



**Ciências**  
**ULisboa**



INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS NUCLEARES  
APLICADAS À SAÚDE  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica e Biofísica

3º ano

**ESTÁGIO**

**Automatização da Análise de Potenciais Motores  
Evocados por Estimulação Magnética Transcraniana:  
Desenvolvimento de uma Ferramenta em MATLAB**

Mariana Correia Bento Mourão

Nº 49963

Estágio realizado no Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde, Coimbra

Orientadores: Mestre Ana Dionísio e Doutora Inês Bernardino

2019



## Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer ao Professor Doutor Miguel Castelo-Branco, sem a sua receptividade não teria sido possível a realização deste estágio no Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS).

Às minhas orientadoras, Mestre Ana Dionísio e Doutora Inês Bernardino, quero expressar a minha gratidão pela proximidade e simpatia com que me trataram, bem como pela paciência e auxílio na conceção do presente relatório.

Ao Professor Doutor Pedro Cavaleiro Miranda agradeço a disponibilidade, simpatia e ajuda demonstradas antes e durante o estágio. Ainda que numa reta mais final, queria agradecer as sugestões dos Professores Doutores Alexandre Andrade, Nuno Matela e José Augusto.

Aos Professores Doutores Raquel Conceição e Hugo Ferreira agradeço pela panóplia de palestras que possibilitaram alargar os horizontes do conhecimento. À Professora Doutora Raquel Conceição um especial obrigada pelos vários esclarecimentos oferecidos.

Por último, um agradecimento especial à minha família, principalmente pais e avós, pela compreensão nas minhas inúmeras ausências, bem como o apoio e conselhos nas decisões que tomo.



## Resumo

A conjugação da técnica de Estimulação Magnética Transcraniana (TMS) com a Eletromiografia (EMG) tem demonstrado grande potencial na avaliação da excitabilidade cortical através da quantificação dos Potenciais Motores Evocados (MEPs), permitindo aferir acerca de alterações que decorram da neuroestimulação, intervenções farmacológicas e/ou estados neuropsiquiátricos.

Visando-se minimizar a influência de fatores humanos na análise dos protocolos de TMS-EMG, nomeadamente *paired-pulse* (ppTMS) e curvas de recrutamento, desenvolveu-se uma ferramenta em MATLAB que permitisse automatizar o processamento *offline* do sinal EMG, com fim a quantificar a amplitude pico-a-pico dos MEPs e modular curvas de recrutamento. A metodologia aplicada baseou-se na segmentação do sinal EMG e posterior deteção dos artefactos de TMS em cada segmento, mediante técnicas de reconhecimento de padrões auxiliadas pela extração prévia de *templates* representativos das diferentes sequências de aplicação dos pulsos de TMS. Após isto, seguiu-se a deteção e quantificação dos MEPs numa janela pré-definida face ao artefacto de TMS. Específico do protocolo da curva de recrutamento, às amplitudes médias dos MEPs para cada intensidade de estimulação aplicada ajustou-se, por processos iterativos de regressão não-linear, a curva sigmoidal de Boltzmann.

Após análise da correlação e concordância entre as medições manuais e automáticas das amplitudes dos MEPs, demonstrou-se a eficiência do algoritmo desenvolvido em reproduzir os resultados manuais até à ordem dos  $10^{-6}$  mV. Ainda que em reduzido número, observaram-se discrepâncias associadas a falhas nos algoritmos de deteção dos artefactos de TMS e na quantificação dos MEPs, facilmente corrigidas recorrendo às interfaces de visualização e correção dos resultados produzidos pelo algoritmo. Ainda assim, importa considerar métodos alternativos e mais representativos da natureza dos MEPs, como se apresenta ser a análise em tempo-frequência (TFA).

Relativamente ao ajuste à curva de recrutamento, corroboraram-se as evidências apresentadas na literatura de que a variabilidade dos MEPs depende da intensidade de estimulação, sendo modulada por distribuições com diferentes graus de *skewness* e bimodais, o que demonstrou a necessidade de adotar uma abordagem que não assuma distribuições gaussianas. Adicionalmente, demonstrou-se a utilidade de proceder à modulação da curva de recrutamento previamente à normalização das intensidades de estimulação aplicadas aos restantes protocolos, enquanto contabilização da variabilidade inter-participante da excitabilidade corticomotora ignorada na grande maioria dos estudos clínicos.

Em suma, o algoritmo desenvolvido cumpriu o principal objetivo das tarefas propostas no âmbito do presente estágio, constituindo uma ferramenta suficientemente robusta para o tratamento automático de dados dos protocolos *paired-pulse* e curvas de recrutamento.

## Índice

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>3</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>5</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>9</b>
<b>I. Introdução .....</b>	<b>11</b>
1. Problemática e Objetivos .....	11
1.1 Contextualização do Projeto .....	11
1.2 Motivação e Objetivos Propostos .....	11
2. Estimulação Magnética Transcraniana (TMS) .....	12
2.1 Princípios Eletromagnéticos da TMS .....	12
2.2 Princípios Biofísicos da Interação com os Tecidos .....	13
2.2.1 Modulação Neuroquímica dos Circuitos Corticais .....	13
2.2.2 Quantificação Eletrofisiológica – Potencial Motor Evocado .....	14
2.3 Paradigmas da TMS .....	15
2.3.1 Paired-Pulse (ppTMS) .....	16
2.3.2 Curva de Recrutamento.....	17
3. Processamento do Sinal Eletromiográfico (EMG) .....	18
3.1 Ruído Fisiológico e Experimental.....	19
3.2 Complexidade Estocástica dos MEPs.....	19
<b>II. Metodologia .....</b>	<b>21</b>
4. Aquisição TMS-EMG .....	21
5. Processamento do Sinal EMG.....	22
5.1 Técnicas de Remoção de Ruído .....	23
5.2 Segmentação do Sinal EMG.....	24
5.3 Técnicas de Reconhecimento de Padrões – Detecção dos Artefactos de TMS .....	24
5.3.1 Templates dos Artefactos de TMS.....	24
5.3.2 Reconhecimento de Padrões.....	25
5.4 Técnicas de Detecção dos MEPs .....	27
5.5 Técnicas de Quantificação dos MEPs .....	27
5.6 Técnicas de Ajuste Não-Linear .....	27
6. Análise Estatística .....	28
6.1 Abordagens à Concordância entre Métodos de Medição.....	28
6.2 Variabilidade da Curva de Boltzmann .....	29
<b>III. Resultados e Discussão.....</b>	<b>31</b>
7. Concordância entre Métodos de Medição .....	31
8. Quantificação dos MEPs .....	33

8.1 Detecção dos Artefactos de TMS .....	33
8.2 Métrica de Quantificação dos MEPs.....	35
9. Curva de Recrutamento de Boltzmann .....	36
9.1 Modulação da Variabilidade da Curva de Recrutamento .....	37
<b>IV. Limitações da Aquisição Experimental .....</b>	<b>39</b>
<b>V. Conclusão .....</b>	<b>42</b>
<b>Referências.....</b>	<b>44</b>





## Abreviaturas

CMAPs – Potencias de Ação Musculares Compostos (do inglês, Compound Muscle Action Potentials)

CMT – Potencial Limiar Cortical (do inglês, Cortical Motor Threshold)

CS – Pulso Condicionante (do inglês, Conditioning Stimulus)

CV – Coeficiente de Variação

DC – Corrente Direta (do inglês, Direct Current)

EEG – Eletroencefalografia

EMG – Sinal Eletromiográfico

EPSP – Potencial Pós-Sináptico Excitatório (do inglês, Excitatory Postsynaptic Potential)

FDI – Músculo Interósseo Dorsal (do inglês, First Dorsal Interosseous)

FFT – Fast Fourier Transform

GABA – Ácido Gama-Aminobutírico (do inglês, Gamma-AminoButyric Acid)

ICF – Facilitação Intracortical (do inglês, Intracortical Facilitation)

IPSP – Potencial Pós-Sináptico Inibitório (do inglês, Inhibitory Postsynaptic Potential)

IQR – Amplitude Interquartil (do inglês, Interquartile Range)

ISI – Intervalo Inter-Estímulo (do inglês, Inter-Stimulus Interval)

LICI – Inibição Intracortical de Longa Duração (do inglês, Long-Interval Intracortical Inhibition)

LOAs – Limites de Concordância (do inglês, Limits of Agreement)

M1 – Córtex Motor Primário

MAD – Desvio Absoluto Mediano (do inglês, Median Absolute Deviation)

MEPs – Potenciais Motores Evocados (do inglês, Motor Evoked Potentials)

MRS – Espectroscopia por Ressonância Magnética (do inglês, Magnetic Resonance Spectroscopy)

MUAP – Potencial de Ação da Unidade Motora (do inglês, Motor Unit Action Potential)

NF1 – Neurofibromatose de Tipo I

ppTMS – Paired-Pulse TMS

RMT – Potencial Limiar de Repouso (do inglês, Resting Motor Threshold)

SICI – Inibição Intracortical de Curta Duração (do inglês, Short-Interval Intracortical Inhibition)

SNR – Relação Sinal-Ruído (do inglês, Signal-to-Noise Ratio)

TFA – Análise em Tempo-Frequência (do inglês, Time-Frequency Analysis)

TMS – Estimulação Magnética Transcraniana (do inglês, Transcranial Magnetic Stimulation)

TS – Pulso de Teste (do inglês, Test Stimulus)



## I. Introdução

### 1. Problemática e Objetivos

#### 1.1 Contextualização do Projeto

A Neurofibromatose de tipo I (NF1) é um distúrbio monogenético com incidência de aproximadamente 1:3500, tendo implicações na estrutura cerebral, neuroquímica e funcionamento do sistema nervoso central (1). Tem como origem mutações no gene NF1 que codifica a proteína neurofibromina, um regulador negativo da cascata de sinalização RAS responsável pelo armazenamento e secreção de neurotransmissores (2).

Atualmente, a explicação do perfil cognitivo e comportamental da NF1 encontra-se assente em estudos eletrofisiológicos realizados em modelos animais do rato de NF1 (*Nf1<sup>+/-</sup>*) que confirmam que a diminuição da expressão da neurofibromina resulta no aumento da neurotransmissão GABAérgica, envolvida no balanço excitatório-inibitório regulado no cérebro e maioritariamente dependente dos níveis de glutamato (principal neurotransmissor excitatório) e do ácido gama-aminobutírico (GABA, principal neurotransmissor inibitório) (2). Alterações no sistema GABAérgico foram igualmente encontradas em estudos realizados com doentes recorrendo à Espectroscopia por Ressonância Magnética (MRS) para medir *in vivo* as concentrações de GABA e glutamato. Estes estudos demonstraram mecanismos compensatórios associados à regulação do metabolismo do GABA enquanto resposta ao aumento da neurotransmissão sináptica GABAérgica, justificando a diminuição das concentrações totais de GABA encontradas nos doentes com NF1(3). Numa perspetiva terapêutica, estudos subsequentes em modelos animais de NF1 demonstraram que o fármaco lovastatina, comumente utilizado para o tratamento de hipercolesterolemia, potencia a reversibilidade das disfunções bioquímicas, eletrofisiológicas e cognitivas (4), tornando-se um importante alvo terapêutico.

O trabalho abordado no presente relatório insere-se num projeto de investigação que se propõe realizar um estudo *double-blinded* e controlado por placebo, pretendendo avaliar os efeitos do fármaco lovastatina na modulação do sistema GABAérgico em pacientes diagnosticados com NF1. Para esse fim, adotou-se uma abordagem multimodal que integra técnicas que permitem aferir diferencialmente alterações no balanço excitatório-inibitório: Eletroencefalografia (EEG), MRS e Estimulação Magnética Transcraniana (TMS).

#### 1.2 Motivação e Objetivos Propostos

A técnica de TMS frequentemente exige intervenção humana para o processamento e extração de parâmetros de interesse do sinal eletromiográfico (EMG) gerado. Este aspeto exige um considerável dispêndio de tempo de análise por parte dos investigadores, tendo igualmente associado um elevado grau de subjetividade que compromete a reprodutibilidade dos resultados. Por este motivo, beneficiar-se-ia do desenvolvimento de uma ferramenta de análise que pudesse ser, posteriormente, adaptada a novos protocolos experimentais ou novas variações dos atuais.

Nesse sentido, o trabalho desenvolvido propõe apresentar um algoritmo que permita automatizar os métodos de análise associados aos protocolos experimentais de TMS-EMG, nomeadamente dos protocolos

*paired-pulse* (ppTMS) e curvas de recrutamento, apresentando-se as bases matemáticas e fisiológicas do processamento efetuado.

## 2. Estimulação Magnética Transcraniana (TMS)

Introduzida em 1985, a técnica de TMS permite uma estimulação não-invasiva do sistema nervoso, modulando transientemente a excitabilidade neuronal (5). Através da aplicação de um campo magnético variável, a TMS induz indiretamente uma corrente elétrica no crânio semelhante à existente no tecido cortical, ocorrendo apenas uma mínima ativação sensorial e muscular (6).

O neocórtex, enquanto região mais periférica dos hemisférios cerebrais, constitui o principal objeto de estudo de técnicas de estimulação cortical. Mais especificamente, desde o surgimento da TMS, o córtex motor primário (M1) tem sido extensivamente estudado devido à sua organização somatotópica, em que, decorrente da estimulação duma determinada área (*hot-spot*), é possível obter-se uma resposta periférica do músculo representado pela mesma, designado MEP, facilmente quantificável pela EMG (7). A combinação destas duas técnicas (TMS-EMG) permite avaliar, com elevada resolução temporal (na ordem dos microssegundos), a excitabilidade e velocidade de condução do sistema motor (8).

### 2.1 Princípios Eletromagnéticos da TMS

A aplicação da TMS envolve a utilização de uma bobina de transdução que estabelece ligação com um condensador de elevada voltagem (400 V – 3kV), cuja descarga origina pulsos de elevada corrente elétrica de curta duração. Resultante disto, e devidamente fundamentado pela equação de Biot e Savart, produzem-se campos magnéticos variáveis pulsáteis  $\vec{B}(\vec{r}, t)$  com linhas de fluxo perpendiculares ao plano da bobina, compreendidos numa janela temporal de até 1 ms e de intensidade máxima de aproximadamente 1.5 a 2 Tesla (T) (6,7,9).

Por sua vez, e de acordo com a formulação matemática de Maxwell da Lei de Faraday de Indução Eletromagnética (equação 1), decorrente da variação temporal do fluxo magnético  $\vec{B}$  gerado pela bobina, e da sua subsequente penetração com atenuação mínima no crânio, induz-se um campo elétrico  $\vec{E}_1$  no tecido cortical (10), de orientação paralela e direção contrária à corrente elétrica na bobina (9), tipicamente de intensidade máxima que varia entre 100 a 300 V/m (7).

Do campo  $\vec{E}_1$  induzido, resulta uma corrente elétrica no tecido cortical que conduz à acumulação de cargas elétricas nas fronteiras entre tecidos com diferentes condutividades elétricas, originando um potencial eletrostático  $\phi$  ao qual está associado um campo elétrico  $\vec{E}_2$  (equação 2) (10). Deste modo, o campo elétrico total induzido  $\vec{E}$  resulta da combinação destas duas contribuições, com  $\vec{E} = \vec{E}_1 + \vec{E}_2$  (10), sendo este que efetivamente conduz à estimulação neuronal (11).

$$(1) \quad \nabla \times \vec{E}_1 = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \qquad (2) \quad \vec{E}_2 = -\vec{\nabla} \phi$$

## 2.2 Princípios Biofísicos da Interação com os Tecidos

Os mecanismos biofísicos subjacentes à ativação cortical por TMS ainda não são totalmente compreendidos, devido à complexidade envolvida nas interações entre a corrente elétrica induzida e os circuitos intracorticais, compostos por múltiplos neurónios inibitórios e excitatórios de diferentes tamanhos, orientações, localizações e propriedades funcionais (12).

### 2.2.1 Modulação Neuroquímica dos Circuitos Corticais

Ao nível neuronal, a corrente elétrica intracortical induzida origina variações transientes do potencial membranal, ao forçar um movimento transmembranar das cargas iónicas nos axónios corticais. Se se acumularem cargas positivas em excesso na região intramembranal, tal levará à despolarização dos axónios corticais e, se atingido um determinado limiar de ação, ao despoletar de potenciais de ação pré-sinápticos (11).

Consequentemente, neurotransmissores contidos em vesículas pré-sinápticas são libertos, estabelecendo ligações com os respetivos recetores na membrana do neurónio pós-sináptico. Por conseguinte, ocorrerá a alteração da atividade eletroquímica deste último, originando-se o potencial pós-sináptico que, consoante a natureza do neurotransmissor envolvido na comunicação sináptica entre os dois neurónios, pode ser inibitório (IPSP) ou excitatório (EPSP) (7).

Na TMS, devido à orientação da corrente elétrica induzida ser predominantemente paralela à superfície cortical a estimular, os interneurónios orientados horizontalmente têm uma maior probabilidade de serem ativados face aos neurónios piramidais que se dispõem verticalmente no córtex (figura 1), sendo estes últimos maioritariamente estimulados transinapticamente através dos interneurónios glutamatérgicos (excitatórios) e GABAérgicos (inibitórios) (13). Contudo, para intensidades de estimulação mais elevadas, os neurónios piramidais podem ser diretamente ativados. Nesse sentido, dependente da ativação direta ou transináptica dos axónios piramidais, resultam as designadas ondas D e I, respetivamente (14).

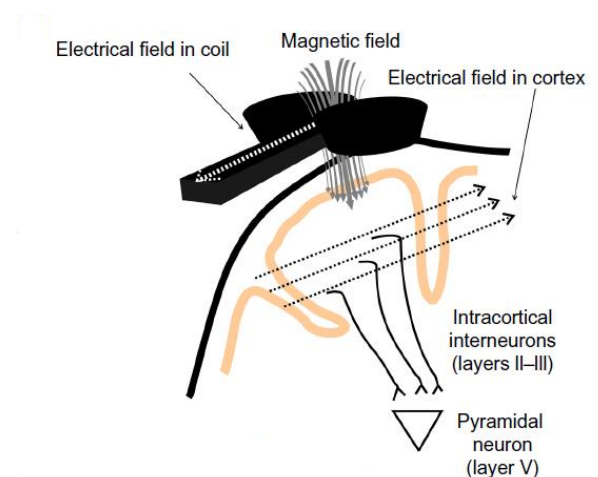


Figura 1 – O campo elétrico produzido pela bobina induz um campo magnético variável de direção perpendicular ao plano da bobina, o qual penetra no crânio e induz uma corrente elétrica no tecido cortical de direção oposta à existente na bobina. Para intensidades de estimulação adequadas, geram-se potenciais de ação preferencialmente nos interneurónios de orientação horizontal, sendo que do estabelecimento de ligações sinápticas com os neurónios piramidais resulta a ativação do trato corticoespinhal (adaptado de (38)).

### 2.2.2 Quantificação Eletrofisiológica – Potencial Motor Evocado

Quando a TMS é aplicada em M1, as ondas D e I geradas propagam-se ao longo do trato corticoespinal, que integra o trato piramidal que se projeta nos motoneurónios espinhais (15). Decorrente disto, se os EPSPs de diferentes neurónios corticais que convergem para um mesmo motoneurónio espinal (combinação espacial) forem gerados com elevada sincronização (combinação temporal), tal poderá gerar um potencial de ação no motoneurónio espinal (16) que se propaga ao longo dos axónios periféricos motores, levando à ativação de fibras musculares (17). Por conseguinte, da conjugação aproximadamente sincronizada dos potenciais de ação gerados nas fibras musculares, resulta a ativação da respetiva unidade motora (MUAP) que integra o motoneurónio espinal e as respetivas fibras musculares. Por último, da ativação das unidades motoras que controlam o músculo contralateral ao local de estimulação, resulta a contração periférica deste último, gerando-se um MEP (figura 2) cuja dinâmica temporal pode ser descrita da seguinte forma:

$$(3) \quad MEP(t) = \sum_{k=1}^{M_j} MUAP_{jk}(t - \delta_{jk}),$$

com  $MUAP_{jk}$  como sendo o MUAP gerado na k-ésima ativação da j-ésima unidade motora,  $M_j$  o número de vezes que a j-ésima unidade motora é ativa, e  $\delta_{jk}$  como correspondente ao instante temporal em que ocorre o k-ésimo potencial de ação da j-ésima unidade motora (17).

Deste modo, a eficácia da sequência de sinapses excitatórias estabelecidas desde os neurónios corticais pré-sinápticos até ao músculo alvo determinará a amplitude e latência dos MEPs (14,18), que dependem de fatores externos (por exemplo, a intensidade de estimulação) e internos, com estes últimos relacionados com a integridade e velocidade de condução do trato corticoespinal, assim como do balanço excitatório-inibitório que modula a excitabilidade do trato piramidal (9).

Por outro lado, da dispersão temporal envolvida na propagação das ondas ao longo do trato corticoespinal, e da qual resulta uma dessincronização na ativação dos motoneurónios com consequente cancelamento de fases dos diferentes potenciais de ação gerados, justificam-se as diferenças entre os MEPs induzidos por TMS e os potenciais de ação musculares compostos (CMAPs) evocados por estimulação elétrica dos músculos periféricos. Os MEPs apresentam uma maior complexidade estocástica que se traduz em formas mais polifásicas, amplitudes reduzidas e latências mais elevadas face aos CMAPs, para uma mesma ativação do sistema corticomotor (9).

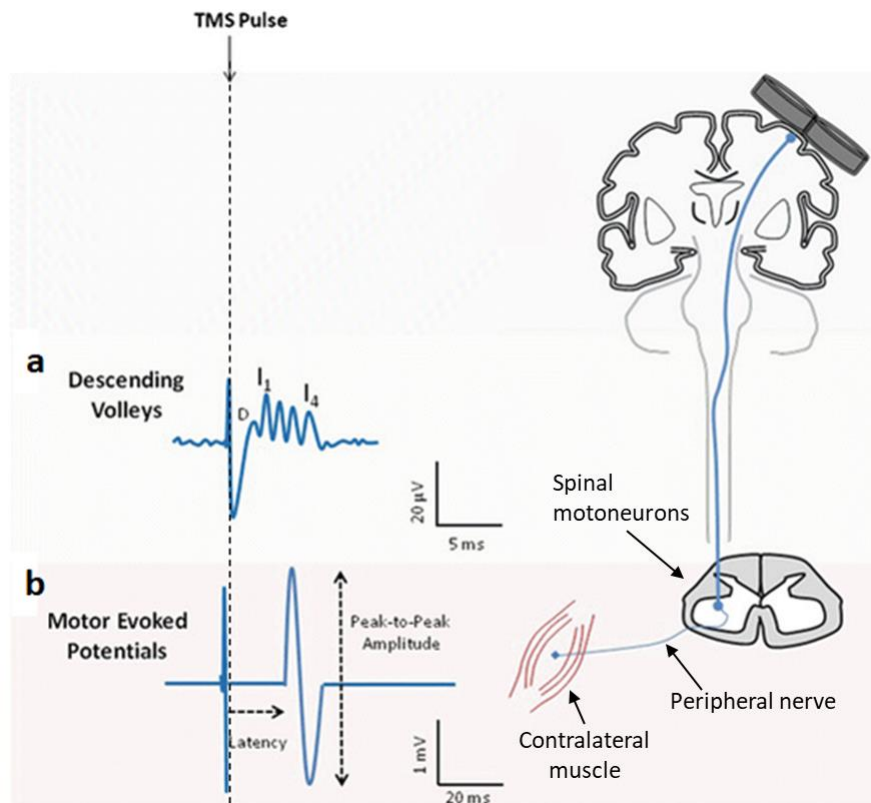


Figura 2 – Esquemática dos mecanismos de ação da TMS aplicada em M1. Ao nível cortical, da ativação direta ou transinápica dos neurónios piramidais, resultam, respetivamente, as ondas D e I. (a) Da propagação das ondas D e I ao longo do trato corticoespinal, e da combinação temporo-espacial dos potenciais de ação gerados ao nível das sinapses corticomotoneurais, resultam (b) os MEPs registados por EMG no músculo contralateral ao local de estimulação. Métricas de latência e amplitude pico-a-pico dos MEPs esquematizadas em (b) (adaptado de (39)).

## 2.3 Paradigmas da TMS

Com o intuito de avaliar a excitabilidade corticoespinal, assim como os mecanismos fisiológicos envolvidos no balanço excitatório-inibitório, diferentes paradigmas da TMS são aplicados para esse fim (19).

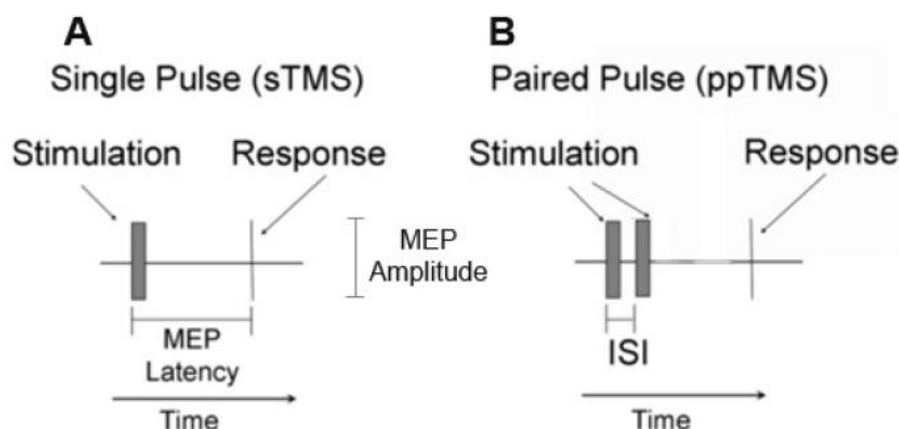


Figura 3 – Paradigmas de TMS distinguidos pela sequência de aplicação dos pulsos de TMS, destacando-se o (A) *single-pulse* e (B) ppTMS (40).

Segundo o padrão de aplicação de pulsos de TMS (figura 3), distinguem-se os seguintes paradigmas: *single-pulse*, quando apenas se aplica um pulso; *paired-pulse* (ppTMS), quando se aplicam dois pulsos separados por um intervalo temporal variável (ISI); TMS repetitiva, se for aplicada sistematicamente uma sequência de pulsos segundo uma determinada frequência (7). Os dois primeiros modos de utilização originam efeitos a curto prazo na excitabilidade cortical, sendo sobre estes que o trabalho realizado recai.

Nesse sentido, por forma a medir a modulação do MEP decorrente da aplicação de um dado paradigma da TMS, os pulsos de TMS são aplicados ao *hot-spot* com uma intensidade normalizada relativamente ao potencial limiar cortical (CMT), enquanto intensidade de estimulação mínima específica de cada participante que permite induzir um MEP viável. Dependente do estado de ativação voluntária do músculo alvo, distingue-se o potencial limiar de repouso (RMT) e ativo (7).

### 2.3.1 Paired-Pulse (ppTMS)

O princípio subjacente ao ppTMS baseia-se na aplicação de um primeiro pulso, designado pulso condicionante (CS), que modula o MEP gerado por um segundo pulso de intensidade superior ao CMT (frequentemente assume o valor de 120%CMT), designado pulso de teste (TS). Essa modulação é resultante da excitação, pelo CS, da população de interneurónios nas camadas corticais superficiais que se projetam transinapticamente aos neurónios piramidais segundo sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas (moduladas pelos neurotransmissores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>). Como os neurotransmissores têm um período temporal de expressão próprio, pela variação do ISI é possível avaliar os seus diferentes efeitos na modulação dos MEPs gerados pelo TS (7).

A natureza e grau dos efeitos de modulação são avaliados através da comparação dos MEPs gerados por ppTMS com um MEP de referência determinado pela aplicação do paradigma *single-pulse* com intensidade igual ao TS (figura 4). Se a amplitude do MEP for superior à *baseline*, estima-se que ocorreu facilitação intracortical (ICF), ocorrendo para ISIs que variam entre 6 a 25 ms. Se verificado o contrário ao anteriormente referido, designa-se que ocorreu inibição intracortical, diferenciando-se a inibição intracortical de curta duração (SICI) da inibição intracortical de longa duração (LICI), consoante o ISI seja entre 1 a 6 ms ou de 50 a 200 ms, respetivamente. Deste modo, a alteração de inibição ou facilitação possibilita concluir acerca de disfunções dos circuitos intracorticais inibitórios e excitatórios que modulam a excitabilidade corticoespinal (7).

Para o SICI e ICF, o CS é aplicado a intensidades inferiores ao CMT (tipicamente assume o valor de 80%CMT), impossibilitando a ativação corticoespinal e consequente registo do MEP (7). Ainda assim, para o SICI, o CS possibilita a ativação de interneurónios GABAérgicos de elevada condução (GABA<sub>A</sub>) (7,19), os quais geram IPSPs que conduzem à diminuição do número de potenciais de ação gerados pelo subsequente pulso TS (20).

Já relativamente ao ICF, estudos sugerem que o mesmo resulta da combinação de efeitos excitatórios com efeitos inibitórios em menor extensão. Os efeitos inibitórios estão relacionados com os recetores GABA<sub>A</sub> que medeiam a propagação de IPSPs. Por outro lado, a componente excitatória do ICF é mediada por interneurónios glutamatérgicos, bem como por recetores N-metil-d-aspartato, que originam EPSPs que se somam aos evocados pelo TS (21,22).



Por último, o LICI refere-se à supressão transiente da atividade neuronal quando o CS e o TS são ambos aplicados com intensidades iguais ou superiores ao potencial limiar motor, resultando dois MEPs de cada um dos pulsos aplicados, com o segundo a ser o único inibido (21). Estudos farmacológicos permitiram associar o LICI a interneurónios GABAérgicos de lenta condução ( $GABA_B$ ), ao resultar um maior efeito dos IPSPs gerados com a administração de agonistas dos recetores  $GABA_B$  (19,23).

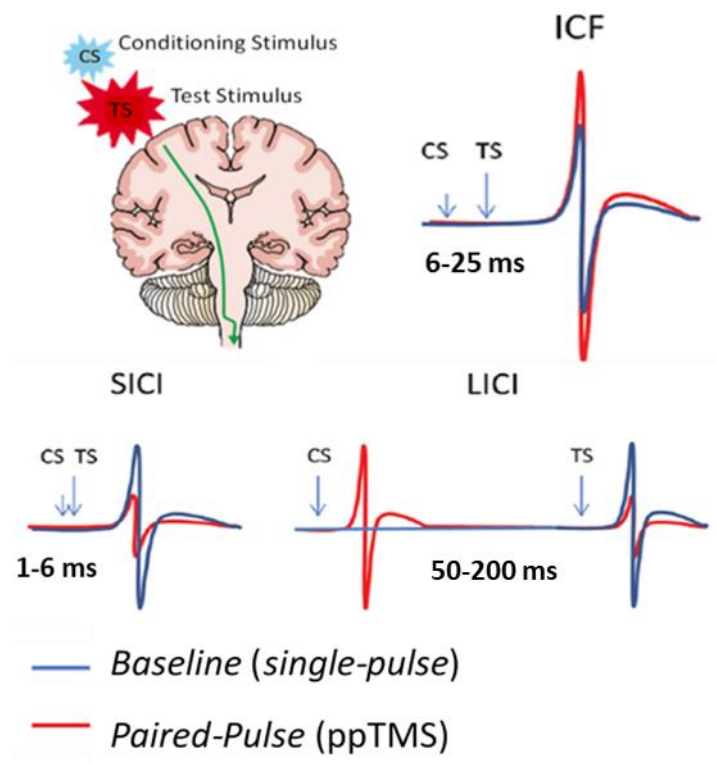


Figura 4 – Paradigma ppTMS, em que decorrente da variação da intensidade de estimulação do CS e TS (esquemático pelo tamanho das setas), bem como do ISI (especificado pelos intervalos temporais), possibilita-se a avaliação de fenómenos inibitórios (LICI e SICI) e excitatórios (ICF) intracorticais. Paradigma *single-pulse* com intensidade igual ao TS enquanto estabelecimento de uma resposta de referência para avaliar o grau e natureza da modulação da amplitude do MEP gerado por ppTMS (adaptado de (41)).

### 2.3.2 Curva de Recrutamento

Quando se aplica o paradigma *single-pulse* em M1 para intensidades de estimulação progressivamente superiores, possibilita-se a avaliação do aumento da excitabilidade no trato corticoespinhal enquanto resposta ao aumento da intensidade do estímulo, traduzindo-se esta relação por uma curva sigmóide (figura 5), designada curva de recrutamento (7).

Para intensidades de estimulação inferiores ao RMT, a curva idealmente traduziria um valor sensivelmente constante e correspondente a zero (9). Aproximando-se do início da região linear, assinala-se uma estimativa do RMT não baseada numa voltagem arbitrária, tipicamente associada a uma amplitude de 0.05 mV do MEP induzido (7,24). De seguida, para intensidades progressivamente superiores, denota-se uma região linear que traduz a combinação temporo-espacial mais sincronizada dos EPSPs cortico-motoneuronais, sendo caracterizada pelo seu declive que traduz a taxa a que as unidades motoras são recrutadas (9,25). Por último, e a demarcar o fim da região linear, a curva atinge um nível de saturação para intensidades de

estimulação consideravelmente elevadas face ao RMT, refletindo-se o número máximo e limitado de motoneurónios relativos ao músculo estimulado que podem ser recrutados por TMS (7), não correspondendo à resposta excitatória máxima dada pelo CMAP, devido à dispersão temporal dos EPSPs já fundamentada (9,24).

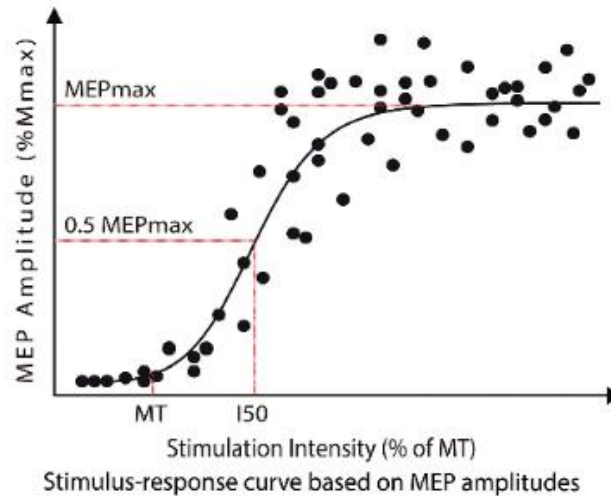


Figura 5 – Parâmetros eletrofisiológicos extraídos de uma curva de recrutamento exemplo, modulada por uma função sigmoide. MT relativo ao potencial limiar de repouso. I50 relativo à intensidade de estimulação correspondente ao ponto de inflexão da curva. MEPmax relativo à região de saturação da curva (42).

Deste modo, frisa-se que as curvas de recrutamento não são estáticas, sendo afetadas por fatores que influenciam a excitabilidade corticomotora. Como exemplo, tem-se que a contração tónica do músculo alvo geralmente provoca um desvio para a esquerda da curva de recrutamento, assim como conduz ao aumento do declive da região linear, devido ao facto de os motoneurónios estarem a um nível de potencial elétrico perto do limiar de ação, diminuindo-se a variabilidade associada à excitabilidade corticoespinal (26).

### 3. Processamento do Sinal Eletromiográfico (EMG)

Baseada na propriedade da sobreposição dos campos elétricos, a técnica de EMG permite o registo da combinação temporal e espacial dos MEPs resultantes da atividade de todas as unidades motoras recrutadas numa determinada vizinhança dos elétrodos, que tanto podem estar inseridos diretamente no músculo como dispostos superficialmente no mesmo. Deste registo resulta um padrão complexo de potenciais elétricos (tipicamente de amplitude da ordem dos 100  $\mu$ V), denominado sinal EMG composto:

$$(4) \quad EMG(t) = \sum_{j=1}^{N_m} MEP_j(t) + n(t)$$

com  $MEP_j(t)$  como sendo o j-ésimo MEP,  $N_m$  o número de unidades motoras ativas, e  $n(t)$  o ruído de fundo (17).

Adicionalmente à contribuição dos MEPs e do ruído no sinal EMG, da técnica conjugada de TMS-EMG são, ainda, registados artefactos de TMS resultantes da descarga de alta voltagem da bobina magnética (27). No caso da TMS ser aplicada relativamente próxima dos elétrodos de registo EMG, como se verificaria para

músculos do crânio, tal poderia comprometer o registo do MEP devido à saturação do sistema de amplificação do sinal EMG (9,27), algo particularmente crítico na técnica que conjuga o EEG com a TMS (28). Como forma de solucionar isto, as frequências de amostragem do sistema analógico-digital são consideravelmente elevadas (entre 1000 a 5000 Hz), permitindo-se ao sistema de amplificação recuperar mais rapidamente e registar o sinal EMG com uma maior resolução temporal, à custa de ficheiros de dados de elevada dimensão (29). Para além disso, são também aplicados filtros passa-alto com frequência de corte de aproximadamente 1 Hz, com o intuito de reduzir a duração do artefacto (9).

### 3.1 Ruído Fisiológico e Experimental

Geralmente, os MEPs apresentam uma boa relação sinal-ruído (SNR) que varia entre 5 a 60 dB, com a amplitude  $A_{signal}$  do MEP a variar de algumas dezenas de  $\mu V$  a vários mV para uma amplitude  $A_{noise}$  do ruído fisiológico de alguns  $\mu V$ .

$$(5) \quad SNR_{dB} = 10 \log_{10} \left[ \left( \frac{A_{signal}}{A_{noise}} \right)^2 \right] = 20 \log_{10} \left( \frac{A_{signal}}{A_{noise}} \right)$$

Nesse sentido, os MEPs não requerem aplicação extensiva de técnicas de pré-processamento, sendo na maioria dos casos suficiente proceder à filtragem do sinal EMG para eliminar o ruído experimental (7), nomeadamente o associado às seguintes situações: ruído inerente à instrumentação utilizada em contexto experimental (por exemplo, o sistema de amplificação e de digitalização), caracterizado no domínio espectral desde uma componente de corrente direta (DC) até 100 Hz; artefactos resultantes de movimento (entre 1Hz a 15Hz e de amplitude em voltagem comparável ao sinal EMG), os quais se traduzem em ruído no sinal EMG devido à interface entre a superfície dos elétrodos de deteção e a pele, bem como ao movimento do cabo de ligação entre o eléctrodo e o sistema de amplificação; ruído eletromagnético, caracterizado por componentes em frequência entre 50 Hz a 60 Hz, bem como outras harmónicas (30).

### 3.2 Complexidade Estocástica dos MEPs

Uma das maiores problemáticas associadas à técnica de TMS-EMG diz respeito à variabilidade dos MEPs, pondo-se em causa a viabilidade das medições efetuadas destinadas a avaliar a excitabilidade corticomotora (25). Como já elucidado na secção 2.2.2, diversos parâmetros dos MEPs, como a sua forma, amplitude e latência, dependem da ativação complexa de caminhos neuronais que envolvem a já mencionada dispersão temporal dos EPSPs no trato piramidal, e dos quais resulta a combinação dessincronizada de MUAPs. Disto resultam MEPs polifásicos que contêm múltiplos picos transientes, cujo número é desconhecido, assim como as suas amplitudes e larguras, impossibilitando-se a aplicação de métodos de deteção de sinais transientes que assumam um conhecimento *a priori* do seu formato (17).

Desta forma, os parâmetros dos MEPs não podem ser considerados determinísticos, sendo necessário modelá-los segundo variáveis aleatórias. Contudo, os parâmetros dos modelos probabilísticos também são desconhecidos, conferindo-se uma elevada exigência em processar os MEPs (17).



## II. Metodologia

### 4. Aquisição TMS-EMG

Para cada uma de três sessões integradas no plano de avaliação clínico aplicado no presente projeto, a aquisição experimental de TMS-EMG destinava-se a avaliar a excitabilidade corticomotora e interações intracorticais no M1, segundo os paradigmas do ppTMS e curvas de recrutamento. Os parâmetros de estimulação aplicados para cada paradigma estão sumariados na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de estimulação aplicados nos paradigmas ppTMS e curva de recrutamento

Paradigmas da TMS		Intensidades de Estimulação		ISI
		CS	TS	
ppTMS	SICI	80%SI1mV	120%SI1mV	3 e 5 ms
	ICF	80%SI1mV	120%SI1mV	10 e 15 ms
	LICI	100%SI1mV	100%SI1mV	50 e 100 ms
Curva de Recrutamento		Não aplicável	90%, 100%, 110%, 120%, 130% e 140% RMT	Não aplicável

Para dar início à estimulação, acoplou-se uma bobina em formato de oito, com 70 mm de diâmetro (MagVenture, Denmark), ao estimulador magnético MagPro X100, permitindo-se uma estimulação mais focal (9) da representação cortical do primeiro músculo interósseo dorsal (FDI) dominante (*hot-spot*). A bobina de estimulação, que aplicava pulsos bifásicos de TMS, foi posicionada tangencialmente ao *hot-spot* e orientada 45 graus segundo o eixo médio-sagital, de forma a induzir uma corrente na direção posterior-anterior, reportada como sendo mais eficaz na ativação corticomotora (19).

Decorrente da estimulação do *hot-spot*, o registo dos MEPs realizou-se através de elétrodos adesivos de Ag/AgCl posicionados no FDI dominante, de acordo com a montagem *belly-tendon*, tendo-se ainda colocado um elétrodo adicional, referente à terra, posicionado no processo estilóide da ulna. A informação relativa aos potenciais elétricos medidos pelos elétrodos foi registada no primeiro canal do sistema de aquisição BIOPAC MP-150, equipado com um amplificador EMG 100C (Biopac Systems, CA, USA) de ganho 1000. Por outro lado, o estimulador magnético encontrava-se conectado ao segundo canal do sistema de aquisição de EMG, permitindo-se o registo de *triggers* identificativos dos instantes temporais exatos em que são aplicados os pulsos de TMS.

Posteriormente ao processamento analógico, os dados de EMG foram digitalizados com uma frequência de amostragem de 10 kHz, monitorizando-se a aquisição experimental através do *software* de análise *Acqknowledge* 4.2.

De seguida, foram determinadas as intensidades dos pulsos de TMS para a estimulação do *hot-spot*, aplicando-se dois critérios diferentes de normalização das intensidades, dependendo do tipo de protocolo de aquisição: para o paradigma ppTMS, a intensidade mínima de estimulação do *hot-spot* foi definida como a necessária à reprodutibilidade de MEPs com amplitude mínima de 1mV (SI1mV), em pelo menos 5 de 10 medições consecutivas; para o protocolo da curva de recrutamento manteve-se a mesma abordagem, modificando-se para 0.05mV (RMT) o critério da amplitude mínima dos MEPs gerados.

Relativamente aos parâmetros de estimulação (tabela 1), aplicaram-se, segundo chaves de randomização mantidas entre sessões, diferentes ISIs e intensidades de estimulação para os protocolos de ppTMS e curva de recrutamento, respetivamente. Tal realiza-se com o intuito de, em caso de ocorrência de erros, os *trials* relativos a um dado ISI ou intensidade de estimulação não sejam sistematicamente afetados. Analogamente, os intervalos entre pulsos de TMS consecutivos são, também, aplicados segundo uma chave de randomização, de forma a que o participante não se consciencialize da periodicidade da aplicação dos mesmos, e, eventualmente, tente reproduzir voluntariamente a contração do FDI.

Posto isto, e com o intuito de minimizar o efeito de erros que decorram da modificação do estado do sistema (eletrónico e/ou fisiológico, tal como a movimentação do paciente, a alteração da posição da bobina, etc.), para o ppTMS foram aplicados no total 15 pares de pulsos (CS + TS) para cada ISI, e 10 single-pulse (TS) para efeitos de *baseline*. Já para o protocolo da curva de recrutamento, foram definidas seis intensidades de estimulação (TS), cada uma aplicada 10 vezes, gerando um máximo de 60 MEPs.

## 5. Processamento do Sinal EMG

Após a aquisição experimental, o traçado contínuo de EMG é armazenado num ficheiro em formato *.acq*, possibilitando a posterior análise *offline*. Nessa medida, de seguida expõem-se sequencialmente os diversos módulos de processamento e análise integrados no algoritmo desenvolvido.

Para uma melhor compreensão da dinâmica de análise efetuada pelo programa, bem como os modos de interação com o mesmo, recomenda-se a leitura do guião de utilização da interface desenvolvida, disponibilizado na secção A dos anexos. Esta serviu como forma de visualizar o desempenho do algoritmo de processamento do sinal EMG, tendo como principal objetivo permitir a correção de possíveis falhas que conduzem a discrepâncias face à avaliação humana.

Destaca-se que certas interfaces já existentes e *open-source* ajudaram no desenvolvimento da presente, assim como submódulos de análise integrados no algoritmo foram adaptados a partir de funções partilhadas na comunidade MATLAB e Simulink. As interfaces de apoio dizem respeito às seguintes: CortExTool (31); VETA (32); Motometrics (33).

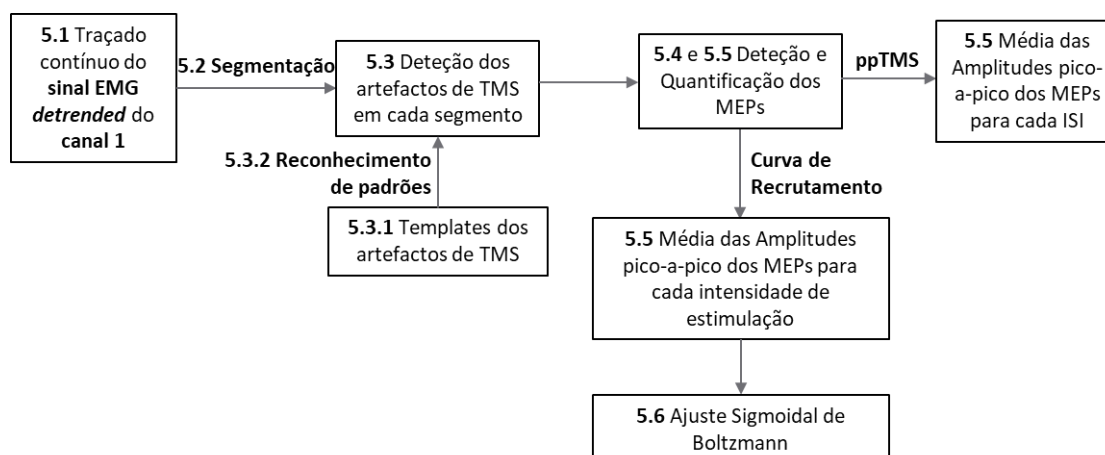


Figura 6 – Esquema representativo das diferentes etapas de processamento de sinal efetuado no algoritmo desenvolvido, destacando-se as respetivas secções em que as mesmas são abordadas.

## 5.1 Técnicas de Remoção de Ruído

Como primeiro procedimento, aplicou-se ao traçado contínuo do sinal EMG a transformada de Fourier no domínio discreto, através do algoritmo da Fast Fourier Transform (FFT).

Como se denota pela figura 1A disponibilizada no anexo B, o sinal EMG tem uma componente DC (correspondente à média do sinal EMG) consideravelmente elevada, sendo responsável, no domínio temporal, pelo desvio constante da linha *baseline* do sinal, não tendo qualquer relação com a atividade miográfica. Nesse sentido, procedeu-se à remoção dessa tendência através da função *detrend* do MATLAB.

Após este procedimento, repetiu-se a FFT do sinal EMG *detrended*, passando-se a visualizar com mais detalhe as restantes frequências do sinal, das quais se destacam a frequência de 50 Hz e as suas harmónicas (figura 1A do anexo B). Conforme anteriormente descrito (secção 3.1), sugere-se que estes componentes se encontrem associados a ruído eletromagnético, procedendo-se à sua filtragem através da implementação de um filtro rejeita-banda, nomeadamente o filtro *comb-notch* (recurso à interface *filterdesigner* do MATLAB). A ordem do filtro é especificada pelo número de *notches*, isto é, as harmónicas a remover, sendo que para uma dada ordem  $n$  existem  $n + 1$  *notches*. Por outro lado, também é requerido especificar a largura de banda de cada *notch*, tendo-se, para tal, estimado a largura do pico de 50 Hz na FFT, a qual, conforme esquematizado na figura 7, é de aproximadamente 0.13 Hz.

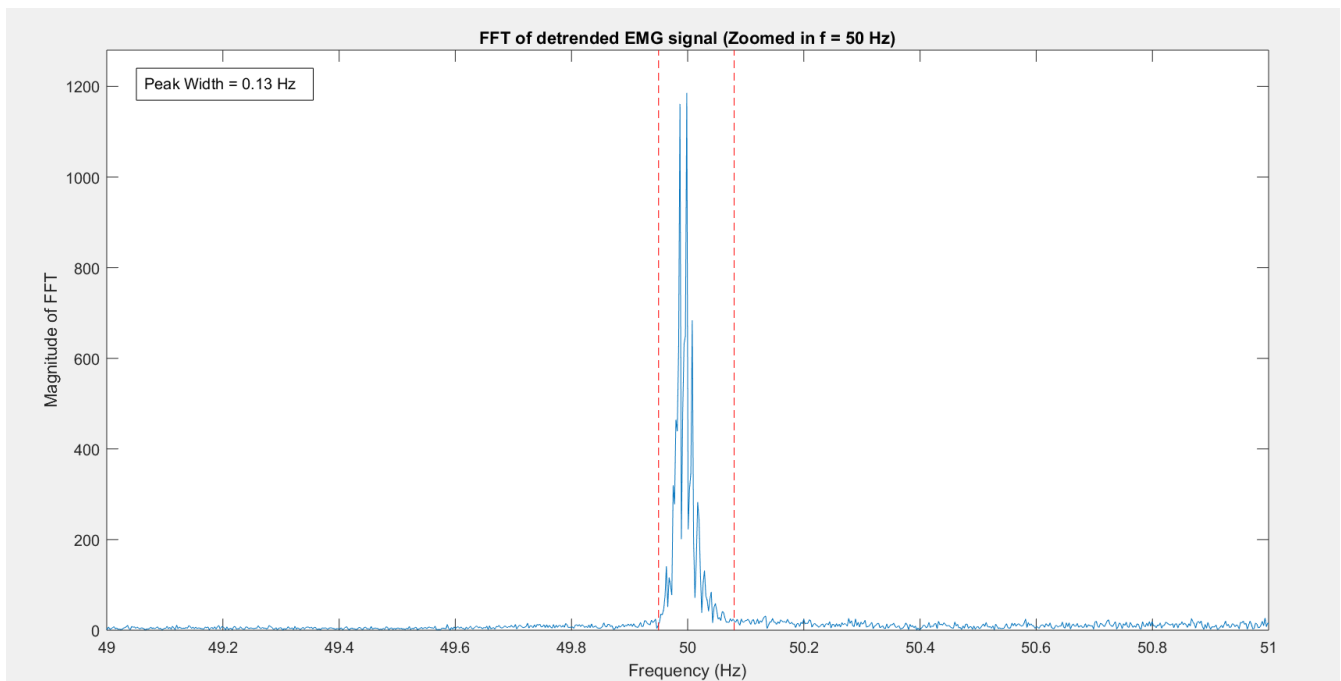


Figura 7 – FFT do sinal EMG *detrended*, ampliando-se em torno da frequência de 50 Hz. Visualização gráfica da largura do pico determinada em relação à sua base (0.13 Hz), estabelecida enquanto largura de banda dos *notches* do filtro IIR *comb*.

No contexto deste estudo, para uma frequência de amostragem de 10kHz existem 200 harmónicas de 50 Hz, pelo que a ordem do filtro é de 199. Como referido, a largura dos *notches* assumida foi de 0.13 Hz, definida em -3 dB.

## 5.2 Segmentação do Sinal EMG

Pretendendo-se quantificar individualmente cada MEP gerado, segmenta-se o traçado contínuo de EMG. À partida, e tendo acesso às chaves de randomização dos intervalos temporais entre pulsos, seria de relativa facilidade proceder à sua segmentação. Contudo, existem fatores que tornam essa metodologia inviável:

(i) as chaves de randomização subestimam os intervalos temporais exatos entre pulsos, pelo que, da acumulação dos erros associados a essa subestimação para cada segmentação que se realiza, resultam segmentos cuja localização exata do(s) pulso(s) de TMS e respetivo MEP é desconhecida;

(ii) os dados do canal 2 que contêm *triggers* identificativos dos instantes temporais exatos em que são aplicados os pulsos de TMS, na realidade, nem sempre contêm essa informação.

Na sequência disto, optou-se por proceder, numa primeira fase, à segmentação referida no ponto (i), obtendo-se o seguinte: 40 segmentos para o ppTMS, 30 deles com os pulsos CS e TS e respetivo MEP gerado, e os restantes 10, relativos à *baseline*, contendo o pulso TS e respetivo MEP; 60 segmentos para o protocolo da curva de recrutamento, cada um contendo o pulso TS e o respetivo MEP.

## 5.3 Técnicas de Reconhecimento de Padrões – Detecção dos Artefactos de TMS

Após visualização no domínio temporal do sinal EMG, constatou-se que os MEPs gerados variam muito na sua forma, devido à sua complexidade estocástica já fundamentada (secções 2.2.2 e 3.2). Contrariamente, os pulsos de TMS dão origem a artefactos que apresentam sensivelmente a mesma forma, apenas variando de amplitude, consoante a intensidade de estimulação aplicada.

Nesse sentido, de forma a determinar com maior exatidão a localização nos segmentos obtidos na etapa anterior do pulso CS e TS para os protocolos ppTMS e curva de recrutamento, respetivamente, procedeu-se à extração de *templates* representativos dos pulsos de TMS, com fim a aplicar, a cada segmento, técnicas de reconhecimento de padrões.

### 5.3.1 Templates dos Artefactos de TMS

A extração dos *templates* dos artefactos de TMS baseou-se na segmentação da informação contida no canal 2 (à semelhança do realizado no canal 1, descrito no ponto (i) da secção 5.2), tendo-se apenas aplicado aos ficheiros de dados relativos ao ppTMS (SICI, ICF e LICI) de um participante (NF1101), devido à ausência de informação relevante no canal 2 nos restantes ficheiros de dados fornecidos.

Em cada segmento obtido, determinou-se o instante temporal em que ocorreria o *trigger* identificativo do instante exato do CS (ou TS, se se tratar do *single-pulse* da *baseline*), através da deteção duma quebra do estado de repouso de 5 V. Assim, para os segmentos que contivessem o *trigger*, definiu-se uma janela temporal desde a ocorrência do primeiro pulso de TMS até ISI + 12 ms após o mesmo, tendo sido a constante de 12 ms ajustada até obter os padrões desejados. De notar que para os padrões da *baseline*, o ISI é de 0 ms.



Feito isto, para cada ISI realizou-se a média dos respetivos padrões, resultando 7 *templates* com um SNR mais elevado: dois para cada ISI numa dada sequência de ppTMS (SICI, ICF e LICI) e um relativo à *baseline* do ppTMS.

Para os ficheiros de dados do protocolo da curva de recrutamento, o *template* a aplicar foi o da *baseline* do ppTMS, visto ser relativo a um pulso único, à semelhança dos pulsos aplicados no protocolo da curva de recrutamento. Os *templates* referidos encontram-se na secção C dos anexos. Se desejado modificar os *templates* estabelecidos como *default*, foi concebida uma interface de apoio à extração dos artefactos de TMS a partir dos ficheiros pretendidos, sendo o modo de utilização da mesma abordado no anexo A.3.4.

### 5.3.2 Reconhecimento de Padrões

Com base nos *templates* obtidos, procedeu-se, numa primeira fase, ao cálculo da correlação cruzada entre um dado segmento de EMG (*g*) e o respetivo *template*, extraíndo-se o índice correspondente ao máximo da correlação (*lag*), idealmente correspondente ao início do primeiro pulso de TMS nesse segmento. Contudo, devido à não total similaridade entre os *templates* e as sequências de pulsos de TMS, tal nem sempre se verifica, constituindo um grau de imprecisão elevado que comprometerá, consequentemente, a correta quantificação dos MEPs.

Nesse sentido, para um intervalo em torno do *lag*, definido de tal modo que se garanta que o mesmo contenha o pulso de TMS a detetar, aplicou-se o algoritmo implementado pela função *findpeaks* do MATLAB, por forma a detetar os dois primeiros picos (*n1* e *n2*) do primeiro artefacto de TMS num dado segmento (figura 8). Para tal, e visto a função *findpeaks* detetar apenas máximos, retificou-se o sinal EMG contido no intervalo definido, assim como definiram-se condições por forma a regular a deteção para esses dois picos, nomeadamente:

(i)  $n2 - n1 \in [w \pm 0.5w]$ , com *w* correspondente a uma estimativa da separação em amostra entre *n2* e *n1* no *template* do *single-pulse* (figura 8);

(ii) as amplitudes associadas a *n2* e *n1* deverão assumir uma amplitude mínima de 3.5 vezes a raiz do valor quadrático médio das amplitudes dos pontos anteriores ao limite inferior do intervalo considerado, enquanto estimativa da magnitude do ruído.

Se cumpridas as condições (i) e (ii), considera-se que *n1* corresponde ao primeiro pico do pulso de TMS a detetar, e ao qual se associa a amplitude *amp* (figura 8). Caso contrário, o limite inferior do intervalo do sinal EMG a analisar é reajustado para *n1 + 1*, aplicando-se novamente o algoritmo da função *findpeaks* sumariado nos pontos (i) e (ii), procedendo-se iterativamente até *n1 + 1* ser superior ou igual ao limite superior do intervalo definido do sinal EMG. Na eventualidade de não serem detetados picos que satisfaçam as condições impostas, associa-se o valor 0 às variáveis *n1* e *amp*, identificativo da falha na deteção do artefacto de TMS. O respetivo fluxograma deste algoritmo encontra-se no anexo D (Esquema 1D – (A)).

Para segmentos de EMG cujo ruído não apresente variações bruscas de amplitude, o algoritmo anteriormente descrito revelou ser eficiente a detetar o primeiro pico do pulso de TMS. Contudo, quando tal não se verifica, o algoritmo tende a detetar picos que antecedem o artefacto de TMS pretendido, por satisfazerem as condições impostas. De forma a corrigir essas situações, assumiu-se que o algoritmo estimou corretamente a localização de um maior número de picos, e, consequentemente, as respetivas amplitudes. Sob esse pressuposto, e recordando que para cada intensidade de estimulação a amplitude dos picos de TMS deve manter-se sensivelmente constante, procedeu-se à identificação de amplitudes ***amp outliers***

pertencentes a um dado grupo de amplitudes **amp<sub>s</sub>**, relativas a uma dada intensidade de estimulação **s**. O referido é suportado pela função *isoutlier* do MATLAB, especificando-se como método de deteção de *outliers* o desvio absoluto (MAD) de 0.75 (parâmetro *threshold*, reajustável) vezes face à mediana das amplitudes, traduzindo-se a identificação de *outliers* pela seguinte condição:

$$(iii) \text{amp} \notin \text{mediana}(\text{amp}_s) \pm 0.75 \times \text{MAD}(\text{amp}_s)$$

Se identificados *outliers*, o algoritmo associado à função *findpeaks* é aplicado aos segmentos respetivos, modificando-se as condições na função *findpeaks* para:

$$(iv) n2 - n1 \in [w \pm 0.5w];$$

(v)  $g(n2) \& g(n1) > 0.5 \times \min(\text{amp}, \text{n\~{a}o-outliers})$ , ou seja, a altura mínima dos picos *n1* e *n2* é ajustada para metade do valor mínimo do grupo de amplitudes identificadas como não-*outliers*, sendo tal efetuado visto a amplitude dos picos tratar-se dum parâmetro intrinsecamente variável.

O respetivo fluxograma deste último algoritmo encontra-se no anexo D (Esquema 1D – (B)). Um exemplo do desempenho deste algoritmo pode ser visualizado no anexo F. Após correção das amplitudes associadas aos *outliers* identificados, ainda ocorrem variações que são identificadas como *outliers*, no entanto, com uma

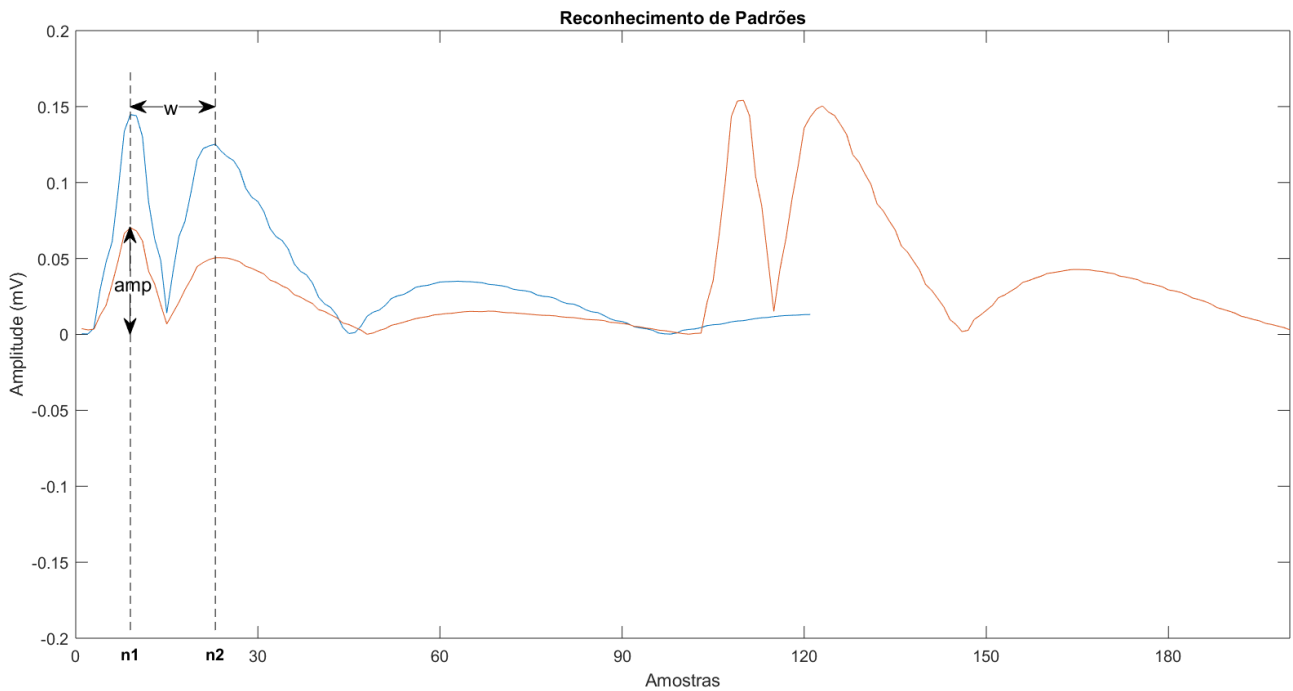


Figura 8 – Demonstração de como a função *findpeaks* procede na deteção dos picos *n1* e *n2* do primeiro pulso de TMS dum dado segmento. A azul tem-se o *template* retificado da *baseline*, sendo a este relativo o parâmetro *w* que especifica o intervalo (em amostras) entre os dois picos do pulso de TMS. A laranja tem-se uma sequência ppTMS retificada, para ISI = 15 ms (ICF), relativamente à qual o parâmetro *amp* será posteriormente utilizado na deteção de amplitudes *outliers*, para uma mesma intensidade de estimulação.

maior probabilidade de serem resultantes da variabilidade associada às condições experimentais.

## 5.4 Técnicas de Detecção dos MEPs

Relativamente à deteção dos MEPs, esta depende da anterior deteção dos artefactos de TMS, uma vez que a janela onde se prevê que esteja contido o MEP é definida face ao pico de TMS detetado. Para o limite inferior dessa janela, teve-se por base o valor estabelecido de latência do MEP de cerca de 20 ms (34), sendo que o limite superior foi ajustado de forma a garantir que a janela contenha o MEP (40 ms após o último artefacto de TMS contido no respetivo segmento). Em caso de falha na deteção do artefacto de TMS, não é definida uma janela temporal destinada à deteção do MEP.

Para as janelas temporais definidas, aplicou-se a função *findchangepts* do MATLAB, de forma a identificar os pontos que minimizam a soma dos resíduos quadrados relativos à média local, tendo-se definido um máximo de 10 pontos a identificar. Desses pontos, assume-se que o primeiro e o último pontos correspondem, respetivamente, ao início e fim do MEP.

## 5.5 Técnicas de Quantificação dos MEPs

Adotou-se como medida representativa da excitabilidade corticomotora a amplitude pico-a-pico dos MEPs gerados superior a 0.05 mV, determinada como o absoluto da diferença entre as amplitudes máxima e mínima contidas na respetiva janela temporal. Em caso de falha na deteção do respetivo artefacto de TMS ou não quantificação do MEP (por ser inferior a 0.05 mV), associa-se o valor NaN à sua amplitude, não se contabilizando nos cálculos posteriores.

Devido à natureza estocástica e à variabilidade experimental envolvidas nas medições dos MEPs gerados, é necessário, para cada ISI (protocolo ppTMS) ou intensidade de estimulação (protocolo curva de recrutamento), proceder-se ao cálculo da média e desvio-padrão das amplitudes respetivas.

Adicionalmente, e com o intuito de diminuir a variabilidade inter-participantes, no protocolo ppTMS estimaram-se as médias normalizadas,  $\mu_{Normalized}$ , para cada ISI (% da média das *baselines*,  $\mu_{Baseline}$ ), associando-se como desvio-padrão o valor obtido por propagação de erros:

$$(8) \quad \sigma_{Normalized} = \mu_{Normalized} \sqrt{\left(\frac{\sigma_{ISI}}{\mu_{ISI}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{Baseline}}{\mu_{Baseline}}\right)^2}, \text{ com } \mu_{Normalized} = \frac{\mu_{ISI}}{\mu_{Baseline}}$$

## 5.6 Técnicas de Ajuste Não-Linear

Como procedimento específico do protocolo da curva de recrutamento, frequentemente ajusta-se a função sigmoide de Boltzmann (equação 9) à relação entre as intensidades de estimulação aplicadas e a média das amplitudes dos respetivos MEPs, exprimindo-se essa relação com base em quatro parâmetros:  $EMG_{base}$ , como o nível de *baseline* do sinal EMG;  $MEP_{sat}$ , relativa à amplitude que representa o estado de saturação;  $s_{50}$ , relativo à intensidade de estimulação que produz um MEP de amplitude intermédia entre  $EMG_{base}$  e

$MEP_{sat}$ ;  $k$ , designado o declive de Boltzmann, apresentando uma relação de proporcionalidade inversa com o declive da região linear da curva (24,26):

$$(9) \quad MEP(s) = EMG_{base} + \frac{MEP_{sat}}{1 + e^{\frac{s_{50}-s}{k}}}$$

Deste modo, o ajuste aos pontos ( $s$ ,  $MEP$ ) tendo por base a equação 9 realizou-se através da função *nlinfit* do MATLAB. Para tal, e tratando-se dum processo iterativo, inicialmente é requerido especificar os valores iniciais dos quatro parâmetros de Boltzmann, sendo que, tendo em conta as intensidades de estimulação testadas, assumiram-se enquanto primeiras estimativas os seguintes valores:  $EMG_{base}$  e  $MEP_{sat}$  definidos, respetivamente, como o valor da amplitude do MEP correspondente à menor e maior intensidade de estimulação (90%RMT e 140%RMT);  $s_{50}$  definido como o ponto médio das intensidades de estimulação aplicadas (115%RMT);  $k$  definido num intervalo pré-estabelecido noutros estudos ( $0.001 < k < 10$ ), que visa restringir situações extremas, nomeadamente o aumento demasiado acentuado da região linear da curva sigmóide (26). Feito isto, o algoritmo itera até atingir estabilidade relativamente aos parâmetros a estimar, traduzindo-se pela minimização dos resíduos quadrados  $r_i^2$  dado por,

$$(10) \quad r_i^2 = (MEP_i - \widehat{MEP}_i)^2$$

com  $MEP_i$  como sendo a  $i$ -ésima amplitude média do MEP experimental e  $\widehat{MEP}_i$  a respetiva amplitude estimada pelo ajuste, sendo os resíduos  $r_i$  caracterizados por uma distribuição normal gaussiana com desvio-padrão constante  $\sigma^2$ , isto é,  $r_i \sim N(0, \sigma^2)$ . A qualidade do ajuste é estimada pela média dos resíduos quadrados (MSE).

Parametrizada a curva de Boltzmann de ajuste aos pontos experimentais, os parâmetros finais a extrair dizem respeito ao  $s_{50}$  e declive da região linear. Relativamente ao  $s_{50}$ , o mesmo já foi anteriormente calculado por processos iterativos. O cálculo do declive da região linear baseou-se no cálculo da reta tangente ao ponto ( $s_{50}$ ,  $MEP(s_{50})$ ), determinando-se em função de  $MEP_{sat}$  e  $k$  (equação 11) (26).

$$(11) \quad \frac{dMEP(s)}{ds} = MEP'(s) = \frac{\frac{MEP_{sat}}{k} e^{(s_{50}-s)/k}}{[1 + e^{(s_{50}-s)/k}]^2} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow MEP'(s_{50}) = \frac{\frac{MEP_{sat}}{k} e^0}{[1 + e^0]^2} = \frac{MEP_{sat}}{4k}$$

Por último, a partir da equação da reta  $MEP(s_{50}) = MEP'(s_{50}) \times s_{50} + b$  relativa à região linear da curva de recrutamento, poder-se-á obter uma estimativa do RMT considerando  $MEP = 0$ , tal como considerado na literatura (26).

## 6. Análise Estatística

### 6.1 Abordagens à Concordância entre Métodos de Medição

No sentido de validar os resultados gerados pelo algoritmo desenvolvido, que se propõe como método alternativo à medição humana, procede-se, para cada conjunto de dados relativos a um determinado participante, à análise do nível de concordância entre as amplitudes dos MEPs obtidos pelos dois métodos de

medição. Para tal, expõem-se duas abordagens estatísticas diferentes, frequentemente reportadas em diversos estudos (35): regressão linear; gráfico de dispersão de Bland-Altman. A metodologia aplicada referencia-se a um código partilhado na comunidade MATLAB<sup>1</sup>, tendo-se adaptado o mesmo à estrutura dos dados manipulados no presente programa.

Para as técnicas de regressão linear, estimou-se a reta que melhor se ajusta à relação entre as amplitudes dos MEPs obtidas pelos dois métodos, através da minimização da soma dos resíduos quadrados (SSE). A qualidade do ajuste linear é estimada pelo coeficiente de determinação  $r^2$ , com  $r$  como sendo o coeficiente de correlação. A significância do  $r$  obtido é avaliada segundo um teste de hipóteses que considera a não existência de correlação entre as medições, para um nível de significância de  $p = 0.05$ .

Relativamente ao gráfico de dispersão de Bland-Altman, refere-se a um método que permite analisar as diferenças entre as medições face à média das mesmas, auxiliando-se visualmente como *bias* (média das diferenças) e limites de concordância (LOAs) que estabelecem um intervalo de 95% de confiança face ao *bias*. Sem conhecimento *a priori* se a distribuição das diferenças entre as medições segue uma distribuição normal, adotou-se uma abordagem não-paramétrica, com o *bias* como sendo a mediana das diferenças e os LOAs definidos em  $bias \pm 1,45 \cdot IQR$ , com IQR como sendo a distância entre o primeiro e terceiro quartis das diferenças. A validação desta análise não-paramétrica é realizada através do teste de Wilcoxon, para um nível de significância de  $p = 0.05$ .

De referir que para as análises realizadas apenas se consideraram os pares de medição em que não ocorreu falha na deteção do artefacto de TMS e, consequentemente, o algoritmo procedeu à quantificação do MEP respetivo, associando-se à variável  $n$  o número de pares de medições contabilizados nas técnicas de regressão linear e Bland-Altman. Apenas para visualização gráfica de todos os pares de medições, no gráfico de regressão linear associa-se o valor 0 à medição automática da amplitude do MEP quando ocorre falha na deteção do artefacto de TMS.

## 6.2 Variabilidade da Curva de Boltzmann

De forma a avaliar a validade dos pressupostos considerados no ajuste da curva de Boltzmann, nomeadamente de que a variabilidade das amplitudes dos MEPs é modulada por ruído aditivo gaussiano, construíram-se gráficos de dispersão da amplitude dos MEPs face à intensidade de estimulação (%RMT), bem como se obteve a distribuição marginal da amplitude dos MEPs para cada intensidade de estimulação (função *scatterhist* do MATLAB). Adicionalmente, e de forma a fundamentar a posterior discussão, calculou-se o coeficiente de variação ( $CV = \frac{\sigma}{\mu}$ ) da amplitude dos MEPs para cada intensidade de estimulação, enquanto medida comum para aceder à dispersão de distribuições marginais (26).

---

<sup>1</sup> Klein R. Bland-Altman and Correlation Plot [Internet]. 2019. Disponível em: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/45049-bland-altman-and-correlation-plot>



### III. Resultados e Discussão

Nas seguintes subseções apresentam-se os resultados referentes a dois participantes: ao NF1107 refere-se a análise do protocolo ppTMS (sequência SICI), sendo o HQCTR6 relativo ao protocolo da curva de recrutamento. Selecionaram-se os participantes referidos devido à relevância que representam para a discussão das condições de validade do algoritmo, permitindo destacar as suas limitações bem como abordagens adicionais e/ou alternativas que futuramente poderão justificar a sua reformulação.

Ainda assim, destaca-se que o algoritmo foi testado para outros participantes, não se tendo verificado nenhuma anomalia no seu desempenho. Adicionalmente, para efeitos de reprodução da medição humana, todas as falhas que serão mencionadas são facilmente corrigidas recorrendo à interface desenvolvida.

#### 7. Concordância entre Métodos de Medição

Como ponto de partida, expõem-se os resultados que estabelecem a comparação entre os dois métodos de medição das amplitudes dos MEPs (medição manual vs. automática), distinguindo-se a análise dos gráficos de regressão linear (figuras 9 e 11) dos de Bland-Altman (figura 10)

Relativamente ao participante HQCTR6, para uma amostra de  $n = 60$  medições obteve-se um ajuste linear perfeito ( $SSE = 0$  e  $r^2 = 1$ ) dos dados (figura 9) traduzido por  $y = x$ , denotando-se uma correlação exata de  $r = 1$  com uma significância estatística absoluta ( $p = 0$ ). Com base nisto, concluiria-se que o algoritmo conduziu à reprodutibilidade exata das amplitudes dos MEPs obtidas por medição manual, com recurso ao *software* de análise *Acqknowledge*.

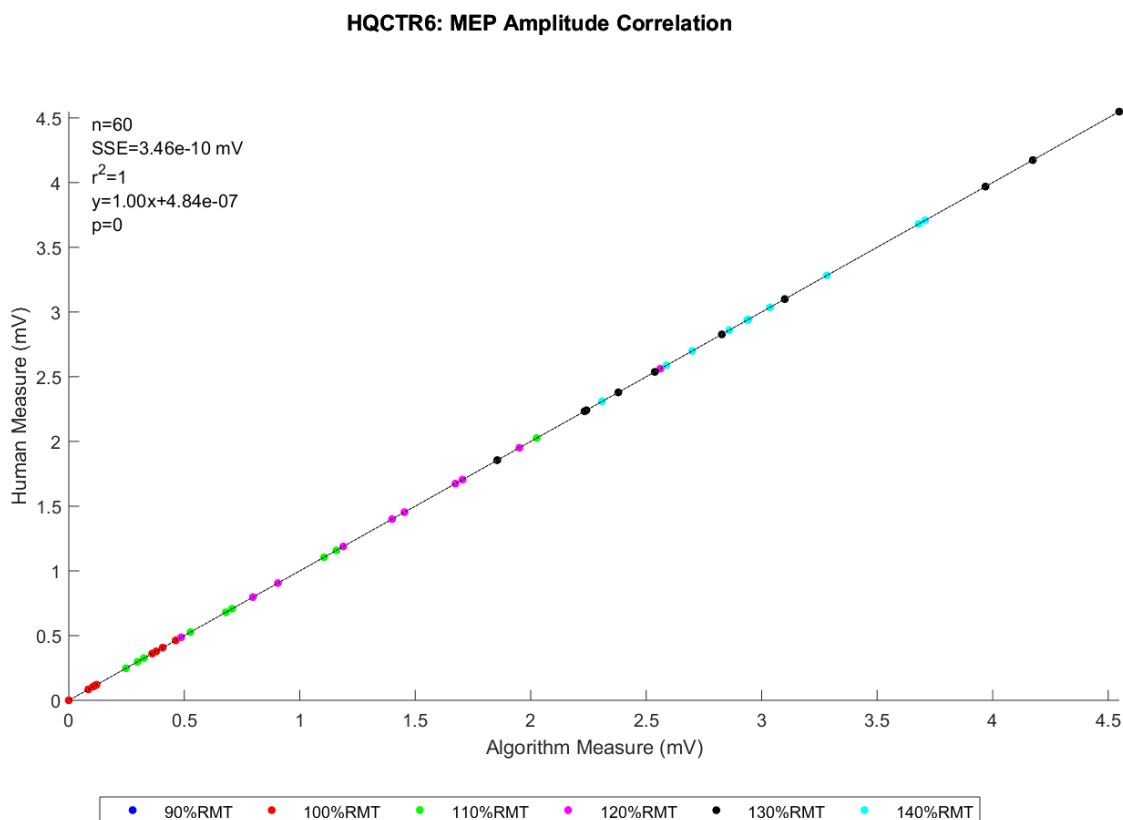


Figura 9 – Gráfico da regressão linear dos  $n = 60$  pares de medições das amplitudes dos MEPs associadas aos dois métodos, relativo ao participante HQCTR6, com a qualidade do ajuste quantificada pelo coeficiente de correlação,  $r^2$ , e soma dos resíduos quadrados, SSE. Significância da correlação  $r$  especificada por  $p$ .

Ainda assim, para o mesmo grupo de medições, o gráfico de Bland-Altman (figura 10) destaca uma variabilidade não nula das diferenças entre as medições, encontrando-se as mesmas dispersas em torno dum *bias* de 0. No entanto, as diferenças consideradas são da ordem dos  $10^{-6}$  mV, sendo desprovidas de qualquer significado biológico e analiticamente justificadas pela precisão associada aos métodos de medição, com a medição humana associada a uma precisão de 5 algarismos decimais, e a do algoritmo associada à precisão da representação de *doubles* em MATLAB. Deste modo, conclui-se que os dois métodos reproduziram a mesma quantificação com significado fisiológico dos MEPs.

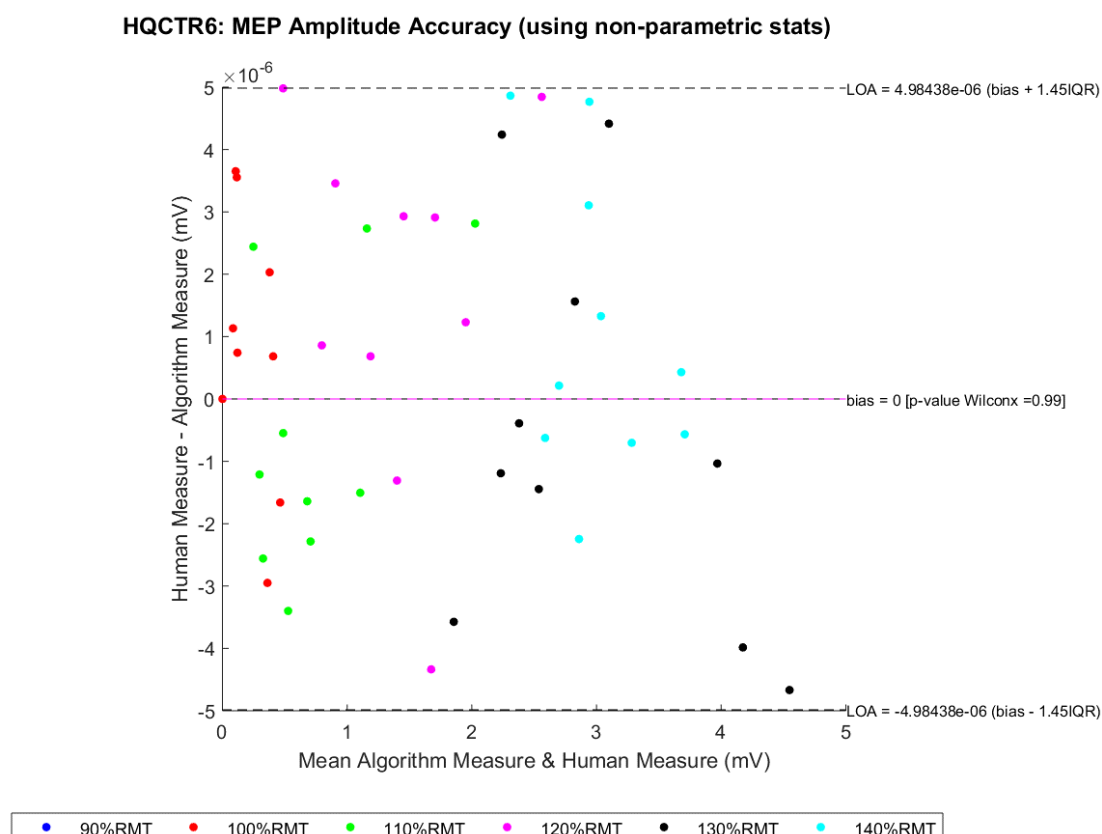


Figura 10 – Gráfico de Bland-Altman dos  $n = 60$  pares de medições das amplitudes dos MEPs associadas aos dois métodos, relativo ao participante HQCTR6. Visualização gráfica do *bias* e LOAs, que assumem valores da ordem dos  $10^{-6}$  mV. Validade da abordagem não-paramétrica quantificada pelo *p-value* do teste de Wilconx.

Por outro lado, para o participante NF1107 o ajuste linear (figura 11) foi realizado apenas para 38 de 40 pares de medições, traduzindo-se numa reta dada por  $y = 1.01x - 0.0177$ , obtendo-se um  $SSE = 0.0727$  mV essencialmente resultante da discrepância para o par de medições contabilizado no ajuste linear e associado ao ISI de 5 ms. Relativamente a este último, o algoritmo detetou e procedeu à quantificação do MEP quando a medição humana não o considerou, revelando um aspeto crítico do algoritmo: quando o ruído de fundo assume amplitudes superiores a 0.05 mV, poder-se-á erroneamente considerar como um MEP.

Relativamente aos dois pares de medições excluídos relativos ao ISI = 0 ms, constatou-se que o algoritmo não procedeu à quantificação da amplitude do MEP devido à falha na deteção do respetivo artefacto de TMS. Propostas de resolução das falhas mencionadas encontram-se na secção seguinte.



### NF1107: MEP Amplitude Correlation

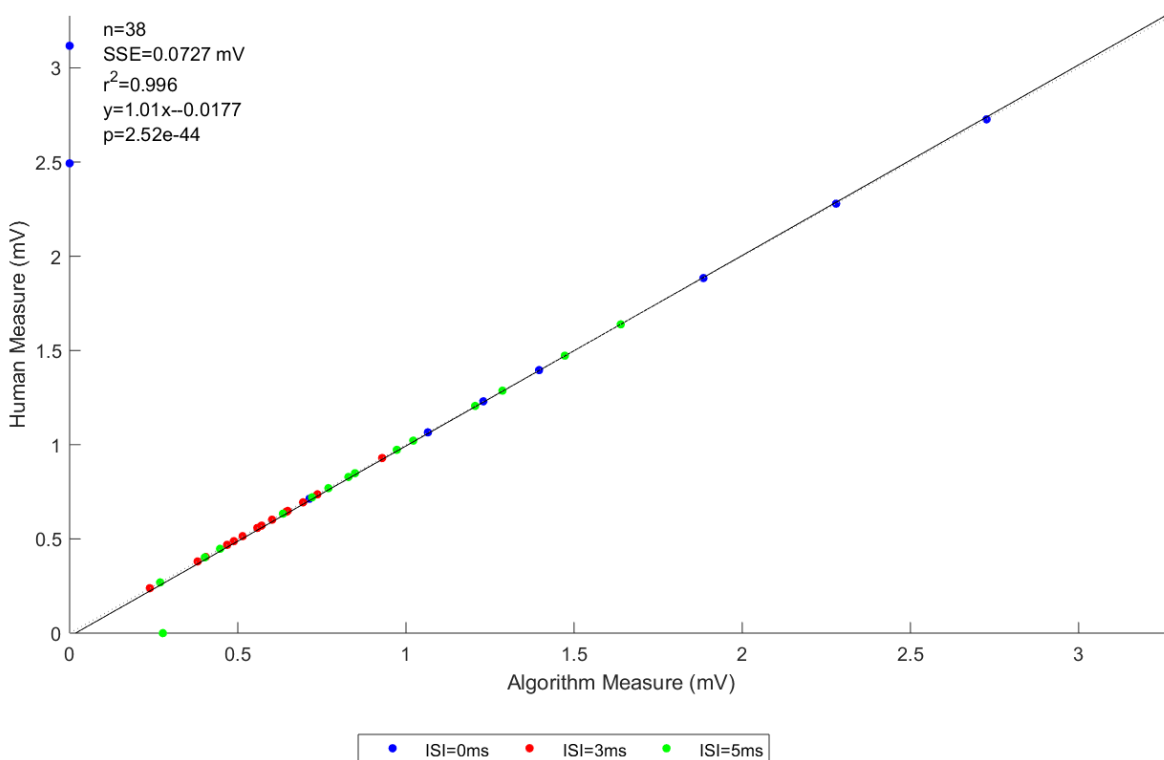


Figura 11 – Gráfico da regressão linear de  $n = 38$  pares de medições face a 40 existentes das amplitudes dos MEPs associadas aos dois métodos, relativo ao participante NF1107, com a qualidade do ajuste quantificada pelo coeficiente de correlação,  $r^2$ , e soma dos resíduos quadrados, SSE. Significância da correlação  $r$  especificada por  $p$ . Destaque para a falha na quantificação pelo algoritmo dos MEPs associados aos 2 pares de medição excluídos (ISI = 0 ms).

Destaca-se que o gráfico de Bland-Altman relativo ao NF1107 não é exposto devido à falta de legibilidade, não permitindo visualizar graficamente o *bias* ( $8.8880e-07 \text{ mV}$ ) nem os LOAs ( $8.87479e-06$  e  $-7.09719e-06 \text{ mV}$ ), ao assumirem valores consideravelmente inferiores à diferença correspondente ao par de medições em que houve uma discrepância significativa entre os métodos (a diferença assume o valor de  $-0.2771 \text{ mV}$ ). Para constatação disso mesmo, anexa-se o gráfico na secção E.

## 8. Quantificação dos MEPs

### 8.1 Detecção dos Artefactos de TMS

Elucidada na metodologia aplicada (secções 5.3 e 5.4), a quantificação dos MEPs depende da correta deteção dos artefactos de TMS, com esta última auxiliada pela deteção de máximos locais idealmente correspondentes às amplitudes máximas dos dois picos do primeiro artefacto de TMS retificado, relativo a um dado segmento. Contudo, como resultado da digitalização de  $10 \text{ kHz}$ , o sinal analógico é representado com uma resolução temporal de  $0.1 \text{ ms}$ , dando origem a *flat-peaks*, a designada aparência *jagged* (figura 12).

A função *findpeaks* é sensível a estes *flat-peaks* (tal como expresso na documentação do MATLAB relativa a essa função), sendo que se cumpridas as condições impostas à sua deteção (ver secção 5.3) justificam-se as oscilações mais pronunciadas no gráfico da distribuição das amplitudes do primeiro pico do artefacto de TMS detetado, tal como se constatou no participante NF1101 (ver anexo E).

Por outro lado, o referido anteriormente também pode conduzir à falha na deteção do artefacto, nomeadamente na fase de otimização da sua deteção, correspondente à identificação de amplitudes *outliers* (ver secção 5.3). Para o participante NF1107, os artefactos tinham sido todos eles corretamente identificados (figura 13), apenas com as oscilações já mencionadas da deteção de *flat-peaks* e, também, das condições experimentais. Contudo, o algoritmo por ser bastante sensível a essas oscilações deteta *outliers*, e regula a amplitude mínima dos dois picos a detetar para uma consideravelmente superior à anteriormente estabelecida a partir da estimativa da amplitude do ruído de fundo. Se não existirem dois *flat-peaks* que distem um valor contido no intervalo estabelecido pelo padrão da *baseline* do artefacto de TMS e que não possuam a amplitude mínima estabelecida, não se detetará o artefacto de TMS. Tal verificou-se para o primeiro e terceiro registos das *baselines* no participante NF1107 (figura 14), que produzem as discrepâncias observadas no gráfico da regressão linear exposto na secção anterior.

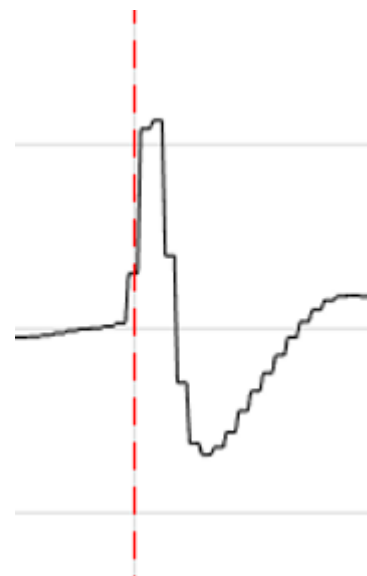


Figura 12 – Exemplo da deteção dum *flat-peak* do artefacto de TMS (*single-pulse*).

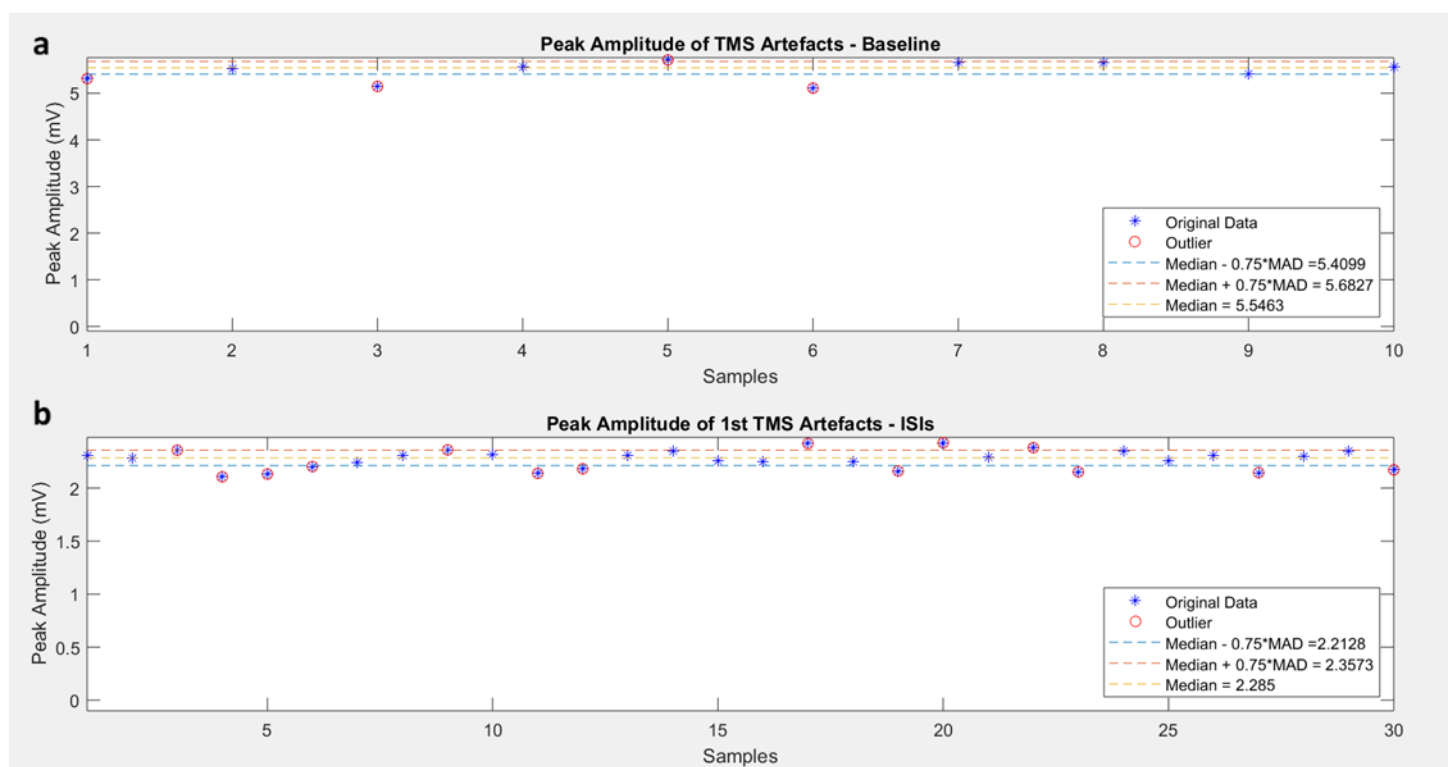


Figura 13 – Distribuição das amplitudes dos pulsos de TMS detetados pelo algoritmo, distinguindo-se os (a) *single-pulse* (120% $S_{1mV}$ ) dos (b) CS (80% $S_{1mV}$ ) no protocolo SICI, relativo ao participante NF1107. Para um *threshold* de 0.75 do MAD face à mediana das amplitudes, constroem-se os limites da região de aceitação onde se encontram amplitudes não-*outliers*.

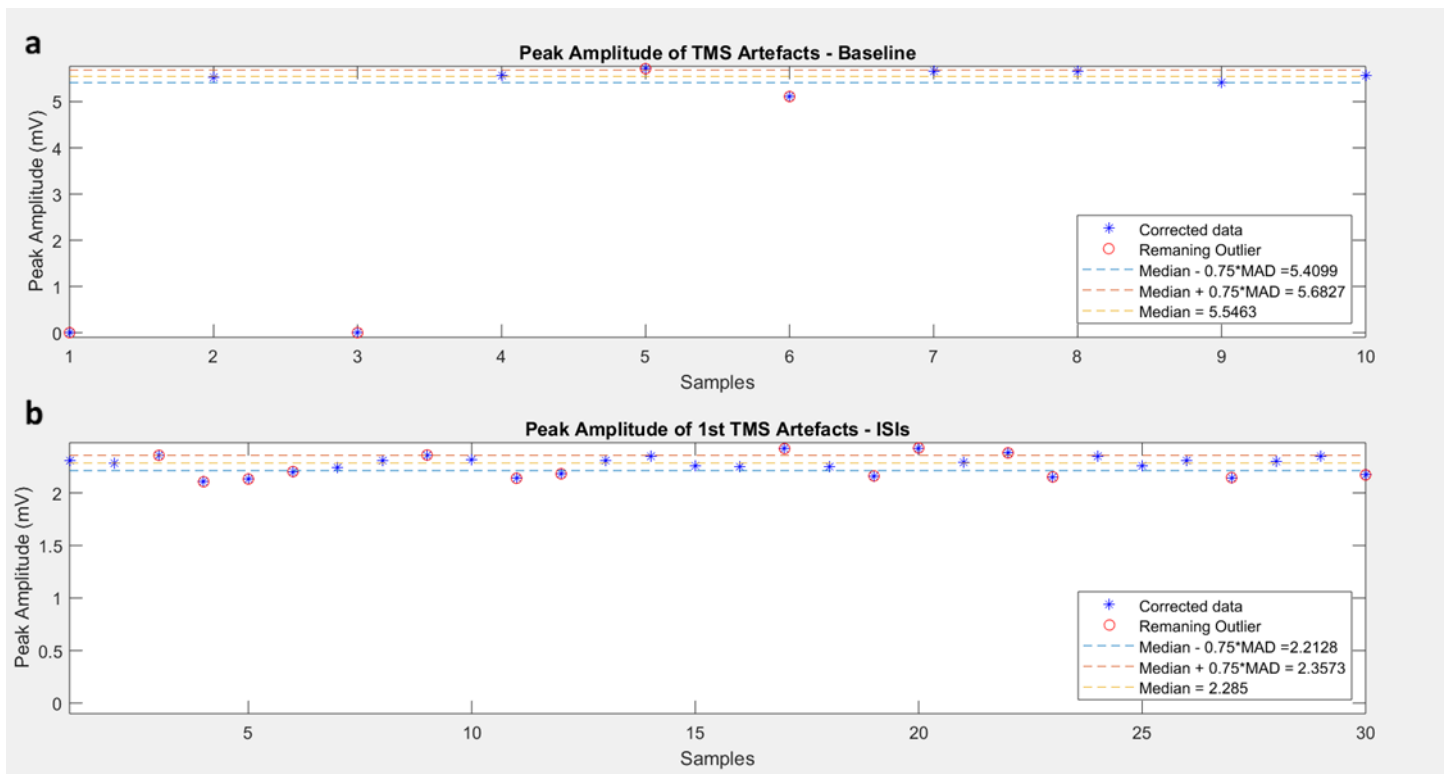


Figura 14 –Distribuição das amplitudes dos pulsos de TMS após correção pelo algoritmo de detecção dos artefactos de TMS, para o protocolo SICI relativo ao participante NF1107. Destaque para a falha na detecção da primeira e terceira respostas das *baselines* em (a).

Nesse sentido, pretende-se futuramente proceder à interpolação do artefacto de TMS durante a sua fase de detecção, recorrendo-se, por exemplo, a um polinómio de terceira ordem, como a *spline*. Tal permitirá representar os artefactos com transições mais suaves, regulando a sensibilidade da detecção para as amplitudes máximas dos dois picos do artefacto de TMS.

## 8.2 Métrica de Quantificação dos MEPs

Como já mencionado, um aspeto crítico associado à metodologia aplicada refere-se à quantificação dos MEPs segundo o critério definido na secção 5.4, particularmente nos casos em que o MEP é dificilmente distinguido do ruído de fundo, podendo conduzir a falsos positivos (detecção errónea do MEP) ou falsos negativos (não detecção do MEP).

Nesse sentido, autores (36) sugerem a análise em tempo-frequência (TFA) enquanto mais representativa da natureza do sinal EMG face à exclusiva análise temporal. Enquanto argumentação, demonstraram a análise para doentes com lesões na medula espinhal e controlos saudáveis, concluindo que a dispersão de energia no domínio tempo-frequência é um biomarcador do estado patológico. Para além disso, demonstraram uma correlação elevada do instante temporal e amplitude do máximo de energia do espectro de potência do MEP com, respetivamente, as métricas da latência e amplitude no domínio temporal. Resumidamente, destacam a versatilidade da TFA e a possibilidade de monitorizar o desvio no tempo e na

frequência da energia do sinal, assim como avaliar o grau de energia perdida e dispersa em casos de comparação pré e pós intervenção farmacológica e/ou cirúrgica em situações patológicas.

Posto isto, pretende-se futuramente testar esta nova métrica de quantificação dos MEPs, sendo necessário avaliar qual o método de TFA mais indicado para esse fim e que possibilite uma análise com uma resolução satisfatória no domínio das frequências e do tempo.

## 9. Curva de Recrutamento de Boltzmann

Relativamente ao participante HQCTR6, o ajuste da curva sigmóide de Boltzmann às amplitudes médias dos MEPs para cada intensidade de estimulação aplicada (figura 15) permitiu sensivelmente uma modulação completa da curva de recrutamento, denotando-se as regiões constantes da *baseline* e de saturação, bem como a transição entre as mesmas. Com base no ajuste, estimou-se o  $s_{50}$  (121.5622%RMT) e o declive da região linear (0.1937) e o RMT (112.4364%RMT, expresso em função do RMT experimental).

Ainda assim, destaca-se o desvio médio MSE de 0.10781 mV das amplitudes experimentais face às estimadas pela regressão não-linear, que assume a mesma ordem de grandeza das amplitudes dos MEPs para baixas intensidades de estimulação, conferindo-se um grau de incerteza às estimativas dos parâmetros extraídos.

Numa primeira análise, os resíduos obtidos podiam ser minimizados através da aplicação dum maior número de pulsos de TMS de diferentes intensidades de estimulação, possibilitando-se uma melhor

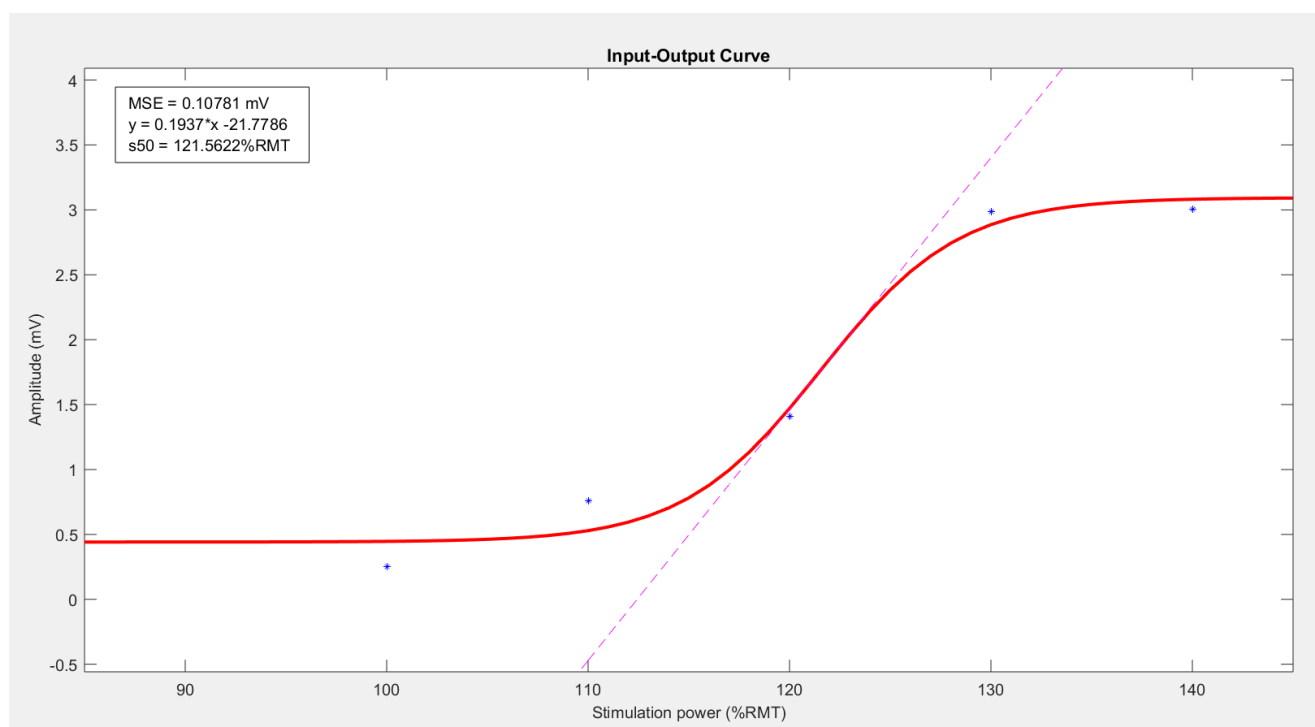


Figura 15 – Ajuste de Boltzmann à curva de recrutamento, cuja qualidade do ajuste é quantificada pela média dos resíduos quadrados, MSE. Representação gráfica do declive da região linear, especificando-se a equação da reta respetiva. Parâmetro  $s_{50}$  relativo ao ponto de inflexão da curva, sensivelmente correspondente ao ponto médio da região linear. Destaca-se que para 90%RMT não foram registados MEPs.

amostragem das diferentes regiões da curva e, conseqüentemente, estimativas do  $s_{50}$  e declive da região linear mais fidedignas.

Por outro lado, o pressuposto de que a variabilidade das amplitudes dos MEPs é modulada por ruído aditivo gaussiano permite a contabilização de amplitudes negativas, nomeadamente na região da *baseline* e início da região linear associada a uma estimativa do RMT. O referido não tem qualquer significado biofísico, visto as amplitudes dos MEPs serem sempre positivas, podendo-se atribuir um *bias* à estimativa da curva de recrutamento consoante o desvio-padrão da distribuição gaussiana dos resíduos (26).

## 9.1 Modulação da Variabilidade da Curva de Recrutamento

Visando-se uma análise mais aprofundada da variabilidade das amplitudes dos MEPs, constata-se na figura 16 (b), através das distribuições marginais, que a mesma difere consoante a intensidade de estimulação aplicada. Para além disto, as distribuições marginais apresentam diferentes graus de *skewness*, assim como por vezes são bimodais (110% e 130% do RMT), não sendo moduladas por uma distribuição normal tal como técnicas de minimização dos resíduos quadrados assumem, nomeadamente o ajuste da sigmóide de Boltzmann aplicado.

Relativamente ao gráfico que traduz a dispersão das amplitudes dos MEPs (figura 16 (a)), para as intensidades de estimulação relativas ao  $EMG_{base}$  verifica-se uma dispersão desviada para amplitudes superiores, justificado na literatura (26) como resultante de flutuações intrínsecas da excitabilidade neurocortical traduzidas por alterações do limiar de ação dos interneurónios e neurónios piramidais. Por sua vez, para as intensidades mais intermédias correspondentes à região linear, verifica-se uma dispersão considerável das amplitudes dos MEPs, justificado pela ativação de diferentes motoneurónios que têm associado o seu próprio limiar de ação, resultando em diferentes graus de dessincronização dos MUAPs e consequente variabilidade nas amplitudes dos MEPs. Por fim, relativamente às intensidades mais próximas do nível de saturação, a dispersão ocorre sensivelmente para amplitudes superiores ao ponto de acumulação, estando esta variabilidade associada, entre outros fatores, ao número de vezes que os motoneurónios são

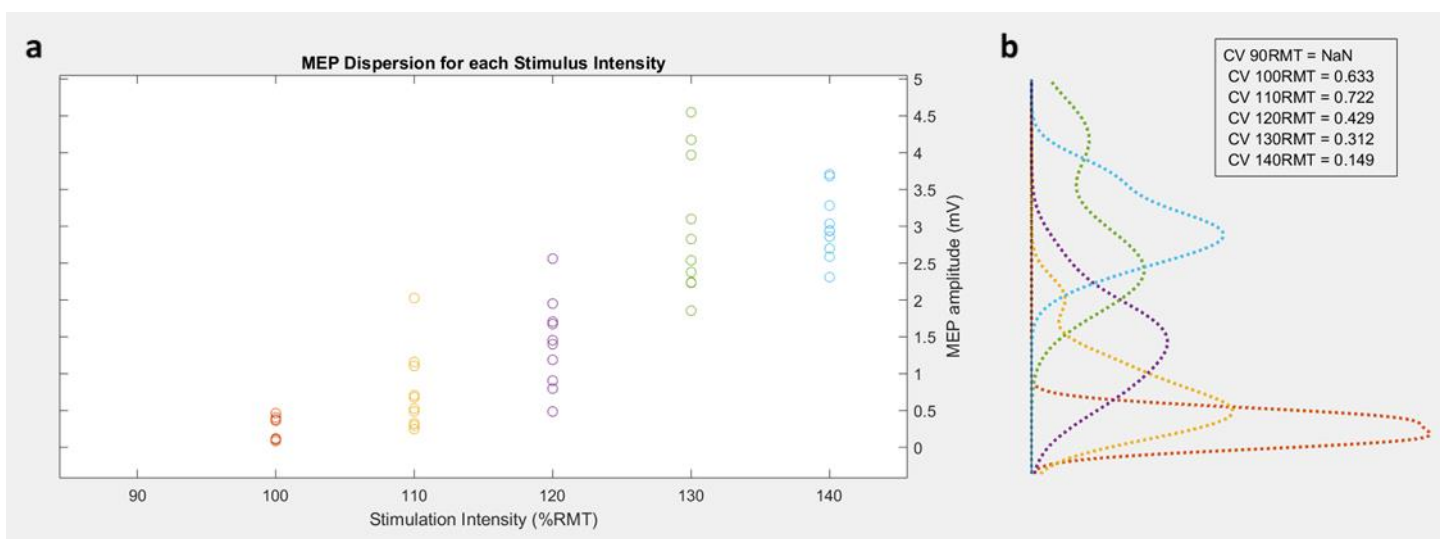


Figura 16 – Gráfico de (a) dispersão e respetivas (b) distribuições marginais das amplitudes dos MEPs para cada intensidade de estimulação aplicada. Destaca-se que para 90%RMT não foram registados MEPs. Especificação do CV associado a cada distribuição marginal, concluindo-se existir uma dependência da variabilidade dos MEPs face à intensidade de estimulação.

ativos, sendo que quando ativos mais do que uma vez conduzem a uma resposta de maior amplitude. Deste modo, sem contextualização fisiológica, o que poderia ser considerado como uma amplitude de MEP *outlier* diz apenas respeito a uma distribuição de variabilidade intrínseca que apresenta dependência com a intensidade de estimulação. Contudo, devido aos diferentes graus de *skewness* que caracterizam estas distribuições marginais, em particular das regiões extremas que definem a região linear, a sua incorreta incorporação na modelação do ajuste aos pontos da curva de recrutamento (ajuste de Boltzman) possivelmente levou a uma subestimação do declive da região linear da curva. Tal suposição deve-se à constatação de que sensivelmente no início da região linear (110%RMT) a dispersão das amplitudes verifica-se para valores superiores ao ponto de acumulação das amplitudes, paralelamente ao facto de que para intensidades mais próximas do nível de saturação (140%RMT) esse desvio verifica-se para amplitudes inferiores ao ponto de acumulação.

A traduzir o anteriormente referido, denota-se a partir do CV que a variabilidade dos MEPs é máxima para a intensidade de 110%RMT. Após esta, denota-se uma relação inversa entre o CV e a intensidade de estimulação aplicada, associando-se aos MEPs de intensidades superiores uma variabilidade inferior.

O resultados apresentados e discutidos foram semelhantes aos reportados noutro estudo (26), ainda que a aplicação dum maior número de diferentes intensidades de estimulação permitisse uma melhor caracterização da evolução da variabilidade das amplitudes dos MEPs. Com base nisto, conclui-se que o ruído gaussiano aditivo considerado no ajuste da curva de recrutamento não contabiliza a dependência da variabilidade dos MEPs com a intensidade de estimulação aplicada.

Posto isto, modelos probabilísticos que melhor incorporam a variabilidade do recrutamento das unidades motoras, reportam uma melhor modulação das diferentes distribuições da variabilidade dos MEPs consoante a intensidade de estimulação aplicada (distribuições bimodais e diferentes graus de *skewness*), possibilitando estimativas estatisticamente mais significativas dos parâmetros extraídos da curva (26,36).

## IV. Limitações da Aquisição Experimental

De seguida, destacam-se aspetos críticos da aquisição experimental TMS-EMG que comprometem a extração de parâmetros representativos da excitabilidade e integridade corticomotora, tanto por parte do algoritmo como na avaliação humana.

### Técnicas de Pré-Processamento

A partir da magnitude da FFT do traçado contínuo do sinal EMG, revela-se uma modulação em torno da harmónica de 50 Hz (figura 17), surgindo questões acerca de etapas de pré-processamento de filtragem analógica que possam ter sido efetuadas enquanto tentativa de remoção de ruído eletromagnético, ainda que aparentemente defeituosa e possivelmente responsável pela remoção de componentes em frequência relevantes do sinal EMG, cuja energia dominante se situa entre 20 a 400 Hz (30). Trata-se, portanto, de algo que deverá ser avaliado quanto ao seu impacto, nomeadamente nas amplitudes dos MEPs.

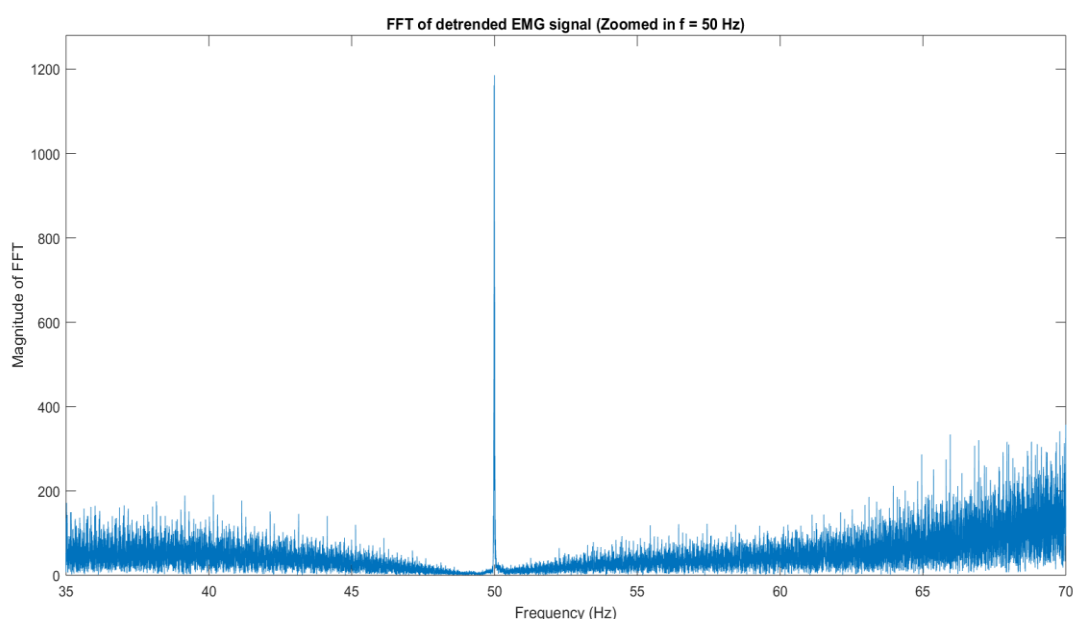


Figura 17 – FFT do traçado contínuo do sinal EMG *detrended*, ampliando-se em torno do pico de 50 Hz. Visualização de uma aparente modulação do sinal EMG, possivelmente devida a técnicas de filtragem analógica de pré-processamento.

### Registo de *Triggers* dos Pulsos de TMS

Um dos algoritmos mais exaustivos implementados no programa diz respeito à deteção dos artefactos de TMS, e ao qual poderão estar associadas falhas na quantificação dos MEPs. Nesse sentido, destaca-se a importância de se regularizar o registo dos *triggers* identificativos dos instantes temporais exatos em que os pulsos de TMS são aplicados, sendo que, se corretamente efetuado, seria muito facilitador de todo o processamento realizado.

### **Crêterios de Normalização das Intensidades**

Face à estimativa do RMT a partir da curva de recrutamento para o participante HQCTR6 (112.44%RMT, expresso em função do RMT experimental), e a qual é superior é considerada na aquisição experimental (na curva de recrutamento corresponde a 100%RMT), evidencia-se a fragilidade associada aos critérios de normalização das intensidades de estimulação que estabelecem voltagens fixas da amplitude dos MEPs, não contabilizando a variabilidade da excitabilidade corticomotora inter-participante, podendo os critérios de 1 mV e 0.05 mV corresponder a diferentes regiões da curva de recrutamento para diferentes participantes.

Aliás, e apesar de não se possuir os dados experimentais referentes ao protocolo ppTMS para o HQCTR6, prevê-se que o critério S1mV não possibilitará testar devidamente a inibição cortical envolvida nas sequências LICI e SICI, visto a amplitude de 1 mV estar sensivelmente próxima da baseline da curva de recrutamento. Por outro lado, se o S1mV tivesse associada a uma intensidade de estimulação próxima da região de saturação, pouco se poderia aferir relativamente a fen menos de facilitação, principalmente envolvidos no ICF. Por essa razão, autores (24) sugerem que se utilize o  $s_{50}$  enquanto intensidade de estimulação do TS para o protocolo ppTMS, visto providenciar uma intensidade representativa de cada participante que possibilita a medição de inibição e facilitação dos MEPs.

Nesse sentido, propõe-se que, primeiramente, se deverá proceder à modulação da curva de recrutamento e, a partir dos parâmetros extraídos do  $s_{50}$  ou RMT, normalizar as intensidades de estimulação para os restantes protocolos de TMS. Deste modo, o algoritmo e interface desenvolvidos revelam-se de grande utilidade, ao permitirem uma rápida avaliação do protocolo da curva de recrutamento, que anteriormente constituía o grande impedimento às estimativas prévias do  $s_{50}$  e RMT a partir da curva.





## V. Conclusão

Na perspectiva de avaliar o desempenho do algoritmo relativamente à reprodutibilidade das medições manuais da amplitude dos MEPs, os resultados apresentados revelaram, para a grande maioria das medições, uma concordância significativa na quantificação automática *versus* manual, verificando-se para esses mesmos casos diferenças entre as medições unicamente devidas à precisão envolvida na quantificação realizada pelos dois métodos. Decorrente disto, demonstrou-se a eficiência dos algoritmos de deteção dos artefactos de TMS, bem como os referentes à deteção e quantificação dos MEPs, contudo não isentes de falhas esporádicas e que conduziram a discrepâncias face à quantificação humana. Nesse sentido, destaca-se a relevância da interface desenvolvida, ao possibilitar uma intuitiva correção por parte do utilizador da quantificação das amplitudes dos MEPs e instante temporal de ocorrência dos artefactos de TMS. Deste modo, conclui-se que o programa desenvolvido, que integra o algoritmo de processamento do sinal EMG e interface de visualização e correção dos resultados, revelou-se uma ferramenta potencialmente robusta para a reprodutibilidade automática das medições humanas envolvidas nos protocolos ppTMS e curva de recrutamento. Contudo, e tendo em conta a variabilidade inter-participante intrínseca à aplicação da TMS, pretende-se, futuramente, testar o desempenho do algoritmo com dados recolhidos de uma maior amostra de participantes, com vista a validar a sua eficácia de uma forma mais fundamentada e com maior poder estatístico.

Numa análise mais retrospectiva aos métodos aplicados no algoritmo de processamento dos MEPs, concluiu-se acerca da importância de incluir devidamente a variabilidade estocástica característica dos mesmos, e não contabilizada no ajuste de Boltzmann realizado à curva de recrutamento, que assume distribuições gaussianas e introduz *bias* às estimativas dos parâmetros extraídos da curva. Adicionalmente, concluiu-se que a amplitude pico-a-pico dos MEPs poderá não ser a mais representativa para a sua correta quantificação, nomeadamente quando apresentam amplitudes dificilmente distintas do ruído de fundo, destacando-se a monitorização da energia no espectro de potência dos MEPs no domínio tempo-frequência como potencialmente mais representativa.

Posto isto, continuar-se-á a tentar otimizar o algoritmo de processamento do sinal EMG tendo em conta as alternativas apresentadas ao longo do relatório, relativas à deteção automática dos artefactos de TMS e quantificação dos MEPs. Adicionalmente, pretende-se estender as funcionalidades do algoritmo ao tratamento de um terceiro protocolo experimental da TMS-EMG: Período de Silêncio Cortical.

Enquanto reflexão acerca da aprendizagem que este estágio representou, de facto foi um período de grande enriquecimento numa área que me fascina, permitindo-me ganhar uma melhor noção da complexidade envolvida no processamento de sinais fisiológicos, ansiando pelos anos académicos que se avizinham para ganhar uma maior capacidade em cumprir a exigência envolvida no tratamento de dados.



## Referências

1. Boyd K, Bruce R, Theos A. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(1):1–16.
2. Violante IR, Ribeiro MJ, Edden RAE, Guimarães P, Bernardino I, Rebola J, et al. GABA deficit in the visual cortex of patients with neurofibromatosis type 1: Genotype-phenotype correlations and functional impact. *Brain*. 2013;136(3):918–25.
3. Violante IR, Patricio M, Bernardino I, Rebola J, Abrunhosa AJ, Ferreira N, et al. GABA deficiency in NF1. *Neurology*. 2016;87(9):897–904.
4. Bearden CE, Hellemann GS, Rosser T, Montojo C, Jonas R, Enrique N, et al. A randomized placebo-controlled lovastatin trial for neurobehavioral function in neurofibromatosis I. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016;3(4):266–79.
5. Schutter DJLG, Van Honk J, Panksepp J. Introducing Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) and its property of causal inference in investigating brain-function relationships. *Synthese*. 2004;141(2):155–73.
6. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A, Avanzini G, Bestmann S, et al. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol* [Internet]. 2009;120(12):2008–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2009.08.016>
7. Harquel S. Stimulation magnétique transcrânienne robotisée : de l'automatisation des protocoles à de nouvelles approches en neuroimagerie fonctionnelle Sylvain Harquel To cite this version : HAL Id : tel-01693356. 2018;
8. Mashat MEM, Li G, Zhang D. Human-to-human closed-loop control based on brain-to-brain interface and muscle-to-muscle interface. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10957-z>
9. S. Groppaa, A. Olivierob, A. Eisenc, A. Quartaroned, L.G. Cohene, V. Mallf, A. Kaelin-Langg, T. Mimah, S. Rossii, G.W. Thickbroomj, P.M. Rossinik, U. Ziemannl, J. Valls-Solém and HRS. A practical guide to diagnostic transcranial magnetic stimulation: Report of an IFCN committee. 2016;123(5):148–55.
10. Vitikainen A-M. Navigated transcranial magnetic stimulation in preoperative functional mappings for patients with epilepsy [Internet]. 2016. Available from: <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/160259>
11. Salvador R. Universidade de Lisboa Numerical modelling in Transcranial Magnetic Stimulation. 2009;
12. Di Lazzaro V, Profice P, Ranieri F, Capone F, Dileone M, Oliviero A, et al. I-wave origin and modulation. *Brain Stimul Basic, Transl Clin Res Neuromodulation* [Internet]. 2012 Oct 1;5(4):512–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brs.2011.07.008>
13. Farzan F, S. M, B. P, J. Z. Combination of Transcranial Magnetic Stimulation with Electromyography and Electroencephalography: Application in Diagnosis of Neuropsychiatric Disorders. *EMG Methods Eval Muscle Nerve Funct*. 2012;
14. Kobayashi M, Pascual-Leone A. Basic principles of magnetic stimulation. *Lancet*. 2003;2:145–56.
15. Klomjai W, Katz R, Lackmy-Vallée A. Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS). *Ann Phys Rehabil Med*. 2015;58(4):208–13.
16. Lefaucheur JP. Transcranial magnetic stimulation. *Handb Clin Neurol*. 2019;160(June):559–80.
17. Liu Z. Electromyographic Signal Processing With Application To Spinal Cord Injury. 2016;2016.

18. Bestmann S, Krakauer JW. The uses and interpretations of the motor-evoked potential for understanding behaviour. *Exp Brain Res*. 2015;233(3):679–89.
19. Tremblay S, Beaulé V, Proulx S, de Beaumont L, Marjanska M, Doyon J, et al. Relationship between transcranial magnetic stimulation measures of intracortical inhibition and spectroscopy measures of GABA and glutamate+glutamine. *J Neurophysiol* [Internet]. 2012/12/05. 2013 Mar;109(5):1343–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221412>
20. Ilić T V., Meintzschel F, Cleff U, Ruge D, Kessler KR, Ziemann U. Short-interval paired-pulse inhibition and facilitation of human motor cortex: The dimension of stimulus intensity. *J Physiol*. 2002;545(1):153–67.
21. J Nelson A. Transcranial Magnetic Stimulation to Investigate Motor Cortical Circuitry and Plasticity in Spinal Cord Injury. *J Neurol Stroke*. 2014;1(2):60–8.
22. Elisabeth J. The role of GABAergic neurotransmission in the human brain probed by paired-pulse TMS-EEG. 2019;
23. Dominguez LG, Radhu N, Farzan F, Daskalakis ZJ. Characterizing long interval cortical inhibition over the time-frequency domain. *PLoS One*. 2014;9(3):1–13.
24. Kukke SN, Paine RW, Chao CC, De Campos AC, Hallett M. Efficient and reliable characterization of the corticospinal system using transcranial magnetic stimulation. *J Clin Neurophysiol*. 2014;31(3):246–52.
25. CHRISTOPHER W. WRIGHT. VARIABILITY OF THE MOTOR EVOKED POTENTIAL by A thesis submitted to the University of Birmingham for the degree of. 2016;(April).
26. Steiner CI, William C, States U. Statistical Modeling of Brain to Muscle Stimulus-Response , Utilizing Transcranial Magnetic Stimulation ( TMS ). 2016;(May).
27. Iazzo PA. Engineering in Medicine: Advances and Challenges [Internet]. Elsevier Science; 2018. Available from: <https://books.google.pt/books?id=FW93DwAAQBAJ>
28. Rogasch NC, Sullivan C, Thomson RH, Rose NS, Bailey NW, Fitzgerald PB, et al. Analysing concurrent transcranial magnetic stimulation and electroencephalographic data: A review and introduction to the open-source TESA software. *Neuroimage* [Internet]. 2017;147(October 2016):934–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.10.031>
29. Newman A. Research Methods for Cognitive Neuroscience [Internet]. SAGE Publications; 2019. Available from: <https://books.google.pt/books?id=mMGKDwAAQBAJ>
30. Supuk TG, Skelin AK, Cic M. Design, Development and Testing of a Low-Cost sEMG System and Its Use in Recording Muscle Activity in Human Gait. *Sensors* [Internet]. 2014;14(5):8235–58. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8220/14/5/8235>
31. Harquel S, Beynel L, Guyader N, Marendaz C, David O, Chauvin A. CortExTool: a toolbox for processing motor cortical excitability measurements by transcranial magnetic stimulation. 2016; Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01390016/>
32. Jackson N, Greenhouse I. VETA: a Matlab toolbox for the collection and analysis of electromyography combined with transcranial magnetic stimulation. *bioRxiv*. 2019;1–31.
33. Ratnadurai Giridharan S, Gupta D, Pal A, Mishra AM, Hill NJ, Carmel JB. Motometrics: A toolbox for annotation and efficient analysis of motor evoked potentials. *Front Neuroinform*. 2019;13(March):1–15.
34. Di Lazzaro V, Rothwell J, Capogna M. Noninvasive Stimulation of the Human Brain: Activation of Multiple Cortical Circuits. *Neuroscientist*. 2018;24(3):246–60.

35. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015 Jun 5;25(2):141-51. doi: 10.11613/BM.2015.015. PMID: 26110027; PMCID: PMC4470095.
36. Hu Y, Luk KDK, Lu WW, Holmes A, Leong JCY. Prevention of spinal cord injury with time-frequency analysis of evoked potentials: An experimental study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;71(6):732–40.
37. Davies. A novel model incorporating two variability sources for describing motor evoked potentials. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
38. Boyd L, Brown KE, Ledwell NM, Neva JL. Use of transcranial magnetic stimulation in the treatment of selected movement disorders. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* [Internet]. 2014 Dec 4 [cited 2019 Oct 8];4:133. Available from: <http://www.dovepress.com/use-of-transcranial-magnetic-stimulation-in-the-treatment-of-selected-peer-reviewed-article-DNND>
39. Farzan F. Single-Pulse Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) Protocols and Outcome Measures. In: Rotenberg A, Horvath JC, Pascual-Leone A, editors. *Transcranial Magnetic Stimulation* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 69–115. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0879-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0879-0_5)
40. Ghosh S, Nagarajan L. Non-invasive brain stimulation in childhood epilepsy. (C):1–9.
41. Rogasch NC, Daskalakis ZJ, Fitzgerald PB. Cortical inhibition, excitation, and connectivity in schizophrenia: A review of insights from transcranial magnetic stimulation. *Schizophr Bull*. 2014;40(3):685–96.
42. Christiansen L, Larsen MN, Grey MJ, Nielsen JB, Lundbye-Jensen J. Long-term progressive motor skill training enhances corticospinal excitability for the ipsilateral hemisphere and motor performance of the untrained hand. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2017;45(12):1490–500. Available from: <https://doi.org/10.1111/ejn.13409>