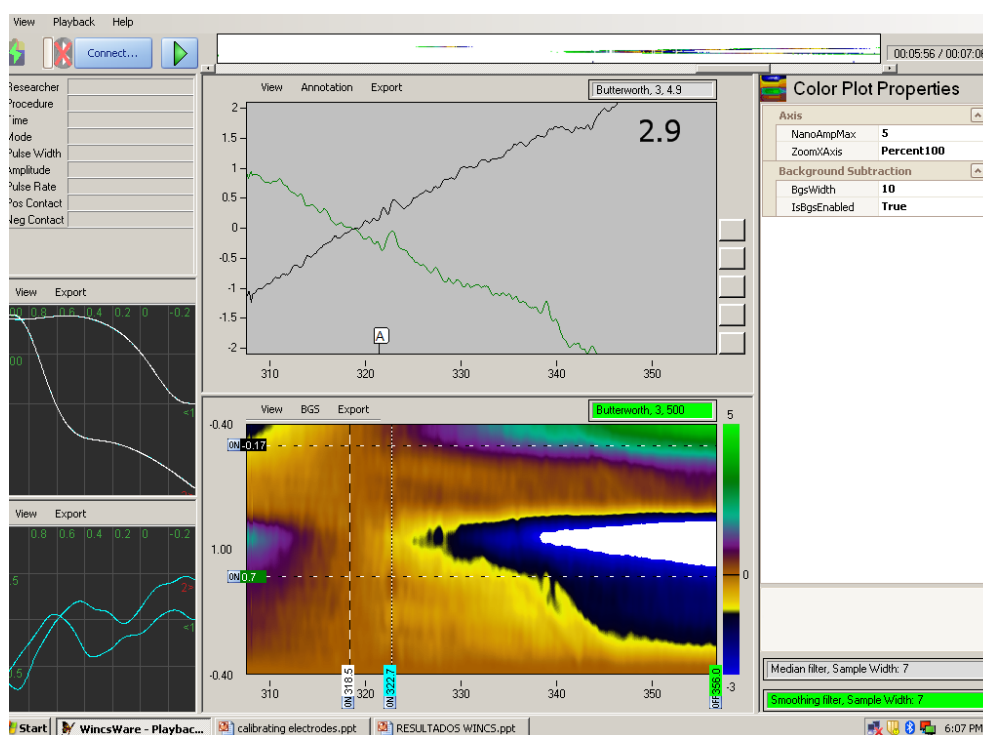


Figura 43 - Voltametria no NAc resultante da estimulação do núcleo subtalâmico com o protótipo DBS.

Fonte: Autoria própria.

5.4 RESULTADOS DE ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA TRANSCRANIANA

O equipamento de TMS foi utilizado em 3 animais com implantes de FSCV que estavam recuperados da cirurgia e encontravam-se em caixa de esQUIVA.

A figura 44 mostra as curvas de corrente de oxidação e redução bem como o gráfico colorimétrico de correntes de voltametria, onde visualiza-se neste experimento em particular um pulso no tempo 1800 (este registro é feito contando o tempo em segundos).

Estes resultados demonstraram a indução de correntes elétricas no córtex dos animais, porém, houve muita perturbação eletromagnética no dispositivo FSCV.

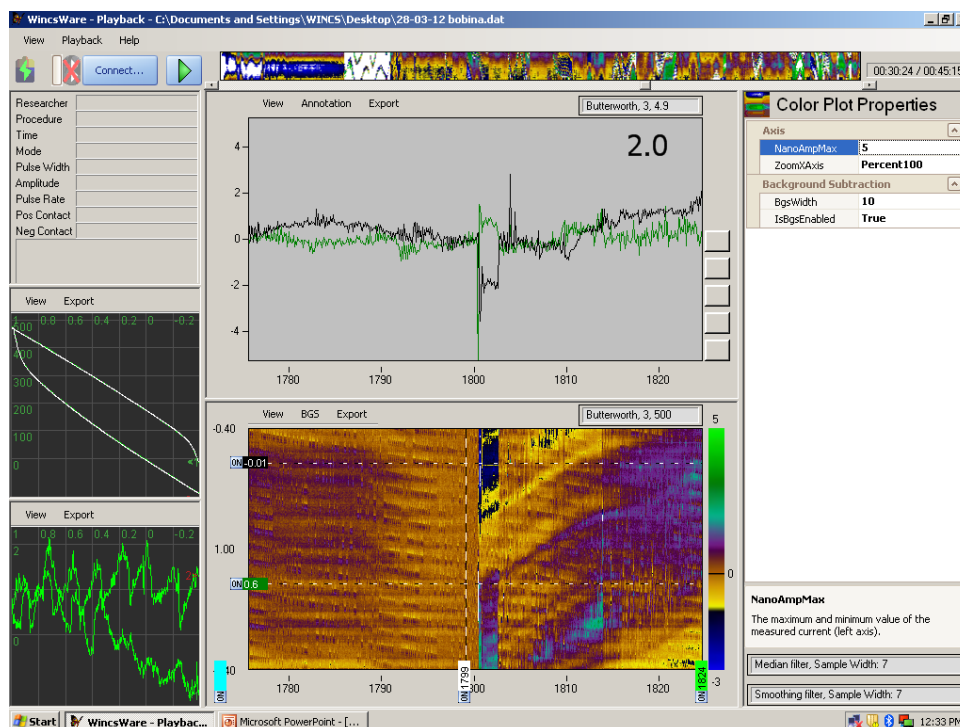


Figura 44 - Voltametria cíclica durante estimulação magnética transcranial.

Fonte: Autoria própria.

5.5 CONCLUSÕES

No que se relaciona a DBS pode-se verificar a resposta tanto pela técnica de amperometria como pela voltametria cíclica, confirmando vários estudos que já demonstravam que estímulos no NST provocam respostas dos neurônios dopaminérgicos no estriado (AGNESI et al., 2009).

A TMS parece ter afetado a concentração de dopamina, mas pela figura 44, a voltametria obtida não permitiu caracterizar a substância como dopamina. Além disso, o impulso magnético, por ser bastante elevado, induz correntes nos condutores elétricos do sistema que perturbam por vários segundos a aquisição de dados o que diminui a certeza sobre a alteração dopaminérgica neste intervalo de tempo. Talvez uma mudança posterior possa ser verificada, por meio de sintomas visíveis como, por exemplo, na diminuição das rotações induzidas em modelos animais com DP.

Um dos problemas encontrados neste método é o mesmo do método de eletroestimulações transcutâneas - TENS, ou seja, um grupo muito grande de neurônios pode ser ativado devido a falta de seletividade do sistema. Uma das vantagens é a não contaminação biológica e conservação do tecido uma vez que não há contato físico entre o estimulador e o sistema nervoso.

Realizar um controle em malha fechada utilizando TMS e FSCV demonstrou ser mais difícil do que o conjunto composto por DBS + FSCV. Isso se deve ao fato de que a TMS gera instabilidade no circuito de FSCV.

Um controle em malha fechada pode ser realizado com a DBS, mas teriam que ser utilizados um número mínimo de animais lesionados na substância negra para o modelamento da doença de Parkinson. Como o desenvolvimento principal é na área de engenharia e seria muito maior a necessidade clínica e veterinária (cuidados diários com os animais) optou-se pelo controle das bombas de infusão por sua rápida resposta dentro de valores próximos aos fisiológicos e sem a necessidade da utilização de animais.

A estratégia de medição utilizada neste trabalho foi utilizar a corrente de oxidação da dopamina que tem o seu valor máximo característico ocorrendo a

700 mV. O sistema tem flexibilidade suficiente para permitir medições de correntes em qualquer valor da tensão dentro da gama de FSCV (entre -0,4 e 1,0 Volts) o que também permite a pesquisa para os picos característicos de outras substâncias e neurotransmissores.

Um sistema com possibilidade de aplicação em malha fechada foi portanto construído e avaliado. Demonstrou-se que tanto a DBS, como a Infusão, quanto a FSCV estão funcionando dentro do proposto.

No que se refere a FSCV os gráficos de voltametria demonstram picos característicos da substância utilizada.

Ainda, o sistema é capaz de analisar outras substâncias neurotransmissoras ou não e mensurar os valores de suas concentrações interferindo automaticamente se desejado.

Capítulo 6

6 CONCLUSÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO E PROPOSTA DE CONTINUIDADE

Apesar de concebido para controlar a concentração de DA, o sistema desenvolvido pode ser utilizado para controlar, dentro das várias tensões necessárias e possíveis em voltametria de FSCV, a concentração de outras substâncias ou para ligar estimuladores cerebrais. Estes resultados indicam que o sistema pode ser utilizado em estudos clínicos empregando animais (*in vivo*).

Um protótipo de interface cérebro máquina implantável foi desenvolvido provido de sensores de voltametria, telemetria sem fio e possibilidades de parametrização por programação automática em firmware e software. O sistema vem a ser um implante neural controlador em malha fechada servindo para estudos neurológicos bem como interações do sistema nervoso com drogas. Devido a simplicidade e baixo custo do sistema, pesquisadores de farmacologia, neurologia e psiquiatria podem realizar experimentos crônicos e agudos em animais acordados ou sob efeito de anestesia.

Apesar do aspecto inovador no controle em malha fechada de estimulação cerebral profunda monitorando a concentração de dopamina, a técnica desenvolvida apresenta muitas dificuldades entre elas:

- Ser muito invasiva;
- Ter muita suscetibilidade a ruídos, haja vista a necessidade de gaiola de Faraday;
- Utilizar eletrodos de fibra de carbono muito frágeis que comumente quebram durante a cirurgia;

Quando substituída a DBS pela TMS são aumentados os efeitos de indução eletromagnética no circuito eletrônico e com isto o circuito de FSCV torna-se instável por alguns segundos após a aplicação do pulso.

O desenvolvimento do software na plataforma Labview, para visualização dos dados, de maneira síncrona aos eventos correntes nos experimentos, facilitou a utilização do dispositivo empregando as bombas de infusão e sua flexibilidade é tal que pode-se utilizar DBS, TMS e outras técnicas de estimulação como luzes, sons, etc.

Também um sistema em circuito fechado para controlar a concentração de DA dinamicamente dentro da célula de fluxo contínuo foi descrito. O sistema desenvolvido permite medições de concentração de DA bem como controle de DA para valores selecionados entre 1 e 10 $\mu\text{mol/L}$, com controle automático com erro dentro de um intervalo de $\pm 0,8 \mu\text{mol/L}$, apresentando um período de oscilação de cerca de 80 s. A resolução do sistema é de cerca de 0,4 $\mu\text{mol/L}$ para soluções de dopamina. No entanto, se necessário, pode ser aumentada esta resolução (visando utilização dentro de valores fisiológicos) alterando o ganho do conversor de corrente para tensão no amplificador operacional.

Finalmente, propõe-se a continuidade do desenvolvimento em malha fechada com FSCV e DBS (ou TMS, ou Infusão) utilizando-se de modelos animais parkinsonianos. O sistema pode ser realizado com utilização de computador externo ou com o uso de um microcontrolador com grande capacidade de processamento devido a necessidade de realização de muitas tarefas simultâneas envolvendo cálculos, armazenamento de dados, comunicações, entre outras funções analógicas e digitais - figura 45.

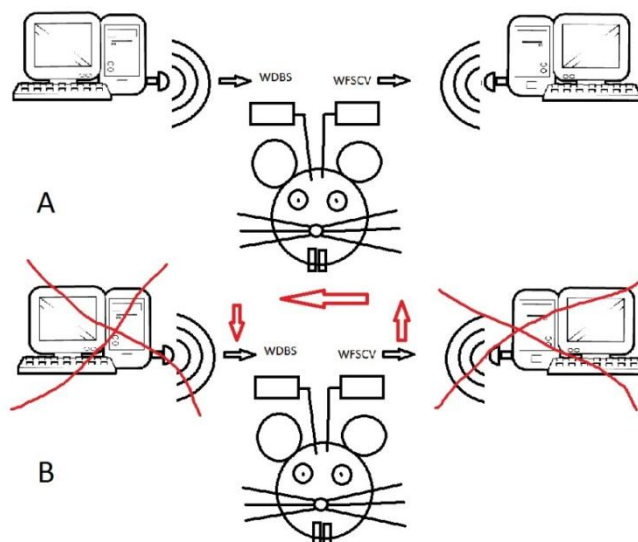


Figura 45 - Concepção do sistema sem fio de estimulação cerebral profunda - WDBS e de voltametria cíclica de varredura rápida sem fio - WFSCV. Em A: Controle em malha fechada externo via PC. Em B: controle realizado no próprio microcontrolador.

Fonte: Autoria própria.

REFERÊNCIAS

ABATTI, P.J.; ARAUJO, C.E. **Estimulação seletiva de neurônio por bobina implantável**. CBEB2012: Proceedings of the XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica; 2012 Oct 01-05; Porto de Galinhas, PE, Brazil. P. 850-3, 2012.

ABATTI, P. J.; ARAUJO, C. E.; DA CUNHA, C.; GOMEZ, A.; DOMBROWOSKI, P. A. **Instrumentação eletrônica para neuroquímica e estimulação cerebral**. CBEB2014: Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica; V.1 p. 640-4.; Uberlândia, MG, Brazil. 2014.

ABATTI, P. J.; PICHORIM, S. F.; SCHENEIDER, B. **A method to derive mutual inductance properties using electric circuit analysis tools**. International Journal of Electrical Engineering Education. Vol 45, p 46-50, jan. 2008.

ALEXANDER, C. K.; SADIKU, M. N. O. **Fundamentos de Circuitos Elétricos**. Editora Bookman, 2003.

ARAUJO, C. E.; ABATTI P. J.; DA CUNHA, C.; GOMEZ, A.; DOMBROWOSKI P. A. **In vitro evaluation of a closed-loop feedback system for dopamine concentration control**. Research on Biomedical Engineering; 2015. V. 31 Issue 1, Brazil. dx.doi.org/10.1590/2446-4740.0653.

AGNESI, F.; TYE, S. J.; BLEDSOE, J. M; GRIESSENAUER, C. J.; KIMBLE, C. J.; SIECK, G. C.; BENNET, K. E.; GARRIS, P. A.; BLAHA, C. D.; LEE K. H. **Wireless instantaneous neurotransmitter concentration system-based amperometric detection of dopamine, adenosine, and glutamate for intraoperative neurochemical monitoring**. J. Neurosurg. 111, 701–711. doi: 10.3171/2009.3.JNS0990, 2009.

ATMEL, **Datasheet do microcontrolador ATMEGA 328**. Disponível em: <http://www.atmel.com/Images/doc8161.pdf>. Acesso: 10 fev. 2010.

BARKER, A. T.; GARNHAM, C. W.; FREESTON, I. L. **Magnetic nerve stimulation: the effect of waveform on efficiency, determination of neural membrane time constants and the measurement of stimulator output.** Electroencephalogram Clin. Neurophysiol. Supply, vol. 43, pp.227-37, 1991

BARKER, A,T; FREESTON, I.L. **Medical applications of electric and magnetic fields.** Electron. Power 31:(10) 757-60 - 1985.

BASSER, P. J.; **Focal magnetic stimulation of an axon.** National cent. res. resources, biomedical eng. instrumentation program, Bethesda MD 20892, IEEE transactions on biomedical engineering CODEN IEBEAX 1994, vol. 41, no6, pp. 601-606

BASTOS, J. P. A. **Eletromagnetismo para Engenharia Elétrica** 2a edição, Editora da UFSC, 2008.

BASU, I.; TUNINETTI, D.; GRAUPE, D.; SLAVIN, K. V. **Adaptive control of deep brain stimulator for essential tremor: entropy-based tremor prediction using surface-EMG.** In: Annual International Conference of the IEEE p. 7711-4. Boston, Massachusetts USA, 2011.

BENABID, A. L., POLLAK P, LOUVEAU A, HENRY S, DE ROUGEMONT J.; **Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the vim thalamic nucleus for bilateral parkinson disease.** Appl. Neurophysiol., vol. 50, no. 1–6, pp. 344–346, 1987.

BENABID AL, KRACK P, BENAZZOUZ A, LIMOUSIN P, KOUDSIE A, POLLAK P. **Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for Parkinson's disease: methodologic aspects and clinical criteria.** Neurology, 55 (Suppl 6):40-44. 2000.

BERGER, W. B.; GERHARDT, G.; LIKER, M. A.; SOUSSOU, W. **The Impact of Neurotechnology on Rehabilitation Theodore.** IEEE REVIEWS IN BIOMEDICAL ENGINEERING, VOL. 1, p157, 2008.

BURR BROWN, **Datasheet do amplificador operacional OPA2340.** Disponível em: < <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/opa340.pdf> >. Acesso: 20 dez. 2010 (a).

BURR BROWN, **Datasheet do amplificador de instrumentação INA 2132.** Disponível em: <http://www.ti.com.cn/cn/lit/ds/symlink/ina2132.pdf>. Acesso: 14 dez. 2010 (b).

CHEN, Y.; HAO, H. W.; HU, Y. X.; LI, L. M. **Wireless wrist-wearable wake/sleep identification device for closed-loop deep brain stimulation.** Electronics Letters P.49 (7), 2013.

DA CUNHA, C.; DOMBROWSKI, P. A.; CARVALHO, M. C.; MIYOSHI, E.; CORREIA, D.; BORTOLANZA, M.; DOS SANTOS, L. M.; WIETZIKOSKI, E. C.; ECKART, M. T.; SCHWARTING, R. K. W.; BRANDAO, M. L. **Microdialysis study of striatal dopamine in MPTP-hemilesioned rats challenged with apomorphine and amphetamine.** Behavioural Brain Research, v.215, p.63-70. 2010.

DENISON, T.; CSAVOY, A.; MOLNAR, G. **Creating Support Circuits for the Nervous System: Considerations for “Brain-Machine” Interfacing.** Symposium on VLSI Circuits Digest of Technical Papers 978-4-86348-010-0 - 2009.

DOMBROWSKI, P. A.; MAIA, T. V.; BOSCHEN, S. L.; BORTOLANZA, M.; WENDLER, E.; SCHWARTING, R. K. W.; BRANDÃO, M. L.; WINN, P.; BLAHA, DA CUNHA, C. **Evidence that conditioned avoidance responses are reinforced by positive prediction errors signaled by tonic striatal dopamine.** Behavioral Brain Research, v.241, p. 112-119, 2013.

FRIEHS, G. M.; CARPENTER L.; TYRKA A, MALONE D.; REZAI A.; SHAPIRA N. A.; OKUN M.; FOOTE K.; GOODMAN W.; RASMUSSEN S. A. **Deep brain stimulation: Clinical findings in intractable depression and Obsessive-Compulsive Disorder and Major Depression.** 10th Annu. Conf. Int. FES Soc., Montreal, Canada, July 2005.

GARRIS Paul A.; ENSMAN, Robert.; POEHLMAN, John; ALEXANDER, Andy; LANGLEY, Paul E.; SANDBERG, Stefan G.; GRECO, Phillip, G. R.; WIGHTMAN, Mark George; REBEC, V. **Wireless transmission of fast-scan cyclic voltammetry at a carbon-fiber microelectrode: proof of principle.** P. 103-115 in Journal of Neuroscience Methods Volume 140, 10th International

Conference on In Vivo Methods: Monitoring Molecules in Neuroscience
Stockholm, Sweden - 2004.

GARRIS, P.A.; GRECO, P.G.; SANDBERG, S.G.; HOWES, G.;
PONGMAYTEGUL, S.; HEIDENREICH, B.A.; CASTO, J.M.; ENSMAN, R.;
POEHLMAN, J.; ALEXANDER, A.; REBEC, G. V. **In Vivo Voltammetry with
Telemetry**. In *Electrochemical Methods for Neuroscience*. University of
Pittsburgh, Pennsylvania Boca Raton (FL): CRC Press 2007.

GEDDES, L. A.; BAKER, L. E. **Principles of Biomedical Instrumentation**, 3^a
ed. Nova York: Wiley, 1989.

GERMANO, I. M. **Chronic deep brain stimulation: indications and
techniques**. In **Neurosurgical treatment of movement disorders**.
Neurosurgical topics of AANS Publications Committee, 1998.

GOLAN, D. E. **PRINCÍPIOS DE FARMACOLOGIA**. Segunda edição, Rio de
Janeiro - Guanabara Koogan, 2009.

GRONDIN, R.; GASH, D. M. **Glial cell line-derived neurotrophic factor
(GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease**. *Journal
of neurology*. 245(1):35-42, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 11 Ed
Philadelphia: Elsevier Inc. ISBN 0-7216-0240-1, 2006.

HAYT Jr. W. H; **Eletromagnetismo**. 3a edição. EDITORA LTC. Rio de Janeiro,
1983.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ J. H.; JESSEL T. M. **Principles of Neural
Science**. MCGraw Hill, New York, 2000.

KALIA, S. K.; SANKAR T.; LOZANO, A. M. **Deep brain stimulation for
Parkinson's disease and other movement disorders**. *Current Opinion in
Neurology*. 26(4):374-80, 2013.

KIMBLE C.J.; BLEDSOE, J.M.; BLAHA, C.D.; AGNESI, F.; MOHSENI, P.;
WHITLOCK, S.; JOHNSON, D.M.; HORNE, A; BENNET, K.E.; LEE, K.H.;
GARRIS, P.A.; **Development of the Wireless Instantaneous**

Neurotransmitter Concentration System for intraoperative neurochemical monitoring using fast-scan cyclic voltammetry. *J Neurosurg.* Oct; 111(4):712-23, 2009.

KRINGELBACH, M.L; AZIZ, T.Z. **Marca Passos Cerebrais, Doenças do Cérebro.** Coleção Mente Cérebro. p.60-65, 2012.

INVILOG disponível em: <http://www.invilog.com/products-services/carbon-fiber-electrodes-for-acute-experiments-and-for-chronic-implantation/carbon-fiber-electrodes-for-acute-experiments/> Acesso em 5 de fevereiro de 2013.

LEE J, RHEW HG, KIPKE DR, FLYNN MPA. **A 64 channel programmable closed-loop neurostimulator with 8 channel neural amplifier and logarithmic ADC.** *IEEE Journal of Solid State Circuits.* ; 45(9):1935-45, 2010.

LIKER, M. A.; WON, D. S.; RAO, V. Y.; HUA, S. E. **Deep brain stimulation: An evolving technology.** *Proc. IEEE.*, vol. 96, no. 7, pp. 1129–1141, Jul. 2008.

LOZANO, A. M.; DOSTROVSKY J.; CHEN, R., ASHBY, P. **Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption.** *The Lancet Neurology*, vol. 1, no. 4, pp. 225–231, 2002.

MALMIVUO, J.; PLONSEY, R. **Bioelectromagnetism: principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields.** Oxford University, Oxford 1995.

MICHAEL, A. C. **Electrochemical Methods for Neuroscience.** Frontiers in Neuroengineering. Borland. University of Pittsburgh, Pennsylvania. Boca Raton (FL): CRC Press; ISBN-10: 0-8493-4075-6 ISBN-13: 978-0-8493-4075-8, 2007.

MICROCHIP, **Datasheet do conversor digital analógico DAC MCP4725.** Disponível em: <http://ww1.microchip.com/downloads/en/devicedoc/51669a.pdf> Acesso: 8 fev. 2012.

MILLMAN, J. **Eletrônica - Dispositivos e Circuitos.** Mc GrawHill, Rio de Janeiro, 1981.

NILSSON, A.; RIEDEL, B. **Circuitos Elétricos.** Prentice Hall, 2009.

OBESO J.A.; LINAZADORO G.; GURIDI J.; RAMOS, E. **High frequency stimulation of the subthalamic nucleus and levodopa induced dyskinesias in Parkinson's disease.** J Neurol Neurosurg Psychiatry; 68:100-126, 2000.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press, Inc. 2005.

PLASTICS ONE disponível em: http://www.plastics1.com/Gallery-PRC.php?FILTER_CLEAR&FILTER_FCATEGORY=Electrophysiology

Acessado em 05 de fevereiro de 2013.

PLENZ, D.; KITAL, S. T. **A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus.** Nature, vol. 400, pp. 677–682, 1999.

POLLAK, P.; BENABID, A.; LIMOUSIN, P.; BENAZZOUZ, A. **Chronic intracerebral stimulation in Parkinson's disease: the basal ganglia and new surgical approaches for Parkinson's disease.** Adv. Neurology. 74:213-220, 1997.

POUSTINCHI M, MUSALLAM S. **Low power CMOS neurochemical biosensor application in an implantable intelligent neurotrophic factor delivery hybrid microsystem for Parkinson's.** In: Middle East Conference on Biomedical Engineering. P.131-4, 2014.

RASCOL O, LOZANO A, STERN M, POEWE W. **Milestones in Parkinson's disease therapeutics.** Movement disorders - Wiley Online Library. 26(1):1072-1082, 2011.

ROTENBERG, A.; MULLER, P.; BIRNBAUM, D.; HARRINGTON M.; RIVIELLO, J.; LEONE, A., JENSEN, F. **Seizure suppression by EEG-guided repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat;** Clin Neurophysiol. 2008; 119(12): 2697–2702, 2008.

SCHAPIRA, A.H.; JENNER P. **Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease.** Movement disorders - Wiley Online Library. 26(1):1049-1055, 2011.

SHANNON, R.V. - **A model of safe levels for electrical stimulation**. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol.39, n.4. 1992.

SHON, Y. M.; CHANG, S. Y.; TYE, S. J.; KIMBLE, C. J.; BENNET, K. E.; BLAHA, C. D. ; LEE, K. H. **Comonitoring of adenosine and dopamine using the wireless instantaneous neurotransmitter concentration system: Proof of principle**. J Neurosurg, v.112, p.539-48. 2010.

SPIEGEL, E.; WYCIS, H. **Methods and atlas of the human brain**. New York: Grune & Stratton, 1952.

SPIEGEL, E. A.; WYCIS H. T.; MARKS, M.; LEE A. J. **Stereotaxic apparatus for operations on the human brain**. Science, vol. 106, no. 2754, pp. 349–350, 1947.

STANSLASKI, S.; CONG, P.; CARLSON, D.; SANTA, W.; JENSEN, R.; MOLNAR, G.; MARKS, W.; SHAFQUAT, A.; DENISON , T. **An Implantable Bi-directional Brain-machine Interface System for Chronic Neuroprosthesis**. Research. N 5494 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS Minneapolis, Minnesota, USA, September 2-6, 2009.

STANSLASKI, S.; AFSHAR, P.; CONG, P.; GIFTAKIS, J.; STYPULKOWSKI, P.; CARLSON, D.; LINDE, D.; ULLESTAD, D.; AVESTRUZ, A. T.; DENISON, T. **Design and validation of a fully implantable, chronic, closed-loop neuromodulation device with concurrent sensing and stimulation**. IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering. 20(4):410-421, 2012.

TEXAS INSTRUMENTS, **Datasheet do módulo serial bluetooth**. Disponível em: <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/lmx9830.pdf>. Acesso: 14 mar. 2012 (a).

TEXAS INSTRUMENTS, **Datasheet do amplificador operacional LF 353**. Disponível em: <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/lf353-n.pdf>. Acesso: 14 mar. 2012 (b).

TEXAS INSTRUMENTS, **Datasheet do regulador e gerador de tensão DCP010515db**. Disponível em: <http://www.ti.com/product/dcp010515db>. Acesso: 14 mar. 2012 (c).

VOLKMANN, J.; ALBANESE, A.; ANTONINI, A.; CHAUDHURI, K.R.; CLARKE, C.E.; BIE, R.M.; DEUSCHL, G.; EGGERT, K.; HOUETO, J.C.; KULISEVSKY, J.; NYHOLM, D.; ODIN, P.; OSTERGAARD, K.; POEWE, W.; POLLAK, P.; RABEY, J.M.; RASCOL, O.; RUZICKA, E.; SAMUEL, M.; SPEELMAN, H.; SYDOW, O.; VALLDEORIOLA, F.; LINDEN, C.; OERTE, W. **Selecting deep brain stimulation or infusion therapies in advanced Parkinson's disease: an evidence-based review.** Journal of Neurology. 260:2701-14, 2013.

WANG, Joseph. **Analytical Electrochemistry.** Second Edition. Copyright Wiley-VCH ISBNs: 0-471-28272-3 (Hardback); 0-471-22823-0 (Electronic), 2000.

WEBSTER, J.G. **Medical Instrumentation Application and Design.** Third edition. New York: John Wiley & Sons, 1998 ISBN: 0-471-15368-0, 1998.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. **Epidemiology and etiology of Parkinson's Disease.** European Journal of Epidemiology. 26(1):S1-S58, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A:

```

//gera rampa, grava dados, envia dados, envia comandos
//PLACA ARDUINO DUE
//GerGravTrDUE
// int tensoes[120];

int tensoes[120]; //Um array

int correntes[120];

uint32_t value1;

uint32_t value2;

// int val_I = analogRead(0);
// int val_V = analogRead(1);

char c= Serial1.read ();

int led = 13;

int addr =0;

//valor a ser lido

void setup(void) {

analogReadResolution(12);

uint32_t value; //valor a ser lido

uint32_t val_I; //valor a ser lido

uint32_t val_V;

uint32_t val = analogRead(0) ;

pinMode(DAC0, OUTPUT);

pinMode(led, OUTPUT);

pinMode(2, OUTPUT);

pinMode(4, OUTPUT);

digitalWrite (4,LOW);

digitalWrite (2,LOW);

Serial1.begin(115200); //9600 eh muito LENTO

// Serial.println("Onda Triangulo");

```

```
// delay(1000);  
}  
  
void loop(void) {  
    analogReadResolution(12);  
    analogWriteResolution(12);  
    uint32_t val_I = analogRead(0) ;  
    uint32_t val_V = analogRead(1) ;  
    int j=0;  
    uint32_t counter;  
  
    digitalWrite(led, HIGH);  
    val_V=40;  
    for (counter = 0; counter < 3000; counter=counter+50)  
    {  
        analogWrite(DAC0, counter);  
        // val = analogRead(0) ; //isso leva 100 micro segundos  
        // tensoes [j]=val;  
        val_I = analogRead(0) ;// 4;  
        correntes [j]=val_I;  
        //val_V = analogRead(1) ;  
        tensoes [j]=val_V;  
        val_V = val_V++;  
  
        j++;  
        delayMicroseconds(50); //cuidado este tempo influencia o laço da voltametria  
        // tempo menor=== laço aberto tempo maior laço fechado  
        // delay(1);  
    }  
}
```

```

}

//delay(500);
val_V=100;

for (counter = 3000; counter > 0; counter=counter-50)
{

    analogWrite(DAC0, counter);
    //val = analogRead(0) ;
    //tensoes [j]=val;
    val_I = analogRead(0) ;// 4;
    correntes [j]=val_I;

    //val_V = analogRead(1);
    tensoes [j]=val_V;
    val_V = val_V--;

    j++;

    delayMicroseconds(50);
    // delay(1);

}

digitalWrite(led, HIGH);

//agora é hora de transmitir os dados durante o delay
//essa transmissão éo proprio delay... portanto não precisa delay
//void envia (void);
// Serial.println("Enviando...");
//delay (4000);
for (int k = 0; k < 120; k++) {
    //value = tensoes[k];

```

```
// cada print gasta 50 ms de transmissão!!

value1 = correntes[k];
value2 = tensoes[k];
Serial1.print(k);
Serial1.print("\t");
Serial1.print("i");
Serial1.print(value1, DEC);
Serial1.print("\t");
// Serial1.print("i"+1023-value1);
Serial1.print("v");
// Serial1.print("v"+value2);
Serial1.print(value2, DEC);
// delay (2);
//delay(1);
Serial1.println();
delayMicroseconds(50);

if (k == 120)
k = 0;
if (j==120)
j=0;

}
delay(200);
if (Serial1.available())
{
char c= Serial1.read ();
if (c=='s'){
digitalWrite (2,HIGH);
delay(100);
```

```
digitalWrite (2,LOW);  
Serial1.println("SOBE");  
  
}  
else if (c=='d') {  
    digitalWrite (4,HIGH);  
    delay(100);  
    digitalWrite (4,LOW);  
    Serial1.println("desce");  
  
}  
  
    delay (10);  
  
}  
  
digitalWrite(led, LOW);  
// delay(200);  
// k=0;  
}
```


APÊNDICE B:

```
// Control_INFRA

//Verifica entradas e envia sinais INFRAVERMELHO

#include <IRremote.h>

IRsend irsend;

// constants won't change. They're used here to
// set pin numbers:

const int buttonPin = 2;

const int buttonPin4 = 4; // the number of the pushbutton pin

const int ledPin = 13; // the number of the LED pin

// variables will change:

int buttonState = 0; // variable for reading the pushbutton status

int buttonState4 = 0;

void setup() {

  // initialize the LED pin as an output:

  pinMode(ledPin, OUTPUT);

  // initialize the pushbutton pin as an input:

  pinMode(buttonPin, INPUT);

  pinMode(buttonPin4, INPUT);

}

void loop() {

  // read the state of the pushbutton value:

  buttonState = digitalRead(buttonPin);

  buttonState4 = digitalRead(buttonPin4);

  // check if the pushbutton is pressed.

  // if it is, the buttonState is HIGH:

  if (buttonState == HIGH) {

    // turn LED on:

    digitalWrite(ledPin, HIGH);

    irsend.sendNEC(0xFF906F, 32); // + no COntrole

    delay(100);

  }

}
```

```
}  
if (buttonState4 == HIGH) {  
  // turn LED on:  
  digitalWrite(ledPin, HIGH);  
  irsend.sendNEC(0xFFA857, 32); // - no COntrole  
  delay(100);  
}  
else {  
  // turn LED off:  
  digitalWrite(ledPin, LOW);  
}  
}
```

APÊNDICE C:

```

/* INFRAMOTOR

//Controla o motor de Passo

*/

#include <Stepper.h>

#include <IRremote.h>

#include <LED.h>

#include <Timer.h>

//int lede = 7;

int ir_pin = 12;

LED switch_led = LED(13);

LED led[] = {LED(5), LED(6), LED(9), LED(10), LED(11)};

const int stepsPerRevolution = 200;

Stepper myStepper(stepsPerRevolution, 2, 3, 4, 7);

int stepCount = 0;

// change this to fit the number of steps per revolution

// for your motor

long int motorSpeed =5;

IRrecv ir(ir_pin);

//Variáveis para controle

uint8_t led_atual = 0; //de 0 a 4

uint8_t pwm[] = {0, 0, 0, 0, 0};

boolean waiting_led = false;

Timer timer = Timer(200);

Timer timer_switch = Timer(500);

//Auxiliares

long int prev = 0;

long int code;

decode_results results;

void setup(){

```

```
Serial.begin(9600);

ir.enableIRIn();

// pinMode(led, OUTPUT);

// digitalWrite(led, HIGH);

}

void loop(){

// if (motorSpeed > 0) {

    myStepper.setSpeed(motorSpeed);

    // step 1/100 of a revolution:

    myStepper.step(stepsPerRevolution / 100);

    // }

    if(ir.decode(&results)){

        code = (results.value == 4294967295) ? prev : results.value;

        prev = code;

        execute(code);

        ir.resume();

// digitalWrite(led, HIGH);

    }

}

void execute(long int code){

    if(!waiting_led){

        switch(code){

            // SWITCH

            case 16750695:

                timer_switch.reset();

                waiting_led = true;

                switch_led.on();

        }

    }

}
```

```
break;

// ON/OFF
case 16753245:
  if(timer.check()){
    led[led_atual].toggle();
    pwm[led_atual] = (led[led_atual].getState() == HIGH) ? 255 : 0;
  }
  break;

// +
case 16748655:
  if(pwm[led_atual] < 255){
    pwm[led_atual] -= 15;
    motorSpeed += 5;
    Serial.println(motorSpeed);
  }
  led[led_atual].setValue(pwm[led_atual]);

  break;

// -
case 16754775:
  if(pwm[led_atual] > 0){
    pwm[led_atual] += 15;
    motorSpeed -= 5;
    Serial.println(motorSpeed);
  }
  led[led_atual].setValue(pwm[led_atual]);

  break;
```

```
// 7 - Desliga todos
case 16728765:
    for(int i=0; i < 5; i++){
        pwm[i] = 0;
        led[i].off();
    }
    break;

// 9 - Liga todos
case 16732845:
    for(int i=0; i < 5; i++){
        pwm[i] = 255;
        led[i].on();
    }
    break;
}
}else{
    switch(code){
        case 16750695:
            if(timer_switch.check()){
                led[led_atual].blink(100);
                switch_led.off();
                waiting_led = false;
            }
            break;
// 1
case 16724175:
    led_atual = 0;
    led[led_atual].blink(100);
    switch_led.off();
```

```
waiting_led = false;  
break;
```

```
// 2
```

```
case 16718055:  
    led_atual = 1;  
    led[led_atual].blink(100);  
    switch_led.off();  
    waiting_led = false;  
    break;
```

```
// 3
```

```
case 16743045:  
    led_atual = 2;  
    led[led_atual].blink(100);  
    switch_led.off();  
    waiting_led = false;  
    break;
```

```
// 4
```

```
case 16716015:  
    led_atual = 3;  
    led[led_atual].blink(100);  
    switch_led.off();  
    waiting_led = false;  
    break;
```

```
// 5
```

```
case 16726215:  
    led_atual = 4;  
    led[led_atual].blink(100);
```

```
switch_led.off();  
waiting_led = false;  
break;  
  
default:  
    led[led_atual].blink(100);  
    switch_led.off();  
    waiting_led = false;  
}  
}  
}
```


APÊNDICE D:

```

#include <Stepper.h>

const int stepsPerRevolution = 200; // acerta passos por volta

// initialize the stepper library on pins:

Stepper myStepper(stepsPerRevolution, 2,3,4,7);

int motorSpeed=49;

int stepCount = 0;    // passos dados

String c = "";

void setup() {

  // initialize the serial port:

  Serial.begin(9600);

}

void loop() {

    if (motorSpeed > 0) {

        myStepper.setSpeed(motorSpeed);

        // step 1/100 of a revolution:

        myStepper.step(stepsPerRevolution/200);

    }

    if (Serial.available()){

        int c = Serial.read();

        //Serial.println(c.toInt());

        motorSpeed = c-48;

    }

    // else{

    // motorSpeed= 49;

    // }

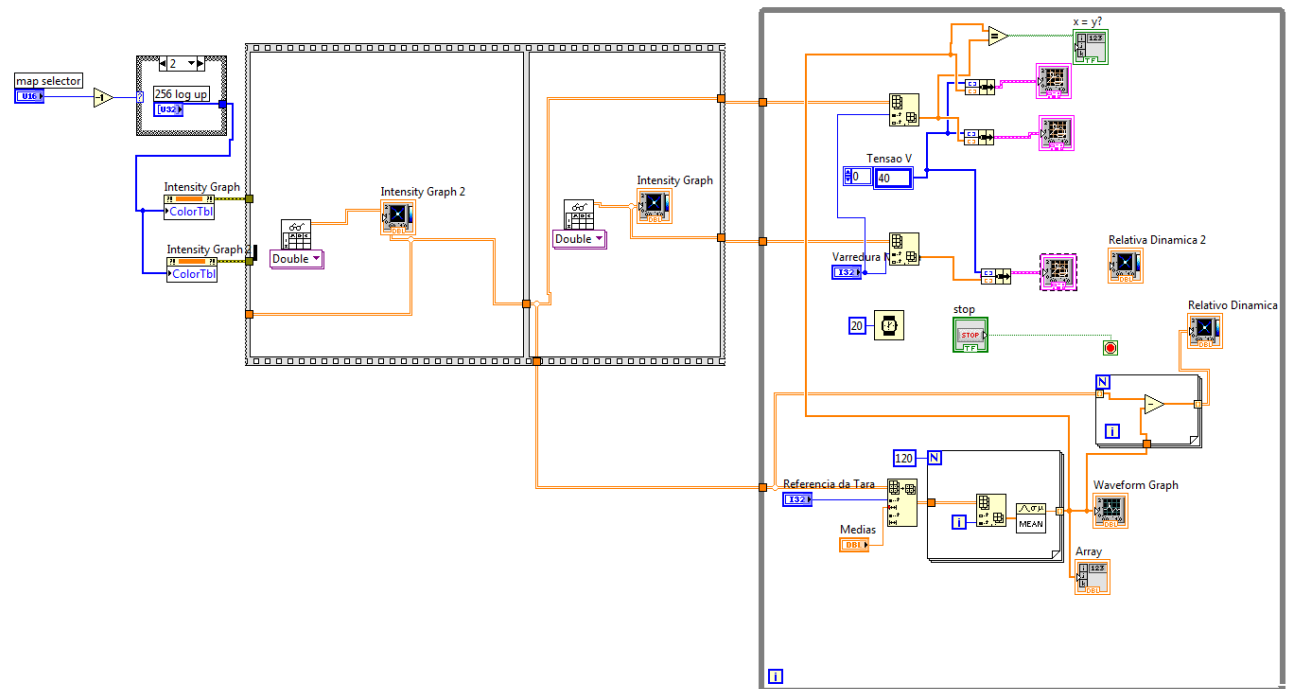
    Serial.println(motorSpeed);

    delay(10);

}

```

APÊNDICE E:



APÊNDICE F:

