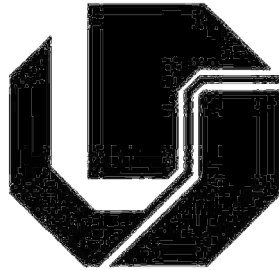


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA



**ANÁLISE DA ESTACIONARIEDADE E
GAUSSIANIDADE DA ATIVIDADE ELÉTRICA
NEURAL, DO RUÍDO BIOLÓGICO E DO
RUÍDO DE INSTRUMENTAÇÃO**

ALINE ROCHA DE ASSIS

Uberlândia

2011

ALINE ROCHA DE ASSIS[‡]

**ANÁLISE DA ESTACIONARIEDADE E
GAUSSIANIDADE DA ATIVIDADE ELÉTRICA
NEURAL, DO RUÍDO BIOLÓGICO E DO
RUÍDO DE INSTRUMENTAÇÃO**

Texto de dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Prof. João Batista Destro Filho, Dr.

Orientador

Prof. Gilberto Arantes Carrijo, Dr.

Co-orientador

Prof. Alexandre Cardoso, Dr.

Coordenador do curso de Pós-Graduação

[‡] A bolsa de estudo para esta pesquisa foi concedida pela FAPEMIG, Brasil.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

**ANÁLISE DA ESTACIONARIEDADE E
GAUSSIANIDADE DA ATIVIDADE ELÉTRICA
NEURAL, DO RUÍDO BIOLÓGICO E DO
RUÍDO DE INSTRUMENTAÇÃO**

ALINE ROCHA DE ASSIS[§]

Texto da dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, perante a banca de examinadores abaixo, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Aprovada em 11 de julho de 2011.

Banca Examinadora:

Prof. João Batista Destro Filho, Dr. – Orientador (UFU)

Prof. Gilberto Arantes Carrijo, Dr. – Co-orientador (UFU)

Prof. Edmilson Rodrigues Pinto, Dr. (UFU-FAMAT)

Prof. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues, Dr. (UFTM)

[§] A bolsa de estudo para esta pesquisa foi concedida pela FAPEMIG, Brasil.

*"Pesquisa é o processo de entrar em vielas para ver se elas são becos sem saída."
Marston Bates*

*Dedico este trabalho aos meus pais, Lázaro e Fátima,
à minha irmã Fernanda e ao meu querido Edgard,
pelo incentivo, carinho e compreensão,
sem os quais essa jornada seria impossível.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida e por guiar meus caminhos, por todas as bênçãos concedidas para superar os momentos difíceis nesta jornada.

Aos meus amados pais, **Fátima e Lázaro**, pelos princípios com que me criaram e pelo carinho e amor que tenho recebido. À minha irmã **Fernanda** por me ajudar a superar a dor nos momentos mais difíceis, pela amizade, e sempre estar do meu lado, incondicionalmente.

A **Edgard Saravia** que entrou em minha vida por ocasião deste trabalho, e assim permanecerá até quando a vida decidir. Pelo amor e carinho que tem me dedicado durante esses dois anos de mestrado e por mais tantos quantos forem necessários.

Ao grande amigo **Rafael Borges**, pelos momentos de ócio, pelas discussões “filosóficas” e pelo apoio “psicológico” durante todos esses anos de luta. À família de **Anízio Barbosa** por terem se tornado “minha família” durante esses sete anos que residi aqui em Uberlândia.

Ao meu orientador **João Batista Destro Filho**, pelo estímulo e atenção dedicados. Ao meu co-orientador **Gilberto Arantes Carrijo** por ser inspiração e por ser exemplo nesta minha jornada pela academia que está apenas se iniciando. À **Universidade de Gênova (UniGe)**, Itália, na figura do Prof. Sergio Martinoia, pela disponibilidade do aparato biológico e experimental que possibilitou a aquisição dos dados.

Ao **Prof. Edmilson** por auxiliar a direcionar o início deste projeto. A **Suélen, Amanda e Janaína** pelo processamento dos dados no *software Spike Manager*.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica** pela oportunidade de realização deste curso. Aos professores e colegas do **Biolab – Laboratório de Engenharia Biomédica** – pela amizade e companheirismo durante estes dois anos de muito trabalho.

À **FAPEMIG**, pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste feito, por me auxiliarem na imensa e inacabável tarefa de auto-conhecimento.

RESUMO

Este trabalho analisa sinais de atividade elétrica neuronal espontânea, mensurados através de dispositivos conhecidos como Arranjos Multieletrodo (“*Multielectrode Array*” – MEA), que constituem o substrato de culturas neuronais do hipocampo do rato. A base de dados sob investigação consiste em cinco sinais: (i) ruído de instrumentação; (ii) ruído biológico; (iii) cultura inativa e (iv) dois experimentos de cultura ativa. Além das quatro medidas estatísticas básicas da amplitude do histograma MEA, o teste da Razão Média e o teste Jarque-Bera foram propostos para estimar o grau de estacionariedade e de Gaussianidade dos dados respectivamente. Os resultados indicam que a análise de estacionariedade baseada na densidade espectral é capaz de diferenciar entre os experimentos de ruído biológico, cultura inativa e ruído de instrumentação. Enquanto isso, a estatística JB separa os experimentos de cultura ativa dos demais, ou seja, a aplicação de MRT conduz a uma conclusão singular: embora ruído biológico e ruído de instrumentação apresentem mais ou menos as mesmas amplitudes e Gaussianidades, o primeiro é essencialmente não-estacionário. Os índices quantitativos propostos apresentaram correlação estatística satisfatória com aqueles da análise clássica de *spikes* para os experimentos de cultura ativa. Assim, pode-se afirmar que a atividade elétrica neuronal de *spikes* e *bursts* apresenta uma notável característica não-estacionária e não-Gaussiana quando comparada ao ruído biológico e ao ruído de instrumentação, que estão muito próximos da estacionariedade e Gaussianidade.

Palavras-chave: matriz multieletrodo, obliquidade, curtose, análise espectral, teste Jarque-Bera.

ABSTRACT

This work analyzes signals of spontaneous neuronal electrical activity, measured by devices known as Multi-Electrode Arrays (MEA), which are the substrate of neuronal cultures of rat hippocampus. The database under investigation consists of five signals: (i) instrumentation noise, (ii) biological noise, (iii) inactive culture and (iv) two active culture experiments. Beyond the four primary statistical measures of the MEA amplitude histogram, the Mean Ratio Test and Jarque-Bera Test were proposed for estimating the degree of wide-sense stationarity and Gaussianity of MEA recordings respectively. The results indicate that spectral-density-based stationarity analysis is able to distinguish between experiments of biological noise, inactive culture and noise instrumentation. Meanwhile, JB statistic discriminates active culture experiments from others, i.e., whereas application of MR leads to a remarkable conclusion: although biological noise and instrumentation noise present more or less the same amplitudes and gaussianity, the former is essentially non-stationary. The quantitative indices proposed in this study showed good statistical correlation with those of classical spike analysis for active culture experiments. Thus, results demonstrate that neuronal electrical activity of spikes and bursts showed a remarkable non-stationarity and non-Gaussianity character when compared to biological noise and instrumentation noise, that are very close to stationarity and Gaussianity.

Key-words: Multielectrode array (MEA), skewness, kurtosis, spectral analysis, Jarque-Bera test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura de um neurônio (URL2).	7
Figura 2.2: Tipos básicos de neurônios (URL3).	8
Figura 2.3: Estrutura da bicamada lipídica da membrana de um neurônio (modificada de (CHIAPPALONE, 2003)).	9
Figura 2.4: Esquema de um potencial de ação (URL4).	15
Figura 2.5: Figura esquemática do modelo de Hodgkin-Huxley derivado do axônio gigante da lula (URL5).	16
Figura 2.6: O <i>Voltage-clamp</i> mede a corrente através da membrana devido a uma população de canais iônicos (URL6).	23
Figura 2.7: O <i>patch-clamp</i> permite registrar a corrente de um canal iônico isolado (URL7).24	
Figura 2.8: MEAs produzidas por diferentes empresas. (a) MEA 10/200 planar da Multi Channels Systems para culturas dissociadas (URL9), (b) MED64 fabricado pela Panasonic (URL8), (c) MEA <i>biochip</i> planar com multi-compartimentos, para manipulações farmacológicas, fabricada pela Ayanda-Biosystems (URL10), (d) Mea biochip 3D para preparações de <i>slices</i> , fabricado pela Ayanda-Biosystems (URL10).	28
Figura 2.9: (a) Layout da MEA de um dispositivo da MCS (<i>Data Sheet</i> MCS, URL9) e (b) membrana hidrofóbica transparente usada para preservar a cultura de contaminação. Modificado de (POTTER & DeMARSE, 2001).	29
Figura 2.10: <i>Set-up</i> experimental MCS (<i>Data Sheet</i> MCS, URL9). (a) Amplificador MEA1060, (b) placa de aquisição de dados PCI, (c) <i>software</i> MC_Rack, (d) controlador de temperatura MCS.	31
Figura 2.11: Identificação de um <i>spike</i> . Modificada de (CHIAPPALONE, 2003).	34
Figura 2.12: Intensidade e intervalo entre <i>bursts</i> . Modificada de (CHIAPPALONE, 2003).35	

Figura 3.1: Esquema do ruído de um amplificador operacional. Modificado de (SHERMAN-GOLD, 1993).....	48
Figura 3.2: Modelo simplificado de um conversor corrente-tensão. Modificado de (SHERMAN-GOLD, 1993).....	48
Figura 4.1: Relação entre o espaço amostral S de um evento aleatório e uma variável aleatória $X(\xi)$	64
Figura 4.2: Função densidade de probabilidade de uma variável aleatória Gaussiana.....	66
Figura 4.3: Várias realizações de um processo estocástico.	71
Figura 4.4: Classificação dos processos estocásticos.	75
Figura 4.5: Figura esquemática da divisão da amostra X em Q segmentos de comprimento P cada um, com sobreposição.	78
Figura 4.6: Ilustração de uma janela de sinal MEA de duração $2NT$ ms, dividido em dois subconjuntos $P1$ e $P2$ com N amostras cada.	79
Figura 5.1: Trechos de sinais MEA de cada experimento: (a) DIV39, (b) DIV41, (c) Inativa, (d) TTX e (e) NoNeurons.	97
Figura 5.2: Gráficos de <i>Raster Plot</i> representando a atividade de cada cultura para os 60 canais da MEA durante 20 minutos de registro da atividade elétrica.....	99
Figura 5.3: Histogramas de intervalos entre <i>spikes</i> (ISI) de cada cultura, representados nos 60 canais da MEA durante o registro da atividade elétrica (20 minutos).....	100
Figura 5.4: Histogramas de intervalos entre <i>bursts</i> (IBI) de cada cultura, representados nos 60 canais da MEA durante 20 min de registro da atividade elétrica.	101
Figura 5.5: Valores médios da média estatística estimada para os cinco experimentos de sinais MEA.	105
Figura 5.6: Exemplos de gráficos <i>box plot</i> utilizados para excluir canais das análises de estacionariedade e Gaussianidade.....	107
Figura 5.7: Variância média estimada do histograma de amplitude do sinal MEA.	108

Figura 5.8: Gráfico comparativo entre os cinco experimentos considerando a sensibilidade do sinal MEA ao índice estatístico obliquidade.....	110
Figura 5.9: Valores médios para o índice estatístico curtose para os cinco experimentos de sinais MEA.	112
Figura 5.10: Porcentagem estimada dos segmentos MEA não-estacionários (PSNE) dos cinco conjuntos de experimentos, teste MRT com critério baseado na densidade espectral de potência.	116
Figura 5.11: Porcentagem estimada dos segmentos MEA não-Gaussianos (PSNG) dos cinco conjuntos de experimentos.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Principais íons através de uma membrana neuronal em repouso: o axônio gigante da lula (KANDEL, 2000).....	12
Tabela 4.1: Parâmetros estatísticos da distribuição F.	70
Tabela 4.2: Valores críticos para o teste MRT.	83
Tabela 4.3: Valores críticos para o teste Jarque-Bera (Wuertz & Katzgraber, 2009).	89
Tabela 4.4: JB para algumas distribuições de probabilidade.	90
Tabela 5.1: Resultados estatísticos obtidos no Spike Manager para os cinco experimentos: (a) estatísticas de spikes; (b) estatísticas de bursts.	103
Tabela 5.2: Valores médios da obliquidade do histograma de amplitude do sinal MEA..	109
Tabela 5.3: Valores médios da curtose do histograma de amplitude do sinal MEA.	111
Tabela 5.4: PSNE estimadas de segmentos MEA de várias durações de tempo para cada um dos cinco conjuntos de experimentos que não podem ser modelados como estacionários no sentido-amplo.....	114
Tabela 5.5: PSNG estimadas através do teste JB para Gaussianidade das amostras.....	117
Tabela 5.6: Correlação entre ISI e PSNE.	120
Tabela 5.7: Correlação entre ISI e PSNG.	120
Tabela 5.8: Correlação entre IBI e PSNE.	121
Tabela 5.9: Correlação entre IBI e PSNG.....	121
Tabela 5.10: Correlação entre MFR e PSNE.....	121
Tabela 5.11: Correlação entre MFR e PSNG.	121
Tabela 5.12: Correlação entre PSNE e PSNG.	121

LISTA DE ACRÔNIMOS

ADC – Conversor Analógico Digital

AO – Amplificador Operacional

Ara-C – Citosina Arabinosídeo Trifosfato

ATP – Trifosfato de Adenosina

CDF – Função Distribuição Acumulada

CoB – *Cepstrum of Bispectrum*

DC – Componente Contínua

DIV – Dia *in vitro*

EEG – Eletroencefalograma

FBS – Soro Fetal Bovino

FET – Transistor de Efeito de Campo

HBSS – Solução Salina Balanceada de Hank

HH – Hodgkin-Huxley

HOS – Estatísticas de Ordem Elevada, do inglês *High Order Statistics*

IBI – Intervalo entre *Bursts*

IID – Independentes e Identicamente Distribuídas

ISI – Intervalo entre *Spikes*

ITO – Óxido de Índio-Titânio

JB – Jarque-Bera

LTD – *Long-term depression*

LTP – *Long-term potentiation*

MBR – *Mean Bursting Rate*

MCS – Multi Channel Systems

MEA – Matriz Multieletrodo

MFR – *Mean Firing Rate*

MR – Razão Média, do inglês *Mean Ratio*

PDF – Função Densidade de Probabilidade

PID – Proporcional Integral Derivativo

PLD – Poli-D-Lisina

PPSE – Potencial Pós-Sináptico Excitatório

PPSI – Potencial Pós-Sináptico Inibitório

PSD – Densidade Espectral de Potência

PSNE – Porcentagem de Segmentos não-Estacionários

PSNG – Porcentagem de Segmentos não-Gaussianos

PSSC – Porcentagem de Segmentos Sensíveis a Curtose

PSSJB – Porcentagem de Segmentos Sensíveis a JB

SDDT – *Spike Detection Differential Threshold*

SIV – Semana *in vitro*

TiN – Nitreto de Titânio

TTX – Tetrodotoxina

UV – Ultra-violeta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 MOTIVAÇÃO.....	3
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	4
1.3 CONTRIBUIÇÕES DA DISSERTAÇÃO	5
CAPÍTULO 2	6
ELETROFISIOLOGIA: CONCEITOS GERAIS.....	6
2.1 INTRODUÇÃO	6
2.2 CONCEITOS DE NEUROFISIOLOGIA	6
2.2.1 <i>As células do sistema nervoso</i>	6
a) <i>Células gliais</i>	6
b) <i>Neurônios</i>	7
2.2.2 <i>A membrana neuronal e os canais iônicos</i>	9
2.2.3 <i>Potencial de membrana</i>	10
2.2.4 <i>As propriedades passivas do neurônio</i>	14
2.2.5 <i>Potencial de ação</i>	15
2.2.6 <i>Modelo de Hodgkin-Huxley</i>	16
2.2.7 <i>Transmissão sináptica</i>	17
2.2.8 <i>Integração sináptica</i>	18
2.2.9 <i>Redes neuronais in vitro</i>	22
a) <i>Fatias de tecido</i>	22
b) <i>Culturas neuronais dissociadas</i>	22
2.3 <i>PATCH CLAMP – INSTRUMENTAÇÃO CLÁSSICA PARA ELETROFISIOLOGIA</i>	23
2.4 <i>MATRIZ MULTIELETRODO – INSTRUMENTAÇÃO NÃO-CONVENCIONAL</i>	24
2.4.1 <i>A Tecnologia MEA</i>	26
2.4.2 <i>As MEAs padrão</i>	27
a) <i>O projeto da MEA</i>	28
b) <i>Set-up experimental baseado em dispositivos MEA</i>	29
2.4.3 <i>Aplicações</i>	31
2.5 <i>ALGORITMOS DE ANÁLISE DE DADOS</i>	33
2.5.1 <i>Análise de spikes</i>	33
a) <i>Detecção de spikes</i>	33
b) <i>Taxa média de disparo</i>	34
c) <i>Intervalo entre spikes</i>	34
2.5.2 <i>Análise de Burst</i>	35
a) <i>Detecção de burst</i>	35
b) <i>Taxa média de burst</i>	36
c) <i>Intervalo entre bursts</i>	36
2.6 <i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	36
CAPÍTULO 3	38
REVISÃO RUÍDOS	38
3.1 <i>INTRODUÇÃO</i>	38
3.2 <i>RUÍDO DEVIDO ÀS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DA MEMBRANA (STEVENS, 1972)</i>	38

3.2.1 Ruído térmico	39
3.2.2 Ruído balístico (<i>Shot noise</i>)	40
3.2.3 Ruído 1/f (<i>Flicker noise</i>)	41
3.2.4 Flutuações de condutância	42
a) Primeira interpretação das equações de Hodgkin-Huxley	42
b) Segunda interpretação das equações de Hodgkin-Huxley	44
c) Dificuldade de separar o espectro de várias fontes	45
3.3 RUÍDO DEVIDO ÀS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO SET-UP EXPERIMENTAL	46
3.3.1 Ruídos fundamentais	46
3.3.2 Ruído de amplificação	47
3.3.3 Ruído do eletrodo	49
a) Ruído de eletrodo em single-channel patch voltage clamping	49
3.3.4 Ruído do selo	51
3.3.5 Fontes externas de ruído	51
3.3.6 Ruído de digitalização	52
3.3.7 Aliasing	53
3.3.8 Filtragem	53
3.4 ATIVIDADE ESPONTÂNEA E RUÍDO BIOLÓGICO	55
3.5 RUÍDO E MEA	57
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
CAPÍTULO 4	60
MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1 INTRODUÇÃO	60
4.2 AQUISIÇÃO DOS DADOS	60
4.2.1 Culturas Neuronaes	60
4.2.2 Medidas	62
4.3 VARIÁVEIS ALEATÓRIAS	64
4.3.1 Função Distribuição de Acumulada	65
4.3.2 Função Densidade de Probabilidade	65
4.3.3 Variável Aleatória Gaussiana	65
4.3.4 Médias Estatísticas	67
a) Valor Esperado de uma Variável Aleatória	67
b) Momentos	67
4.3.5 Leis dos Grandes Números	69
4.3.6 Teorema Central do Limite	69
4.3.7 Distribuição F	70
4.4 PROCESSOS ESTOCÁSTICOS	71
4.4.1 Média e as Funções de Autocorrelação e Autocovariância	72
4.4.2 Processos estocásticos Gaussianos	72
4.4.3 Processos aleatórios iid	73
4.4.4 Processos estocásticos estacionários	74
a) Processo estocástico estacionário no sentido estrito	74
b) Processo estocástico estacionário no sentido amplo	74
c) Processos Ergódicos	75
4.5 ANÁLISE DE SINAIS ESTOCÁSTICOS	76
4.5.1 Densidade Espectral de Potência	76
4.5.2 Processos aleatórios discretos no tempo	77
4.5.3 Periodograma de Welch	78
4.5 TESTES DE ESTACIONARIEDADE NO SENTIDO AMPLO E GAUSSIANIDADE	79

4.5.1 Mean Ratio Test (MRT) para estacionariedade	80
a) <i>Estimação da Densidade Espectral de Potência</i> (OLSEN et al., 2008)	80
b) <i>Teste estatístico para comparar segmentos de séries temporais</i>	81
4.5.2 Teste Jarque-Bera para normalidade	85
a) <i>O teste de escore</i>	85
b) <i>Teste para normalidade de observações</i>	86
c) <i>Significado da estatística JB</i>	90
4.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DE SINAIS MEA	91
4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
CAPÍTULO 5	95
RESULTADOS E DISCUSSÕES	95
5.1 INTRODUÇÃO	95
5.2 TÉCNICA CLÁSSICA DE DETECÇÃO DE SPIKES	95
5.3 MEDIDAS DO HISTOGRAMA DE AMPLITUDE	104
5.4 TESTE PARA ANÁLISE DA ESTACIONARIEDADE DOS DADOS	113
5.5 TESTE JB PARA GAUSSIANIDADE	117
5.6 CORRELAÇÕES	120
5.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
CAPÍTULO 6	124
CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	124
6.1 CONCLUSÕES	124
6.2 TRABALHOS FUTUROS	129
REFERÊNCIAS	130
ANEXOS	143

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Uma definição simples, porém exaustiva de Neurociência pode ser encontrada no sítio da “*Society for Neuroscience*” (URL1):

“Neurociência é o estudo do sistema nervoso – incluindo o cérebro, a medula espinal e redes de neurônios sensoriais por todas as partes do corpo. O ser humano contém aproximadamente 100 bilhões de neurônios que são as unidades funcionais do sistema nervoso. Os neurônios comunicam entre si enviando sinais elétricos por longas distâncias e em seguida liberando substâncias químicas chamadas neurotransmissores que atravessam as sinapses - pequenas fendas entre neurônios.”

O sistema nervoso consiste de duas partes principais. O sistema nervoso central é constituído do cérebro e da medula espinal. O sistema nervoso periférico inclui os nervos cranianos (12 pares) que suprem a cabeça e o pescoço, e os nervos espinhais (31 pares) que inervam os braços, tronco, pernas, músculos esqueléticos e órgãos internos.

Os componentes críticos do sistema nervoso são as moléculas, os neurônios e os processos dentro e entre as células. Estes estão organizados em grandes redes neuronais e em sistemas controlando funções tais como visão, audição, aprendizagem, respiração e, enfim, todo o corpo humano.

Por meio de suas pesquisas, os neurocientistas têm como objetivo:

- Descrever o sistema nervoso humano e como ele funciona normalmente;
- Determinar como o sistema nervoso se desenvolve, matura e se mantém por toda a vida;
- Encontrar meios para prevenir ou curar doenças neurológicas ou psiquiátricas.

A neurociência se tornou uma disciplina reconhecida somente nas últimas décadas. Atualmente, trata-se de um campo unificado que integra biologia, química e física com estudos de estrutura, fisiologia e comportamento, incluindo as emoções humanas e as funções cognitivas.

Neuroengenharia é o resultado da interseção entre engenharia e neurociência, e representa a base conceitual para analisar os mecanismos subjacentes às funções neuronais e para solucionar alguns dos problemas clínicos associados com disfunção neuronal com o suporte de tecnologias avançadas (MASSOBRIO, 2008). Como exemplo destas patologias, pode-se destacar a epilepsia, que envolve a atividade anômala e sincronizada de grandes grupos de neurônios no córtex humano (DURAND & BIKSON, 2001). A neuroengenharia trata de fenômenos cuja interpretação e solução envolve uma interdisciplinariedade de ramos científicos, tais como físicos, matemáticos, químicos e engenheiros eletrônicos. A neuroengenharia compreende uma metodologia de engenharia para entender, representar, manipular e ampliar o sistema nervoso e visa construir novos dispositivos e sistemas para interfaces cérebro máquina e neuropróteses avançadas (MASSOBRIO, 2008). Assim, são realizados muitos esforços para desenvolver próteses neurais que podem coexistir e comunicar bidirecionalmente com o tecido cerebral vivo (AKAY, 2007; KANDEL, 2000). LITT & D'ALESSANDRO (2008) descrevem estratégias para a construção de neuroimplantes para minimizar as crises epiléticas, incluindo experimentos preliminares de eletroestimulação em animais, baseando-se em dispositivos nanotecnológicos denominados “Arranjos Multieletrodo” (do inglês, *Multielectrode Array* - MEA).

Sinais extracelulares registrados de culturas neuronais são compostos de unidades básicas chamadas *spikes* (GLASER & RUCHKIN, 1976), *bursts*, ruído biológico e ruído de instrumentação. O foco do conhecimento neurofisiológico atual é baseado no fato de que a atividade de *spikes* constitui a informação biológica mais importante (KANDEL, 2000), denominando os instantes de tempo em que essa atividade não ocorre como ruído biológico (CHIAPPALONE et al., 2006). A análise clássica de *spikes* (GLASER & RUCHKIN, 1976) não leva em conta os segmentos de ruído biológico (KANDEL, 2000), consequentemente há uma perda de informação biológica. No entanto, não se deve esquecer que o ruído biológico desempenha um papel muito importante, como apontado por diversos trabalhos dedicados a sua análise no contexto do sistema nervoso (FREEMAN, 2000). Também deve salientar-se que a primeira análise de qualquer processamento de sinais aplicado aos dados gerados por MEAs corresponde à detecção de *spikes*, que é posteriormente utilizada para gerar a série temporal de intervalos entre *spikes* (*InterSpike Interval* - ISI), análise de *bursts* e estimativa de histogramas. Essa detecção é influenciada principalmente pelo ruído de instrumentação, que é uma questão bastante

complexa no contexto de registros extracelulares, devido às suas diversas fontes (KIM & MCNAMES, 2007).

1.1 Motivação

O processamento clássico de *spikes* (GLASER & RUCHKIN, 1976) pressupõe que o ruído presente seja Gaussiano, especialmente para os dados intracelulares, a fim de permitir um tratamento matemático simples. No entanto, poucos trabalhos na literatura (KIM & MCNAMES, 2007; NENADIC & BURDICK, 2005) analisam o ruído que perturba registros extracelulares. NENADIC & BURDICK (2005) fornecem uma ilustração simples da Gaussianidade do ruído com base em sinais reais, supondo essa hipótese para definir uma nova técnica de detecção de *spikes*, bem como sua variância no intervalo $[0,06 - 0,08] (\mu V)^2$. O artigo de KIM & MCNAMES (2007) considera a variância de ruído no intervalo $[0,091 - 0,286] (\mu V)^2$ para testar uma nova proposta de detecção de *spikes*, sem justificativa formal para esta escolha.

Quando as amplitudes dos sinais mensurados atingem pelo menos $100 \mu V$ durante a atividade de *spikes* e as taxas de disparo são, pelo menos, superior a $0,1 \text{ spikes/segundo}$ (EYTAN & MAROM, 2006), então a cultura é chamada de “ativa”. Caso contrário, ela é chamada “inativa”.

(MARQUES, 2011) usou a detecção clássica de *spikes* para analisar três culturas neuronais ativas diferentes, sendo que a primeira cultura foi observada do 8º dia *in vitro* ao 88º dia *in vitro*, a segunda cultura foi observada do 8º ao 67º dia *in vitro* enquanto que a terceira cultura foi observada do 8º dia ao 64º dia *in vitro*. A primeira cultura foi mensurada 23 vezes, em 23 dias diferentes e verificou-se que 35% dos canais da MEA não apresentaram atividade significativa de *spikes* e *bursts*, ou seja, esses canais registraram apenas ruído biológico e de instrumentação. A segunda cultura foi mensurada 17 vezes, em 17 dias diferentes e apresentou ruído em 34% dos canais. Já a terceira cultura registrou ruído em apenas 20% dos canais quando mensurada 16 vezes, em 16 dias diferentes. Em suma, em conjunto, as três culturas não registraram atividade significativa de *spikes* e *burst* em aproximadamente 30% dos canais da MEA. Devido a essa grande quantidade de canais que registraram apenas ruído biológico e/ou de instrumentação, surge a necessidade de verificar se esses canais carregam alguma informação relevante, que em geral é negligenciada na análise clássica de *spikes*.

Diante desse contexto, essa dissertação tem como objetivo estabelecer diferenças entre esses principais componentes dos sinais de MEA (ruído de instrumentação, ruído biológico e a atividade de *spikes* e *bursts*) no âmbito de culturas ativas e inativas. O grau de estacionariedade e Gaussianidade desses sinais serão os critérios utilizados para se estabelecer tais diferenças, uma vez que essa análise também permitirá avaliar o desempenho de algoritmos detectores de *spikes* que, em geral, pressupõem que o sinal da MEA é estacionário e Gaussiano.

Para a análise da estacionariedade dos dados, o teste da Razão Média que foi demonstrado e empregado por (OLSEN et al., 2008) para detectar pontos de mudanças em séries temporais será utilizado. OLSEN et al., (2008) também apresentou uma aplicação prática desse teste encontrando alterações significativas nas temperaturas médias do hemisfério norte bem como na produtividade de uma fábrica. Em sinais MEA, quando ocorre um *spike* ou *burst*, intuitivamente, pode-se pensar que o espectro de frequência terá um padrão diferente daquele de ruído. Assim, tais ocorrências geram uma não-estacionariedade no sinal extracelular.

E finalmente, para analisar a Gaussianidade dos sinais MEA, o teste Jarque-Bera, que é muito empregado para testar a normalidade de dados econômicos, foi utilizado. Outra aplicação prática do teste *JB* pode ser visto em (BESDOK & YÜKSEL, 2005), que propuseram um filtro baseado na estatística *JB* para restaurar imagens altamente deterioradas por ruído impulsivo.

1.2 Estrutura da Dissertação

A estratégia utilizada para atingir os objetivos do trabalho será descrita em cada um dos capítulos apresentados a seguir:

- Capítulo 1: Introdução, apresentação da motivação, definição do problema a ser estudado e os objetivos a serem cumpridos;
- Capítulo 2: Fundamentos de eletrofisiologia discorrendo sobre neurofisiologia básica, modelos matemáticos do neurônio e métodos clássicos e não convencionais para mensurar a atividade elétrica em um neurônio e/ou grupos de neurônios.
- Capítulo 3: Estado da arte sobre o ruído em medidas neurofisiológicas;
- Capítulo 4: Conceitos fundamentais sobre variáveis aleatórias e processos estocásticos. Metodologia sobre testes estatísticos baseados em densidade espectral

de potência e na estatística Jarque-Bera para inferir sobre a estacionariedade e a Gaussianidade de sinais neuronais de MEA.

- Capítulo 5: Apresentação e discussão dos resultados obtidos com as metodologias propostas no Capítulo 4 e comparação com a análise clássica de *spikes*;
- Capítulo 6: Conclusões e trabalhos futuros, breve discussão sobre a estratégia adotada e sugestões de possíveis trabalhos embasados nesta dissertação.

Uma vez cumprida a estratégia para se atingir os objetivos desse projeto, espera-se que essa dissertação contribua de forma significativa para suprir a ausência de trabalhos na literatura que discutem de forma teórica e experimental o ruído presente em sinais de MEA. Essa discussão é fundamental tanto para determinar o bom desempenho das ferramentas de detecção de *spikes* quanto para definir se existe a necessidade de analisar esses sinais de ruído biológico em busca de informação para a correta compreensão da dinâmica da rede neuronal que está sendo mensurada.

1.3 Contribuições da dissertação

- Análise quantitativa do ruído devido ao movimento iônico através da membrana neuronal, bem como o ruído de instrumentação; no contexto de sinais MEA.
- Proposição de uma nova abordagem de análise de sinais neuronais de MEA baseados no processamento direto do sinal bruto.
- Avaliação do grau de estacionariedade e Gaussianidade de sinais MEA e estimação de um tamanho ótimo de janela para segmentar esses dados.
- Avaliação dos parâmetros estatísticos que sejam sensíveis a sinais de MEA e que possam ser usados para distinguir e quantificar alterações nesses dados.
- Comparação de resultados clássicos com aqueles obtidos por meio da nova abordagem proposta neste trabalho.

CAPÍTULO 2

ELETROFISIOLOGIA: CONCEITOS GERAIS

2.1 Introdução

Este capítulo aborda uma breve explanação sobre os conceitos gerais da fisiologia do neurônio, com ênfase na estrutura da membrana neuronal, nos mecanismos de propagação do sinal elétrico através de um neurônio e entre neurônios, ou seja, as sinapses. Além disso, é apresentado de forma sucinta o preparo de culturas neuronais corticais.

Também, são descritas técnicas clássicas e não-convencionais para a mensuração de sinais eletrofisiológicos. Essas técnicas são *Patch-Clamp* e MEA. E para finalizar o capítulo, os métodos clássicos de detecção de *spikes* são apresentados sucintamente.

2.2 Conceitos de neurofisiologia

2.2.1 As células do sistema nervoso

As células que constituem o sistema nervoso podem ser divididas em duas classes principais: células nervosas (os neurônios) e células gliais (a glia).

a) Células gliais

Há entre 10 e 50 vezes mais glia do que neurônios no sistema nervoso central de vertebrados. A glia não está diretamente envolvida no processamento da informação neuronal, mas ela tem outras importantes funções vitais (KANDEL, 2000):

- As células gliais proporcionam suporte e nutrição dos neurônios. Dentre as funções da glia estão cercar os neurônios e mantê-los em seu lugar, fornecer nutrientes e oxigênio para os neurônios, isolar um neurônio do outro, destruir patógenos, são cruciais na reparação de neurônios que sofreram danos, dentre outras.
- Dois tipos de células gliais (oligodendrócitos e células de Schwann) produzem a mielina que envolve os axônios das células nervosas, isolando-as eletricamente e assim permitindo a propagação rápida de potenciais de ação.
- Algumas células gliais removem dendritos lesionados ou células mortas.

- Durante o desenvolvimento do cérebro certas classes de células gliais (“glia radial”) orientam a migração de neurônios e consequentemente dos axônios.
- Em alguns casos, como na sinapse nervo-músculo de vertebrados, as células gliais regulam ativamente as propriedades do terminal pré-sináptico.
- Algumas células gliais (astrócitos) ajudam a formar um revestimento impermeável nos capilares e veias do cérebro – a barreira hematoencefálica – que evita que substâncias tóxicas do sangue entrem no cérebro.
- Outras células gliais produzem moléculas que modificam o crescimento de dendritos e axônios.

b) Neurônios

O neurônio é o componente fundamental estrutural e funcional do sistema nervoso. Ele tem como função receber, processar e transmitir impulsos eletroquímicos, ou impulsos nervosos, que são sinais de comunicação e codificação (SPENCE, 1991).

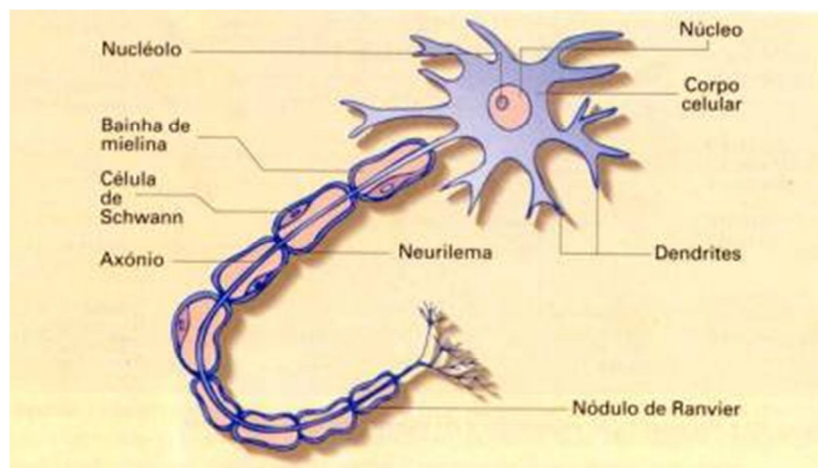


Figura 2.1: Estrutura de um neurônio mielinizado (URL2).

Cada neurônio é formado por um corpo celular (soma ou pericário) e um ou mais prolongamentos que partem do corpo celular. No interior do citoplasma do corpo celular existe um grande núcleo, contendo um nucléolo proeminente. Como a maioria das células, o citoplasma dos neurônios contém retículo endoplasmático muito abundante (corpos de Nissl), mitocôndrias, aparelho de Golgi e neurofibrilas.

Os prolongamentos associados a um neurônio são extensões muito finas dessas células. Existem basicamente dois tipos de prolongamentos: os dendritos e os axônios. Os dendritos são processos neuronais que conduzem sinais elétricos para o corpo celular. O

axônio (o qual existe apenas um por célula) é o prolongamento neuronal que conduz os impulsos do corpo celular. O comprimento dos axônios varia consideravelmente.

A maioria dos axônios está recoberta por uma substância gordurosa denominada mielina. Nos axônios mielinizados do sistema nervoso periférico há uma fina membrana entre a mielina e a bainha de tecido conjuntivo circundando o axônio. Essa membrana é denominada neurolema ou bainha de Schwann. O neurolema e a mielina desses axônios mielinizados são interrompidos em intervalos regulares ao longo do axônio. Cada um desses pontos de interrupção é denominado estrangulamento anular ou nodo de Ranvier. Tais estrangulamentos também colaboram para o aumento da velocidade de transmissão do impulso nervoso, permitindo que ele salte diretamente de um para o outro, ao longo de toda a extensão do axônio.

De acordo com o número de processos que se estendem do corpo celular, os neurônios podem ser classificados em três tipos:

- *neurônio bipolar*: apresenta dois prolongamentos, cada qual partindo de uma extremidade do corpo celular;
- *neurônio pseudo-unipolar*: é formado durante o desenvolvimento embrionário quando dois prolongamentos de certo tipo de neurônios bipolares se unem de tal forma que um só prolongamento se origina do corpo celular. Além do ponto de fusão, os dois processos permanecem separados.
- *neurônio multipolar*: tipo mais comum de neurônio, apresenta um prolongamento longo do corpo celular que funciona como um axônio, os numerosos outros que se originam do corpo celular funcionam como dendritos.

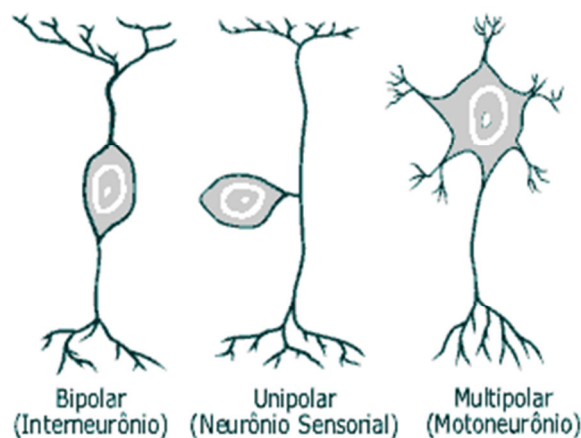


Figura 2.2: Tipos básicos de neurônios (URL3).

Os neurônios também podem ser classificados quanto a sua função:

- *neurônio motor ou eferente*: transmite impulsos do sistema nervoso central para um efetador, ou de um centro superior do sistema nervoso central para um centro inferior;
- *neurônio sensitivo ou aferente*: transporta impulsos dos receptores para o sistema nervoso central, ou de um centro inferior do sistema nervoso central para um centro superior.
- *neurônio internúcleal ou de associação*: transmite impulsos de um neurônio a outro.

2.2.2 A membrana neuronal e os canais iônicos

A membrana celular ou membrana plasmática de todas as células, inclusive das células neurais, é uma membrana semipermeável formada por uma dupla camada de fosfolípidios. Nessa lâmina lipídica contínua ficam embebidas as moléculas de proteína, dentre elas destacam-se os canais iônicos, veja Fig. 2.3. A membrana neuronal funciona como uma barreira para delimitar o citoplasma e excluir certas substâncias que banham os neurônios.

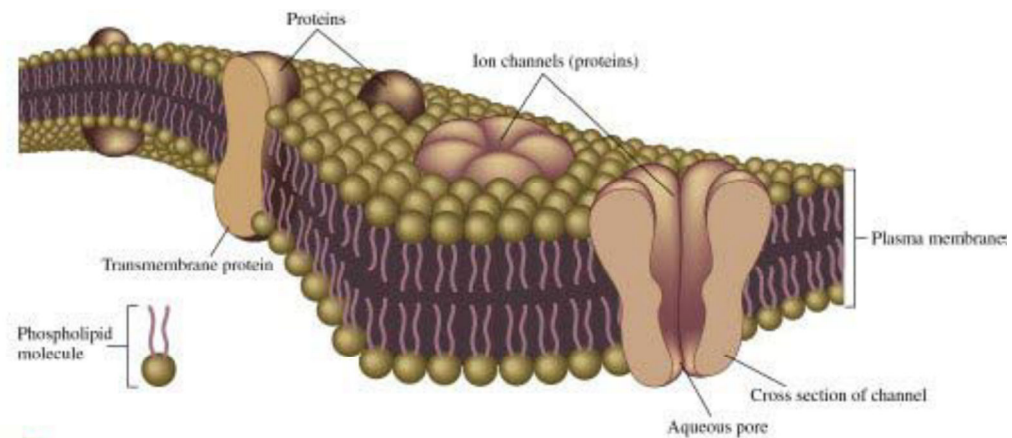


Figura 2.3: Estrutura da bicamada lipídica da membrana de um neurônio (modificada de (CHIAPPALONE, 2003)).

Os canais iônicos são grandes proteínas que atravessam toda a estrutura da membrana plasmática, com grupos carboidratos (glicoproteínas) presos à sua superfície. Todos os canais apresentam um poro aquoso central, que vai de uma face à outra da membrana. Esses canais regulam o fluxo iônico entre os meios intra e extracelular de todas as células. Nas células neuronais e musculares, os canais iônicos são importantes para o

controle das rápidas variações do potencial de membrana, associadas ao potencial de ação e aos potenciais pós-sinápticos das células-alvo.

Os lipídios da membrana são hidrofóbicos. Em contrapartida, os íons intra e extracelulares são hidrofílicos, ou seja, atraem fortemente a água. Essa atração entre os íons e a água é devido ao fato das moléculas de água serem dipolares. Em consequência, os íons ficam circundados pela **água de hidratação**, eletrostaticamente fixada. A mobilidade de um íon dentro de uma solução não depende apenas do tamanho do íon, e sim da dimensão do íon e de sua camada de hidratação.

Acredita-se que os canais iônicos teriam trechos estreitados que atuariam como filtros moleculares. Nesse **filtro de seletividade**, o íon perderia a maior parte de sua camada de hidratação e formaria, em seu lugar, fracas ligações químicas (interações eletrostáticas) com radicais aminoácidos polares (com carga) que revestiriam as paredes do canal. Como a perda das moléculas da camada de hidratação é energeticamente desfavorável ao íon, o íon só passaria pelo canal caso a energia de interação com o filtro de seletividade compensasse a perda da camada de hidratação.

2.2.3 Potencial de membrana

Existem dois tipos de canais iônicos nas membranas: de repouso e regulados. Os canais de repouso ficam geralmente abertos e contribuem de forma significativa para o potencial de repouso. Já os canais regulados abrem e fecham em resposta a diversos estímulos. Esses canais são regulados por três meios: pela diferença de potencial (canais voltagem-dependentes), por substâncias químicas (canais ativados por ligantes) e por pressão ou estiramento (canais mecano-dependentes). Sob a influência desses reguladores, os canais podem passar para um de três estados funcionais: fechado e ativável (**repouso**), aberto (**ativo**) e inativado (**refratário**). Alguns canais são regulados por mais de um tipo desses reguladores. Para os canais voltagem-dependentes, muitos, mas não todos, podem passar para o estado inativado após ativação. A transição de um canal entre estados diferentes é chamada de **regulação por comportas**.

O canal iônico abre e fecha de forma tudo-ou-nada, resultando em breves pulsos de corrente através da membrana. Se o potencial elétrico através da membrana variar, a corrente que flui pelo canal varia proporcionalmente. A corrente está linearmente relacionada à força propulsora; em outras palavras, o canal comporta como um resistor elétrico.

A amplitude da corrente por um só canal pode ser calculada pela lei de Ohm, $i = V/R$ onde i é a corrente por esse canal único, V é a diferença de potencial entre as duas extremidades do canal e R é a resistência do canal aberto. Ao lidar com canais iônicos, é melhor se usar a recíproca da resistência, ou **condutância**, visto que fornece uma medida elétrica da permeabilidade iônica. Assim, a lei de Ohm pode ser usada na forma $i = V\gamma$.

As propriedades cinéticas da permeação iônica são mais bem descritas pela condutância do canal, que é determinada pela medida da corrente (isto é, fluxo iônico) que passa pelo canal aberto em resposta a determinada **força propulsora eletroquímica**. A força propulsora eletroquímica efetiva é determinada por dois fatores – a diferença de potencial elétrico através da membrana e o gradiente de concentração dos íons permeantes, também através da membrana. A alteração de qualquer um deles modifica a força propulsora efetiva, de modo que a corrente que flui pelo canal depende da diferença de potencial através da membrana e do potencial de equilíbrio eletroquímico do íon permeante:

$$i = g(V - E_{ion}) \quad (2.1)$$

O fluxo de íons por um canal iônico é passivo, não exigindo qualquer consumo de energia metabólica pelos canais. A direção e o eventual equilíbrio para esse fluxo são determinados pelas forças propulsivas, eletrostáticas e difusionais, através da membrana, e não pelo próprio canal.

A intensidade do fluxo iônico (isto é, da corrente) por um canal depende das concentrações desse íon na solução circundante. Com baixas concentrações, a corrente aumenta, de forma quase linear, com a concentração. Em concentrações altas, a corrente tende a atingir um valor além do qual ela não mais aumenta com o aumento da concentração. Nesse ponto, a corrente é dita estar **saturada**.

Esse efeito de saturação é consistente com a ideia de que a permeação iônica envolve a ligação de íons a sítios polares específicos, no interior dos poros dos canais, e não a obediência às leis de difusão eletroquímica em solução livre. Um modelo simples de eletrodifusão preveria que a corrente iônica deveria aumentar sempre, enquanto a concentração iônica continuasse a aumentar – quanto mais carreadores de carga na solução, maior seria o fluxo de corrente.

A alta velocidade de desligamento do processo de ligação iônica assegura que os canais atinjam velocidades de condução extremamente altas, necessárias para alterar com grande rapidez o potencial de membrana, durante a sinalização.

Na condição de repouso, o líquido no interior da célula tem uma alta concentração de íons potássio, enquanto que no fluido extracelular há uma grande quantidade de íons sódio. Essa separação de cargas é mantida porque os íons não podem se deslocar livremente através da bicamada lipídica da membrana. Essa separação de cargas origina uma diferença de potencial elétrico através da membrana, chamada de **potencial da membrana**. O potencial da membrana (V_m) é definido por: $V_m = V_{\text{int}} - V_{\text{ext}}$ onde V_{int} é o potencial no interior da célula e V_{ext} é o potencial fora da célula. Por convenção, o potencial fora da célula é definido como zero. Como veremos mais adiante, o potencial intracelular é negativo, logo o potencial de repouso é negativo. Toda a sinalização elétrica resulta de breves alterações do potencial de repouso de membrana, devido às variações do fluxo de corrente elétrica através da membrana celular.

A redução da separação de cargas, levando a um potencial de membrana menos negativo, é chamada de **despolarização**. O aumento da separação de cargas, levando a um potencial de membrana mais negativo, é chamado de **hiperpolarização**. As respostas passivas da membrana ao fluxo de corrente, que não produzem abertura de canais iônicos voltagem-dependentes, são chamados de **potenciais eletrotônicos**. Em um nível crítico de despolarização, chamado de limiar, a célula responde de forma ativa, com abertura de canais iônicos voltagem-dependentes, em número suficiente para produzir um **potencial de ação**, do tipo tudo-ou-nada.

Tabela 2.1: Principais íons através de uma membrana neuronal em repouso: axônio gigante da lula (KANDEL, 2000).

<i>Íon</i>	$[]_e (10^{-3} \text{ mol/L})$	$[]_i (10^{-3} \text{ mol/L})$	$[]_e / []_i$	$E_N^{ion} (mV)$
K^+	20	400	20	-75
Na^+	440	50	0.113	+54
Ca^{++}	10	0.4	0.04	+40
Mg^{++}	54	10	0.185	+21
Cl^-	500	40 a 150	0.08 a 0.30	-30 a -63
<i>Íons orgânicos</i>	-	360	-	-
$V_0 \cong -70mV$				

Nenhuma espécie iônica individual está igualmente distribuída nas duas faces da membrana da célula neural. O Na^+ e o Cl^- estão mais concentrados no meio extracelular, enquanto o K^+ e os ânions orgânicos (A^-) estão mais concentrados em seu interior conforme pode ser verificado na Tab. 2.1.

O fluxo de um íon através de uma membrana celular é o produto de sua força propulsora eletroquímica (a soma da força propulsora elétrica e da força propulsora química, devido ao gradiente de concentração), pela condutância da membrana a esse íon. Os íons que estão mais concentrados no meio extracelular são o Na^+ e o Cl^- , enquanto que o K^+ e ânions orgânicos (A^-) estão mais concentrados no meio intracelular. O valor de potencial em que a força elétrica fica igual à força química, com direção oposta, impedindo o movimento do íon no sentido de menor concentração é chamado de **potencial de equilíbrio** do íon e pode ser calculado pela **Equação de Nernst**:

$$E_N^{\text{íon}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{íon}]_e}{[\text{íon}]_i} \quad (2.2)$$

onde $E_N^{\text{íon}}$ é o potencial de equilíbrio do íon (ou potencial de Nernst para o íon), R é a constante dos gases, T é a temperatura em graus Kelvin, Z é a valência do íon, F é a constante de Faraday, e $[\text{íon}]_e$ e $[\text{íon}]_i$ são as concentrações fora e dentro da célula de íon.

A equação de Nernst pode ser usada para o cálculo do potencial de equilíbrio de qualquer íon que esteja presente nos dois lados de uma membrana permeável a esse íon.

Para que uma célula tenha um potencial da membrana em repouso estável, a separação de cargas, através da membrana, deve ficar constante. Contudo, não se pode permitir que esses vazamentos permanentes ocorram sem oposição por qualquer período de tempo, visto que os gradientes iônicos (de Na^+ e de K^+) iriam, eventualmente, ser dissipados, reduzindo o potencial da membrana em repouso.

Essa dissipação dos gradientes iônicos é impedida pela bomba de sódio-potássio, que move o Na^+ e o K^+ contra seus gradientes eletroquímicos: ela extruda três íons Na^+ para fora da célula, enquanto capta dois íons de K^+ . A bomba gera uma corrente iônica efetiva de efluxo, daí dizemos que ela é uma bomba eletrogênica. Essa bomba, conseqüentemente, precisa de energia para funcionar. Essa energia é derivada da hidrólise do ATP. Dessa forma, no potencial de repouso da membrana, a célula não está em equilíbrio, mas sim em um estado estável.

A equação de Goldman (2.3) propõe que quanto maior for a concentração de determinada espécie iônica e quanto maior for a permeabilidade da membrana a essa espécie iônica, maior será a contribuição dessa espécie na determinação do potencial de membrana.

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_e P_{Na}[Na^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e} \quad (2.3)$$

2.2.4 As propriedades passivas do neurônio

As propriedades elétricas passivas dos neurônios são constantes e não se alteram durante a sinalização elétrica. Essas propriedades passivas são três: resistência da membrana em repouso, capacitância da membrana e a resistência axial intracelular ao longo do axônio e dos dendritos. Uma vez que um potencial de ação é gerado, as propriedades passivas participam da determinação da velocidade com que esse potencial é conduzido.

A membrana do neurônio atua como um resistor (devido a seus canais condutores de íons) quanto como um capacitor (devido à bicamada lipídica). A resistência de entrada da célula determina a amplitude da despolarização em resposta a uma corrente estável enquanto a capacitância da membrana tem o efeito de reduzir a velocidade com que o potencial de membrana varia, em resposta ao mesmo pulso de corrente.

Um sinal com potencial sublimiar, ao longo dos dendritos e do axônio, diminui de amplitude, em função da distância do ponto de seu início. A geometria de um neurônio influencia a distribuição de fluxo de corrente. A **resistência axial** depende tanto da resistividade específica do citoplasma como da área de secção transversal de um dendrito ou axônio.

A despolarização local é conduzida eletrotonicamente ao longo do dendrito ou axônio, fazendo com que a região adjacente da membrana atinja o limiar para a geração de um potencial de ação. Desse modo, à medida que o potencial local da membrana se aproxima do limiar, a despolarização se modifica, indo de um processo passivo para um processo regenerativo.

O aumento da velocidade de propagação do potencial de ação foi obtido por meio das seguintes estratégias adaptativas: o aumento do diâmetro do cerne axônico e a mielinização do enrolamento de membranas da célula da glia em torno do axônio. Para

impedir que o potencial de ação desapareça, a bainha de mielina é interrompida a cada 1 a 2 mm pelos nodos de Ranvier.

2.2.5 Potencial de ação

O potencial de ação é gerado pelo fluxo muito aumentado de íons por canais voltagem-dependentes. A condutância da membrana aos íons aumenta de forma muito acentuada.

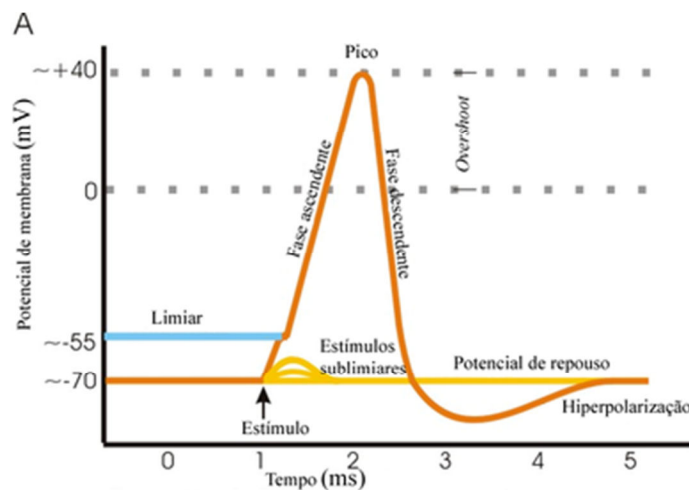


Figura 2.4: Esquema de um potencial de ação (URL4).

Os eventos que levam ao potencial de ação (Fig. 2.4) podem ser assim descritos: uma despolarização da membrana faz com que mais canais de Na^+ se abram rapidamente (com aumento da condutância ao Na^+ (g_{Na})), resultando em corrente de influxo de Na^+ . Essa corrente, por descarregar a capacitância da membrana, produz despolarização adicional abrindo mais canais de Na^+ , resultando em corrente de influxo mais intensa. Esse processo regenerativo produz o potencial de ação. O estado despolarizado do potencial de ação limita, então, a duração desse potencial de ação, por dois modos: ele inativa gradualmente os canais de Na^+ , reduzindo, consequentemente, g_{Na} , e abre, com certo retardo, os canais voltagem-dependentes de K^+ , aumentando, como resultado, g_{K} . Assim, a corrente de Na^+ é seguida por uma corrente de efluxo de K^+ , que tende a repolarizar a membrana.

Um potencial de ação é seguido por uma hiperpolarização transiente, o pós-potencial. Os canais de K^+ que abrem durante a fase tardia do potencial de ação só fecham após V_m ter retornado a seu valor de repouso.

O período refratário absoluto ocorre imediatamente após o potencial de ação; é impossível que a célula seja excitada, por maior que seja a corrente aplicada. No período refratário relativo é possível desencadear um potencial de ação apenas por aplicação de estímulos mais intensos que o normal causado pela inativação residual dos canais de Na^+ e pela abertura dos canais de K^+ .

2.2.6 Modelo de Hodgkin-Huxley

Hodgkin e Huxley (1952) propuseram um modelo do neurônio estudando as propriedades elétricas do axônio gigante da lula (HODGKIN & HUXLEY, 1952). Em poucas palavras, eles descobriram que o início da reação de um potencial de ação é devido à ativação e inativação de canais iônicos voltagem-dependentes específicos para sódio e potássio. Eles transformaram esta afirmação em um modelo de circuito elétrico esboçado na Fig. 2.5. Negligenciando os componentes biológicos (veja (KANDEL, 2000) para maiores detalhes) e aplicando a lei das correntes de Kirchoff ao circuito da Fig. 2.5, tem-se que:

$$I_{tot} = C_m \frac{dV}{dt} + \sum_j i_j(t) \quad (2.4)$$

onde I_{tot} é a densidade de corrente da membrana, C_m é a capacitância da membrana por unidade de área, V é o potencial de membrana e $i_j(t)$ são as correntes iônicas fluindo através dos canais iônicos. No modelo de Hodgkin-Huxley (H-H) são considerados três canais: os canais sódio, potássio e um canal não especificado de vazamento.

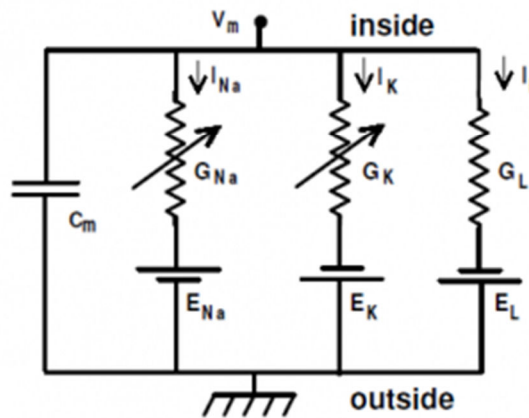


Figura 2.5: Figura esquemática do modelo elétrico de Hodgkin-Huxley derivado de medidas eletrofisiológicas do axônio gigante da lula (URL5).

O canal de vazamento é descrito por uma condutância constante g_l , enquanto que as condutâncias do sódio e do potássio são voltagem-dependentes, e o grau de abertura e fechamento desses canais depende do valor do potencial de membrana. Esta afirmação pode ser traduzida matematicamente introduzindo o conceito de probabilidade de abertura. Então, três variáveis de abertura, m e h para os canais de sódio, e n para os canais de potássio, controlam a probabilidade de que um canal esteja aberto. Então, a corrente $i_j(t)$ de (2.4) pode ser expressa como:

$$i_{Na}(t) = \bar{g}_{Na} \cdot m^3 \cdot h(V - E_{Na}) \quad (2.5)$$

$$i_K(t) = \bar{g}_K \cdot n^4 \cdot (V - E_K) \quad (2.6)$$

$$i_l(t) = g_l \cdot (V - E_l) \quad (2.7)$$

Em (2.5) a (2.7), E_{Na} , E_K e E_l são os potenciais de Nernst ou potenciais de equilíbrio dos íons sódio, potássio e de vazamento; \bar{g}_{Na} , \bar{g}_K e g_l são os valores de condutância para as três correntes acima mencionadas.

As variáveis de abertura m , h e n são expressas de acordo com as seguintes equações diferenciais:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V) \cdot ((1 - m) - \beta_m(V)) \cdot m \quad (2.8)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V) \cdot ((1 - h) - \beta_h(V)) \cdot h \quad (2.9)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V) \cdot ((1 - n) - \beta_n(V)) \cdot n \quad (2.10)$$

As variáveis α_i e β_i são as velocidades de reação e são funções empíricas de V que podem ser ajustadas para modelar os potenciais de ação registrados.

2.2.7 Transmissão sináptica

As células nervosas têm a capacidade especial de se comunicar rapidamente umas com as outras ou por órgãos efetores (por exemplo, músculo) por longas distâncias e com grande precisão. Sinapse é zona de contato especializada que possibilita essa comunicação. A transmissão sináptica pode ser elétrica, ou seja, a condução do potencial de ação resultaria do fluxo passivo da corrente do neurônio pré-sináptico para a célula pós-

sináptica; ou química, ou seja, uma substância química liberada pelo neurônio pré-sináptico desencadearia o fluxo de corrente na célula pós-sináptica.

Nas sinapses elétricas, canais iônicos especiais, os canais das junções comunicantes, nas membranas celulares pré- e pós-sinápticas, servem como pontes entre o citoplasma das duas células. Nas sinapses elétricas, parte da corrente também flui pelos canais que conectam as células pré- e pós-sinápticas. Esses canais têm baixa resistência e alta condutância, e a corrente que flui por eles a partir do neurônio pré-sináptico deposita uma carga positiva na face interna da membrana da célula pós-sináptica, despolarizando a célula. A corrente então flui para fora, pelos canais de repouso pós-sinápticos. Se a despolarização exceder o limiar, canais controlados pela voltagem na célula pós-sináptica se abrem e geram um potencial de ação.

Nas sinapses químicas não há continuidade citoplasmática entre as células; em vez disso, os neurônios são separados por um pequeno espaço, a fenda sináptica. Nas sinapses químicas, a membrana celular é morfologicamente especializada. As terminações pré-sinápticas contêm coleções discretas de vesículas sinápticas, cada uma delas preenchida por moléculas de neurotransmissores químicos. As vesículas liberam seu neurotransmissor para dentro da fenda sináptica em resposta ao influxo de Ca^{2+} que ocorre a cada potencial de ação. As moléculas transmissoras se difundem para a fenda sináptica e se fixam a sítios receptores na membrana celular pós-sináptica, fazendo com que canais iônicos se abram (ou fechem), desta maneira alterando a condutância e o potencial de membrana da célula pós-sináptica.

2.2.8 Integração sináptica

Cada neurônio no sistema nervoso central, quer na medula espinhal, quer no cérebro, é constantemente bombardeado por entradas sinápticas a partir de outros neurônios.

Ao mesmo tempo em que a célula pós-sináptica está recebendo entradas excitatórias, ela também pode estar recebendo entradas inibitórias que tendem a impedir o disparo de um potencial de ação.

Essas entradas competitivas são integradas no neurônio pós-sináptico por um processo chamado de integração neuronal, que irá definir se um neurônio gere ou não um potencial de ação. A capacidade do cérebro de escolher entre alternativas competitivas denomina-se ação integradora do sistema nervoso (KANDEL, 2000).

Nos neurônios motores e na maioria dos interneurônios, a decisão de iniciar um potencial de ação é tomada no segmento inicial do axônio. Essa região da membrana celular tem limiar mais baixo que o do corpo celular ou dos dendritos porque tem densidade mais alta de canais de Na^+ que se abrem e mais corrente flui para dentro do segmento inicial do axônio que em qualquer outra região da célula. O potencial de ação gerado no segmento inicial do axônio traz, então, a membrana do corpo celular até o limiar e, ao mesmo tempo, é propagado ao longo do axônio (KANDEL, 2000).

Alguns neurônios corticais têm uma ou mais zonas de gatilho adicionais dentro da árvore dendrítica. Essas zonas de gatilho dendríticas amplificam entradas excitatórias fracas que chegam a partes remotas do dendrito. Quando uma célula tem várias zonas de gatilho, cada uma delas soma a excitação e a inibição locais produzidas por entradas sinápticas próximas e, se a entrada resultante for acima do limiar, pode ser gerado um potencial de ação. Estes potenciais de ação não são conduzidos ao longo dos dendritos de modo regenerativo. Ao invés, propaga-se eletrotonicamente para o corpo celular e o cone de implantação do axônio, onde são integrados com todos os outros sinais de entrada na célula.

A integração neuronal é afetada por duas propriedades passivas da membrana neuronal: (1) A constante de tempo ajuda a determinar o decurso do tempo do potencial sináptico e, desta maneira, afeta a somação temporal, o processo pelo qual ações sinápticas consecutivas num mesmo sítio são adicionadas na célula pós-sináptica. Quanto maior a constante do tempo, tanto maior a probabilidade de que duas entradas consecutivas a partir de um neurônio pré-sináptico excitatório se somem para trazer a membrana celular a seu limiar para um potencial de ação.

(2) A constante de comprimento da célula determina o grau em que uma corrente despolarizante declina à medida que se espalha passivamente. Em células com constante de comprimento maior, os sinais se espalham até a zona do gatilho com decremento mínimo; em células com pequena constante de comprimento, os sinais declinam rapidamente com a distância. As entradas a partir de muitos neurônios pré-sinápticos, atuando em diferentes sítios sobre o neurônio pós-sináptico, têm que ser somadas, somação espacial.

As sinapses sobre um mesmo neurônio central são agrupadas segundo a função. Todas as três regiões da célula nervosa – o axônio, o corpo celular e os dendritos – podem ser sítios de recepção ou de transmissão para o contato sináptico. Os tipos de contato:

axoaxônicos, axossomáticos e axodendríticos. As sinapses axodendríticas podem ocorrer na haste ou na espícula de um dendrito. Contatos dendrodendríticos e somatossomáticos são raros.

A proximidade de uma sinapse à zona de gatilho da célula pós-sináptica é obviamente importante na terminação de sua eficácia. As sinapses sobre os corpos celulares são frequentemente inibitórias (KANDEL, 2000). As sinapses sobre as espículas dendríticas são frequentemente excitatórias. As sinapses sobre as terminações axônicas são frequentemente modulatórias. As sinapses axoaxônicas afetam a atividade do neurônio pós-sináptico controlando a quantidade de transmissor que este libera a partir de suas terminações em direção à próxima célula pós-sináptica.

A ação sináptica excitatória é mediada por canais seletivos controlados por transmissor para o sódio e o potássio. À medida que a força do estímulo extracelular é aumentada, mais fibras aferentes são excitadas, e a despolarização produzida pelo potencial sináptico excitatório torna-se maior. A despolarização torna-se, por fim, suficientemente grande para trazer o potencial de membrana do cone de segmento inicial do axônio até o limiar para a geração de um potencial de ação.

A abertura dos canais de sódio e de potássio leva a uma corrente despolarizante para dentro. Flui mais corrente para dentro pelos canais sinápticos quando a força motriz ($V_m - E_{PPSE}$) é aumentada.

À medida que a membrana é progressivamente despolarizada, entretanto, o PPSE diminui, até que desaparece próximo de 0mV, seu potencial de inversão. Nesse ponto a corrente de Na^+ é reduzida porque o potencial de membrana está agora mais perto de E_{Na} , e a corrente de K^+ é aumentada porque está mais longe de E_K . A despolarização adicional (além de 0mV) produz PPSE hiperpolarizante. A corrente de K^+ para fora agora torna-se maior que a corrente de Na^+ para dentro, resultando numa corrente iônica para fora efetiva porque o potencial de membrana está mais perto de E_{Na} que do E_K . A corrente sináptica tende sempre a manter o potencial de membrana próximo do seu potencial de inversão.

A ação sináptica inibitória é geralmente mediada por receptores canais seletivos para o cloreto. Os PPSIs geralmente hiperpolarizam a membrana; também reduzem a amplitude dos potenciais sinápticos pelas sinapses excitatórias.

A abertura dos canais de cloreto controlados por transmissor eleva o limiar para as ações excitatórias.

Os potenciais pós-sinápticos inibitórios nos neurônios motores espinhais e na maioria dos axônios centrais são gerados pela abertura de canais de Cl^- controlados por transmissor. Os canais para o Cl^- e o K^+ são semelhantes porque seus potenciais de inversão são mais negativos que o potencial de repouso da membrana. A força motriz eletroquímica sobre o Cl^- e o K^+ será positiva no potencial de repouso. Em resultado, a abertura dos canais de Cl^- e K^+ leva a um fluxo de corrente hiperpolarizante (fluxo de carga positiva) para fora.

O potencial de inversão para o PPSI era igual ao potencial de Nernst para o cloreto. O potencial de repouso de um neurônio central é geralmente próximo de E_{Cl} . Nessas células, as ações sinápticas que aumentam a condutância de Cl^- não alteram o potencial pós-sináptico da membrana de todo – a célula não é hiperpolarizada.

Quando os canais de Cl^- são abertos, o influxo de Cl^- impele o potencial de membrana em direção ao potencial de equilíbrio eletroquímico do Cl^- , ou o mantém no E_{Cl} , se já estiver a este nível. Como este potencial de inversão é de -70mV em alguns neurônios e, portanto, a uma certa distância do limiar para a geração de um potencial de ação (-55mV), a abertura dos canais de Cl^- aumenta o nível de entrada excitatória necessária para levar V_m em direção ao limiar. Além disso, a abertura dos canais de Cl^- aumenta a condutância global da membrana da célula pós-sináptica. Como a amplitude de um potencial sináptico excitatório é dependente de g_m , o aumento de g_m durante a inibição reduzirá a amplitude de quaisquer potenciais excitatórios que ocorram durante a ação inibitória.

A inibição está associada à abertura dos canais de K^+ . O efeito final da abertura dos canais de K^+ ou de Cl^- é semelhante e, em cada caso, inibe a célula pós-sináptica de três maneiras: (1) um PPSI mediado por K^+ ou Cl^- pode hiperpolarizar a membrana e deslocar o potencial de membrana para mais longe do limiar; (2) aumentando a permeabilidade do canais de Cl^- (ou de K^+) da célula, o potencial de membrana é estabilizado próximo de E_{Cl} (ou E_K), desta maneira impedindo-o de atingir o limiar; (3) a abertura dos canais de Cl^- (ou de K^+) aumenta a condutância da membrana e, assim, reduz a amplitude do PPSE. Este resultado é chamado de curto-circuito ou de derivação da ação da inibição (KANDEL, 2000).

Tal como ocorre na maioria das formas de ação sináptica excitatória, a abertura dos canais inibitórios não é influenciada pelo potencial da membrana – isto é, uma alteração no potencial da membrana não altera o número de canais abertos pelo transmissor. O

glutamato é um transmissor excitatório, enquanto que o GABA e a glicina são transmissores inibitórios.

2.2.9 Redes neuronais *in vitro*

As células podem viver, se reproduzir e até mesmo expressar suas propriedades diferenciadas em uma placa de cultura de tecidos. Neste caso, as células são observadas sob o microscópio ou analisadas bioquimicamente, comparando os efeitos da adição ou remoção de soluções específicas contendo hormônios e fatores de crescimento. Além disso, as interações entre diferentes tipos de células também podem ser estudadas através de meio de cultura mista. Entretanto, a maioria das células de vertebrados morre após um número finito de divisões em cultura. Células da pele humana, por exemplo, duram por vários meses em cultura, dividindo-se 50 a 100 vezes antes de morrerem. Supõe-se que este limite de tempo de vida está relacionado com o limite de tempo de vida do animal do qual a célula se derivou (ALBERTS, 1997).

Neste trabalho, culturas neuronais *in vitro* são consideradas o modelo biológico e experimental para estudar o ruído em registros extracelulares. Duas metodologias de preparações *in vitro* podem ser usadas: fatias de tecido e culturas neuronais dissociadas. Embora as culturas neuronais dissociadas seja a preparação usada em todos os experimentos presentes neste trabalho, uma breve descrição de fatias de tecido é apresentada na próxima seção.

a) *Fatias de tecido*

Fatias de tecido cerebral são fatias de centenas de micrômetros de espessura contendo em torno de 10^3 neurônios. A principal peculiaridade de usar esta preparação consiste em manter a estrutura original do cérebro intacta. Além disso, fatias de tecido são classificadas em agudas se elas podem ser mantidas vivas por algumas horas, e organotípicas, se elas podem ser mantidas vivas por vários dias.

b) *Culturas neuronais dissociadas*

As culturas neuronais dissociadas são obtidas do córtex cerebral de embriões de ratos. Em geral, neste tipo de procedimento, o tecido cerebral é dissociado mecanicamente por trituração e o tecido resultante é mantido em um meio nutritivo em cultura. Após 7 dias *in vitro* os neurônios corticais já exibem excelente crescimento e conexões sinápticas robustas permitindo o registro de atividade elétrica espontânea. Sob essas condições, atividade espontânea ainda pode ser mensurada da cultura com até 5 – 6 semanas *in vitro*.

2.3 Patch Clamp – Instrumentação Clássica para Eletrofisiologia

A técnica *voltage-clamp* originalmente foi desenvolvida por Kenneth Cole, em 1949, foi usada por Alan Hodgkin e Andrew Huxley no começo da década de 1950 em uma série de experimentos que revelaram os mecanismos iônicos subjacentes ao potencial de ação (KANDEL, 2000).

O *voltage-clamp* permite ao experimentador fixar o potencial de membrana em níveis predeterminados. Os canais iônicos voltagem-dependentes continuam a abrir ou fechar em resposta às alterações impostas no potencial de membrana, mas o *voltage-clamp* impede que as alterações resultantes da corrente da membrana modifiquem o potencial de membrana. Esta técnica então permite mensurar alterações da condutância da membrana devido a espécies iônicas individuais como função do potencial de membrana.

O *voltage-clamp* é composto por uma fonte de corrente conectada a um par de eletrodos, um no interior e o outro no exterior da célula, que é usada para mudar a separação de cargas, e assim a diferença de potencial elétrico através da membrana. Monitorando a corrente adicional injetada para fixar o potencial de membrana em um valor predeterminado, obtém-se então uma medida da corrente de membrana passando através dos canais iônicos na membrana.

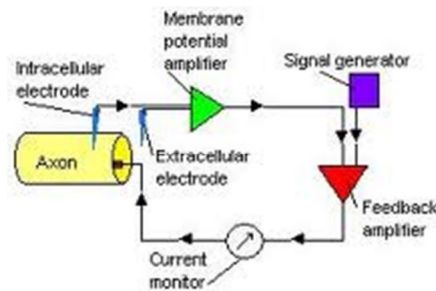


Figura 2.6: O *Voltage-clamp* mede a corrente através da membrana devido a uma população de canais iônicos (URL6).

A técnica *patch-clamp* é um refinamento do *voltage-clamp* e foi desenvolvida em 1967 por Erwin Neher e Bert Sakmann para o registro do fluxo de corrente por canais iônicos isolados (KANDEL, 2000). Na sua configuração chamada de “*cell-attached*”, uma pequena micropipeta de vidro, polida no fogo, com uma ponta de diâmetro da ordem de 1 μm é pressionada contra a membrana de uma célula. A pipeta é preenchida com uma solução salina semelhante àquela normalmente encontrada no fluido extracelular. Um

eletrodo metálico em contato com o eletrólito na micropipeta a conecta com um circuito elétrico especial que mensura a corrente que flui através de canais da membrana da ponta da pipeta.

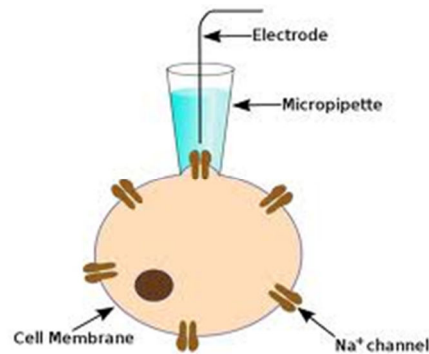


Figura 2.7: O *patch-clamp* permite registrar a corrente de um canal iônico isolado (URL7).

Em 1980 Neher descobriu que aplicando uma pequena quantidade de sucção na pipeta de *patch-clamp*, ocorria um aumento considerável do grau de selamento entre a pipeta e a membrana (KANDEL, 2000). O resultado foi um selo com resistência extremamente alta entre o lado interno e externo da pipeta. O selo diminuiu o ruído eletrônico e estendeu a utilidade dessa técnica para toda a gama de canais envolvidos no processo de excitabilidade elétrica, incluindo aqueles com baixa condutância. Desde esta descoberta, Neher e Sakmann, e muitos outros, tem usado a técnica *patch-clamp* para estudar as três principais classes de canais iônicos – voltagem-dependentes, ligantes-dependentes e mecano-dependentes – em diversos neurônios e em outras células.

2.4 Matriz Multieletrodo – Instrumentação Não-Convencional

Graças ao avanço da eletrônica, sistemas comerciais baseados na metodologia Arranjos Micro-Multi-Eletrodo (MEA) estão disponíveis atualmente. Muitos laboratórios de neuroengenharia estão usando esta abordagem para estudar as leis que fundamentam o comportamento da rede neuronal (POTTER & DeMARSE, 2001; MAROM & SHAHAF, 2002; BOVE et al., 1997; GROSS et al., 1985; JIMBO et al., 1999).

Métodos convencionais (como o *voltage* ou *patch-clamp*) permitem registrar (ou estimular) sinais neuronais somente de poucas células e de forma invasiva. Os Arranjos

Multi-Eletrodo, pelo contrário, permitem registrar sinais neuronais extracelulares simultaneamente de centenas de eletrodos não invasivos.

Embora as formas de onda dos sinais neuronais extracelulares registradas pelas MEAs sejam diferentes das formas de onda dos sinais intracelulares e a relação sinal-ruído seja menor, a presença de *spikes* pode ser facilmente detectada.

THOMAS et al. (1972) descreveu o primeiro Arranjo Multieletrodo que consistia de microeletrodos de ouro platinado embutidos em um substrato de vidro e passivados por fotorresistência. Este dispositivo permitia registrar potenciais de campo de contrações espontâneas de cardiomiócitos de galinha em cultura, mas não era capaz de registrar a atividade de uma única célula.

Na década de 1980, GROSS et al. (1982) e PINE (1980) projetaram arranjos compostos de 32 eletrodos capazes de registrar a atividade eletrofisiológica de células excitáveis e validaram esta abordagem em redes neuronais.

MEAs permitem registrar sinais neuronais de longo prazo graças a suas propriedades não invasivas e, ao mesmo tempo, permitem aplicar estímulos externos usando os mesmos eletrodos.

GROSS (1994) foi o pioneiro na análise de padrões de atividade elétrica recorrente de potenciais de ação em culturas neuronais obtidas da medula espinhal de rato. Estas preparações exibiram espontaneamente uma variedade de padrões espaço-temporais de *spike* e *burst*.

(GROSS et al., 1992) também demonstrou que é possível alternar entre diferentes modelos de atividade de *burst* (periódico vs. aleatório) por meio da aplicação de agentes farmacológicos externos.

(KAWANA et al., 1992) estudou a plasticidade em padrões de atividades espontâneas e evocadas em culturas corticais dissociadas de ratos. Nesse trabalho, foi induzida potenciação ou depressão na atividade neuronal aplicando uma rápida sequência de estímulos fortes (estimulação tetânica). Os autores demonstraram que é possível induzir potenciação de longo prazo (do inglês, *long-term potentiation* – LTP) ou depressão de longo prazo (do inglês, *long-term depression* – LTD) em uma via específica (JIMBO et al., 1998).

Também há laboratórios que usam fatias de tecido do cérebro acopladas a MEAs ao invés de culturas neuronais dissociadas, com a vantagem de reter a estrutura original do cérebro intacto (WHEELER & NOVAK, 1986; BOPPART et al., 1992; BORKHOLDER

et al., 1997; EGERT et al., 1998; BORRONI et al., 1991). Embora arranjos multieletródos planares possam ser usadas para a análise de fatias de tecido, arranjos com eletrodos 3-D com pequenas pontas em suas terminações estão sendo desenvolvidas e usadas nos laboratórios. Desta forma, é possível penetrar a fatia e registrar um sinal mais nítido.

2.4.1 A Tecnologia MEA

Esta seção apresenta um resumo da tecnologia MEA. Uma descrição detalhada pode ser encontrada em TAKETANI & BAUDRY (2006).

As MEAs são constituídas de eletrodos, cujo tamanho é aproximadamente igual ao tamanho das células (10 – 100 μm de diâmetro), que são colocados em um substrato de vidro. Os eletrodos, tipicamente fabricados de ouro (Au), Óxido de Índio-Titânio (ITO), Nitreto de Titânio (TiN) ou platina preta, devem ser biocompatíveis, duração de longo prazo, e preferencialmente devem ter baixa impedância (inferior a 500 k Ω a 1 kHz) para baixo ruído térmico.

A superfície da MEA e dos eletrodos são revestidos com isolantes biocompatíveis (por exemplo, poliamida ou óxido/nitreto de silício) que evitam curto-circuitos com o banho eletrolítico. Estes isolantes, novamente revestidos com moléculas de adesão tais como polilisina e laminina, permitem e ajudam o neurônio a aderir na superfície do dispositivo. A baixa impedância dos eletrodos e a escolha de um intervalo de tensão correto para evitar a geração de complexos redox neurotóxicos, permite usá-los para fornecer estímulos externos.

A fabricação das MEAs é baseada em uma tecnologia de película fina (ELSHABINI-RIAD & BARLOW, 1998) e é realizada em uma sala limpa de fabricação de semicondutores. Fotolitografia, isto é, o processo para transferência de formatos geométricos de uma máscara para a superfície de uma lâmina de silício, é usado para fabricar MEAs. Os passos envolvidos no processo fotolitográfico são: limpeza química da lâmina, isolamento, aplicação de fotoresistência, secagem (“*soft-baking*”), alinhamento da máscara, fotografia e desenvolvimento, “*hard-baking*”.

Limpeza química da lâmina remove partículas em suspensão em sua superfície bem como qualquer traço de impurezas orgânicas, iônicas e metálicas. Depois do processo de limpeza, uma camada de SiO₂, que se comporta como uma camada de barreira, é depositada sobre a superfície da lâmina. Depois que esta camada é formada, o processo de fotoresistência começa e é aplicado na superfície da lâmina por uma centrífuga de alta velocidade: esta técnica é conhecida como “*spin coating*”.

“*Soft-baking*” é o passo pelo qual quase todos os solventes são removidos do revestimento fotoresistente. Desta maneira, uma camada rígida pode ser obtida e então exposta a luz UV.

Um dos mais importantes passos em fotolitografia é o alinhamento da máscara. Uma máscara é uma placa de vidro (ou quartzo) quadrado com um filme metálico moldado sobre um lado. A máscara é alinhada com a lâmina, de modo que o molde possa ser transferido sobre a superfície da lâmina. Em um processo multilítográfico, cada máscara é alinhada ao molde antecedente (transferido).

Uma vez que a máscara tiver sido precisamente alinhada com o molde sobre a superfície da lâmina, o material fotoresistente é exposto a uma luz ultravioleta de alta intensidade (tipicamente luz UV, 365 nm comprimento de onda).

2.4.2 As MEAs padrão

A rápida propagação das tecnologias descritas na Seção 2.4.1 permitiu que algumas companhias de produtos eletrônicos desenvolvessem sistemas comerciais para realizar medições eletrofisiológicas usando MEAs.

Atualmente, existem no mercado no mínimo dois sistemas de aquisição completos baseados em MEAs: o Sistema MED produzido pela *Panasonic* (Osaka, Japão, URL8) e o Sistema MEA produzido pela *Multi Channel Systems* (Reutlingen, Alemanha, URL9). Outras empresas, tais como a *Ayanda Biosystems* (Lausanne, Suíça, URL10) e *Plexon* (Dallas, EUA, URL11) desenvolvem somente os dispositivos microeletrodos, produzindo MEAs para várias aplicações (culturas, fatias, cardiomiócitos, células da retina, triagem farmacológica, etc.). A Fig. 2.9 mostra quatro MEAs produzidas pela *Multi Channel Systems*, *Panasonic* e *Ayanda*.

Todos os resultados experimentais apresentados neste trabalho foram obtidos de registros realizados em MEAs manufaturadas pela *Multi Channel Systems*. A seção seguinte descreve o *set-up* experimental para aquisição de sinais eletrofisiológicos espontâneos.

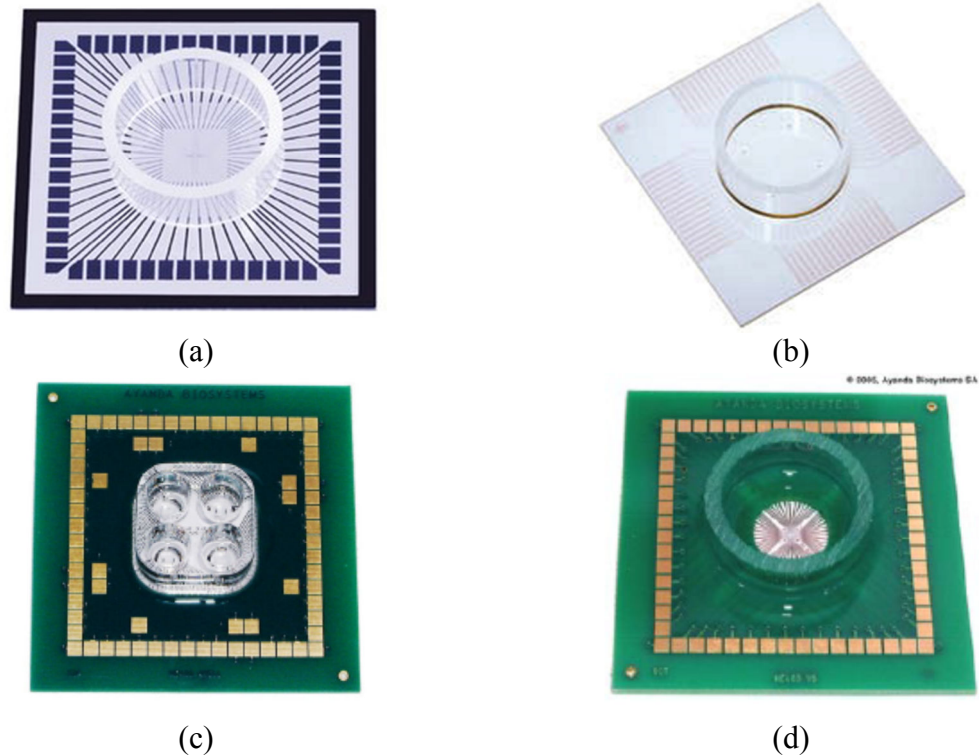


Figura 2.8: MEAs produzidas por diferentes empresas. (a) MEA 10/200 planar da *Multi Channels Systems* para culturas dissociadas (URL9), (b) MED64 fabricado pela *Panasonic* (URL8), (c) MEA biochip planar com multi-compartimentos, para manipulações farmacológicas, fabricada pela *Ayanda-Biosystems* (URL10), (d) Mea biochip 3D para preparações de *slices*, fabricado pela *Ayanda-Biosystems* (URL10).

a) O projeto da MEA

Diferentes tipos de MEAs (tamanho de eletrodo e espaçamento entre eletrodos) estão disponíveis pela *Multi Channel Systems* (MCS). As MEAs usadas neste trabalho consistem de 60 eletrodos redondos e planares (lisos) de nitreto de titânio (TiN). As trilhas e as pastilhas de contato são fabricadas com titânio ou óxido de estanho-índio (ITO), e o material isolante é de nitreto de silício (Si_3N_4). Os eletrodos estão posicionados em uma disposição matricial 8×8 com os eletrodos dos cantos inativos. As pastilhas de contato e as trilhas de ITO são transparentes para permitir uma visão perfeita da cultura neuronal embaixo do microscópio.

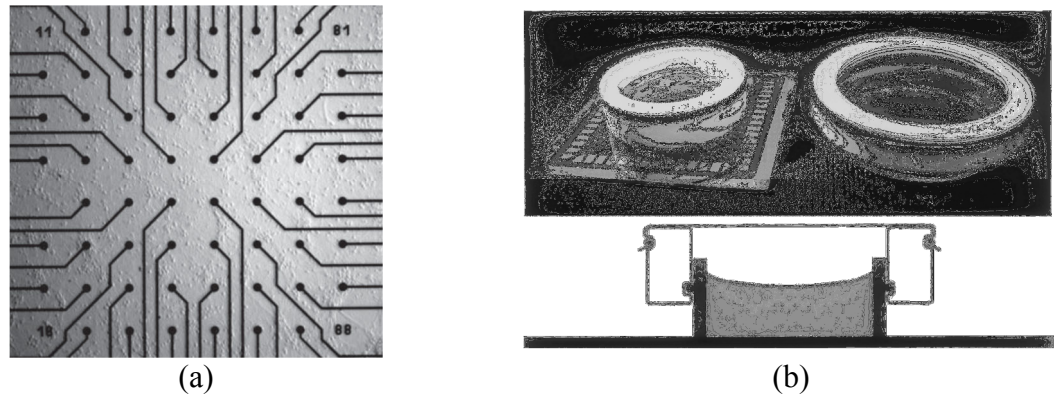


Figura 2.9: (a) Layout da MEA de um dispositivo da MCS (*Data Sheet MCS*, URL9) e (b) membrana hidrofóbica transparente usada para preservar a cultura de contaminação. Modificado de (POTTER & DeMARSE, 2001).

Eletrodos com diâmetros de 10 μm ou 30 μm estão disponíveis com uma distância entre eletrodos de 30 μm , 100 μm , 200 μm ou 500 μm .

As MEAs mais recentes são equipadas com um eletrodo de referência interno usado para minimizar a possibilidade de poluição que deve ser causada pela introdução de um eletrodo de referência externo. O eletrodo 15 é o eletrodo-padrão das MEAs usadas neste trabalho.

Um anel de vidro é colocado no centro do arranjo, e ele permite conter o meio de cultura. Desta maneira, quando colocado em uma incubadora, a cultura pode sobreviver por várias semanas. Há vários fatores que contribuem para o declínio gradual na saúde da cultura, por exemplo, contaminação por organismos patogênicos, aumento da pressão osmótica do meio devido a evaporação.

Por estas razões, um novo utensílio foi desenvolvido para reduzir os efeitos destes fatores externos (POTTER & DeMARSE, 2001) (Fig. 2.10b). Ele consiste de uma tampa que forma uma vedação à prova de gás, incorporando uma membrana hidrofóbica transparente que é seletivamente permeável ao oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2), e relativamente impermeável a vapor de água. Este utensílio evita contaminação e reduz muito a evaporação, permitindo o uso de uma incubadora não umedecida.

b) Set-up experimental baseado em dispositivos MEA.

O set-up experimental da *Multi Channel Systems* é composto dos seguintes componentes contidos dentro de uma gaiola de Faraday a fim de reduzir interferências eletromagnéticas:

- Amplificador MEA1060:

Um estágio amplificador para registro multi-eletrodo tem de cumprir dois requerimentos principais: deve eliminar os cabos de conexão dos eletrodos, e enfrentar a interferência (fenômeno *cross-talk*) entre os canais.

O amplificador MEA1060 é um pré-amplificador e amplificador de linha integrado completo que atende os requisitos mencionados acima. O sensor MEA é colocado diretamente dentro do amplificador é fixado de modo a encaixar o microscópio padrão. Esta configuração permite eliminar todos os cabos e ao mesmo tempo, ter um estágio de amplificação muito próximo à fonte do sinal.

- Placa de aquisição de dados PCI:

O componente de aquisição da MCS é uma placa PCI A/D desenvolvida para registro de até 128 canais e ele converte sinais analógicos em sinais digitais com uma frequência de amostragem de até 50 kHz. É possível fixar o intervalo das tensões de entrada de ± 400 mV a ± 4 V em um programa *MC_Rack* (veja abaixo) e este permite usar uma resolução de 12 bits para sinais de qualquer amplitude.

- Software de aquisição *MC_Rack*:

O software *MC_Rack* permite registrar simultaneamente a atividade eletrofisiológica de 60 eletrodos da MEA e monitorar os dados brutos em tempo real. Parâmetros adicionais podem ser extraídos dos vetores de dados e os resultados podem ser mostrados em gráficos, salvos e exportados para outros programas para análise futura.

- Controlador de temperatura da MCS:

O controlador de temperatura MCS usa uma tecnologia Proporcional Integral Derivativo (PID). A temperatura da MEA pode variar em um intervalo entre a temperatura ambiente e $+50^{\circ}\text{C}$. A temperatura de *set-point* é alcançada no intervalo de 30 s a 5 minutos, dependendo da configuração do sistema de registro. A Fig. 2.10 mostra um esboço dos principais componentes do *set-up* experimental mencionado acima.

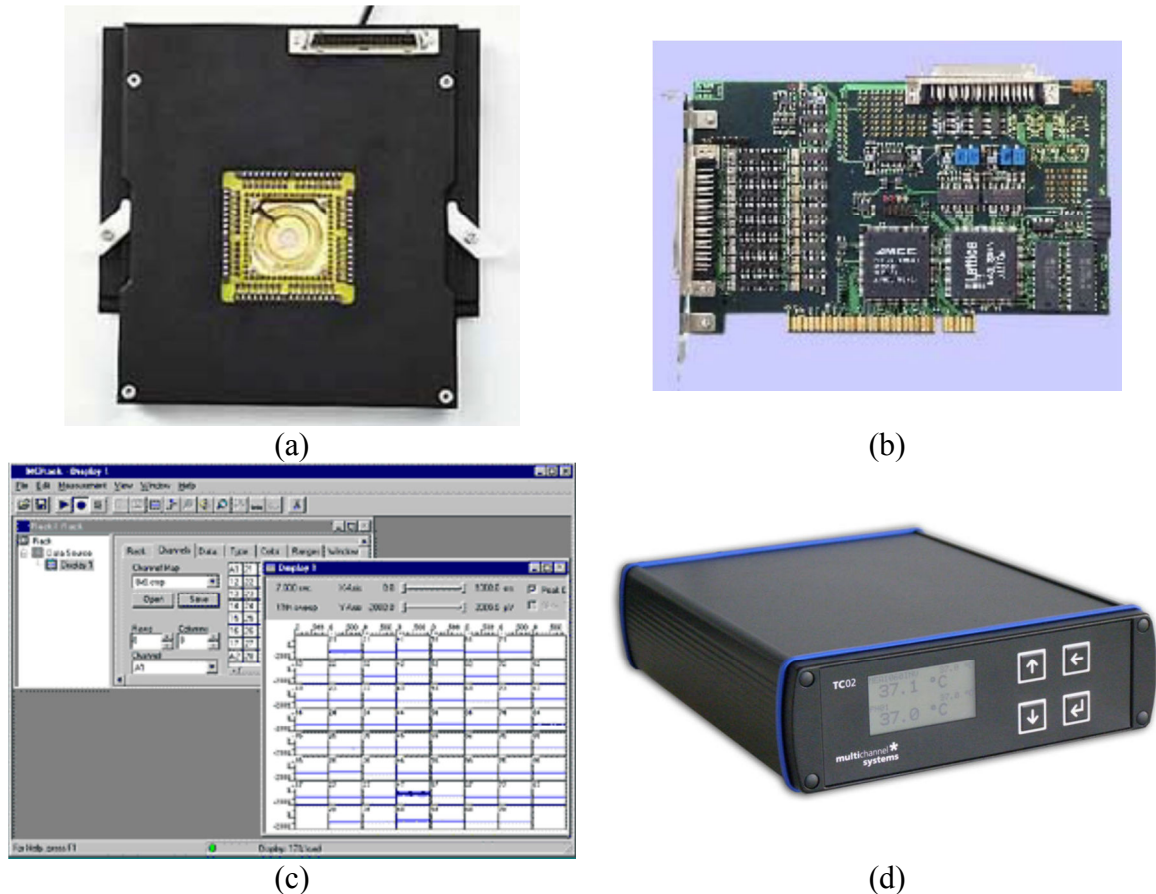


Figura 2.10: *Set-up* experimental MCS (*Data Sheet MCS*, URL9). (a) Amplificador MEA1060, (b) placa de aquisição de dados PCI, (c) software *MC_Rack*, (d) controlador de temperatura MCS.

2.4.3 Aplicações

▪ Análise da codificação neural

Diversos centros de pesquisa estão registrando continuamente o código neural, gerando uma quantidade enorme de dados elétricos ou ópticos que necessitam de análise.

A velocidade dos computadores permite realizar a análise e a geração de estímulos para a simulação do comportamento de um tecido nervoso num determinado ambiente, bem como a interação com ele. A utilização de culturas contendo desde poucas dezenas a centenas de células pode ser considerada simples, permitindo assim a indução de padrões de aprendizado, de reconhecimento e de processamento (RIBEIRO, 2006).

(KRAUSE, 2003) utiliza MEAs planares para criar ou melhorar métodos que avaliam as combinações em cultura. Ele utiliza o processamento paralelo, quando otimiza as questões de *hardware*, *software* e outras tecnologias de incubação, para realizar medidas de várias culturas simultaneamente; combina MEAs e aplicações em cultura para o estudo

de substâncias neurotóxicas; e utiliza uma MEA planar bidimensional. Com espaçamento adequado entre os eletrodos, podem ser estudadas múltiplas regiões corticais simultaneamente, considerando apenas uma combinação para a saída obtida.

Outro método para análise da codificação neural utiliza um arranjo multieletrodo de três dimensões, composta por microchips com subarranjos de diferentes configurações (HUI-YUAN, 2005).

- Neuroimplantes

Na literatura existe a proposição de neuroimplantes adaptáveis às condições específicas do paciente. Uma vez que os potenciais de ação são adquiridos e corretamente traduzidos pela interface bioeletrônica, é necessário amplificá-los e formatá-los, para posteriormente realizar processamentos de sinais. O objetivo é atuar na informação biológica com fins terapêuticos. O resultado deste processamento deve ser formatado “biologicamente”, em termos das amplitudes de tensão e de frequências, para que, através de uma interface bioeletrônica, retorne ao mundo biológico (BERGER, 2001).

Os desafios tecnológicos mais importantes para a concretização do uso clínico de neuroimplantes são o desenvolvimento de modelos matemáticos coerentes com a variabilidade biológica do organismo humano e a implementação de dispositivos biocompatíveis, ou seja, mínima dissipação de potência. A amplitude desta em microprocessadores comuns excede em diversas ordens de grandeza os níveis de energia do encéfalo, levando à possibilidade de grave lesão do córtex caso circuitos comuns sejam implantados.

- Farmacologia

No contexto das aplicações farmacológicas (CHIAPPALONE, 2003), dentre as características relevantes, destaca-se o monitoramento da atividade elétrica dos neurônios por um longo período de tempo, a forma não-invasiva de instrumentação e a gravação simultânea de até dezenas de canais.

O biossensor MEA constitui um sistema ideal *in vitro* para monitorar os efeitos crônicos e agudos de drogas e toxinas, e apresenta estudos funcionais induzindo condições patológicas sem danos. A gravação da resposta elétrica é realizada em vários locais de um tecido, e portanto um mapa de diferentes drogas pode ser gerado, provendo conclusões importantes sobre a atuação bioquímica específica da droga em estudo.

- Interface cérebro-máquina

(ROUSCHE, 2003) introduziu um sistema para gravações em ratos, implantando-se MEAs em seu córtex, gerando um “robô rato”, o RABOT. Ele é um sistema especial para experimentos em neurociência e engenharia neural, visto que induz a locomoção de pequenos robôs a partir da aquisição de sinais do córtex motor de ratos.

- Implante medular e nanotecnologia

Doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla, podem induzir a perda da funcionalidade no organismo humano. Desta forma, a implantação de biossensores em sistemas neurais para a eletro-estimulação tem sido aumentada a cada dia. A nanotecnologia utiliza dispositivos protéticos para suplemento ou substituição de funções do sistema nervoso (PEYMAN, 1998; ZRENNER, 1999).

2.5 Algoritmos de análise de dados

2.5.1 Análise de *spikes*

a) Detecção de *spikes*

O algoritmo de detecção de *spikes* é um passo crucial para analisar sinais eletrofisiológicos provenientes de redes neuronais (MASSOBRIO, 2008). Vários algoritmos estão sendo desenvolvidos por pesquisadores e vários deles estão descritos na literatura. Estes podem ser algoritmos simples baseados em limiares fixos ou até mesmo sofisticados classificadores de sinais (MAROM & SHAHAF, 2002; CHAPIN, 2004; DeMARSE et al., 2001). O algoritmo usado neste trabalho pertence à família de algoritmos de detecção baseados em limiar (PERKE et al., 1967). O algoritmo denominado *Spike Detection Differential Threshold* (SDDT) (MACCIONE et al., 2009) consiste em definir um valor de limiar (*threshold*) de pico a pico, determinado como um múltiplo do desvio padrão do sinal ($thresh = f \times dp$). O valor default para o fator multiplicativo (f) é 7; contudo f pode variar entre 5 e 8, como relatado na literatura (JIMBO et al, 1998; SHAHAF & MAROM, 2001). O sinal bruto é processado por meio de uma janela que se desloca ao longo do sinal (Fig. 2.11), ajustada para manter no máximo um único *spike* no seu interior (tipicamente 2ms). Um pico é detectado quando a diferença absoluta entre o valor mínimo e o valor máximo pertencente à janela ultrapassa o limiar (*threshold*). Assim, o *spike* é detectado e seu instante de tempo é armazenado.

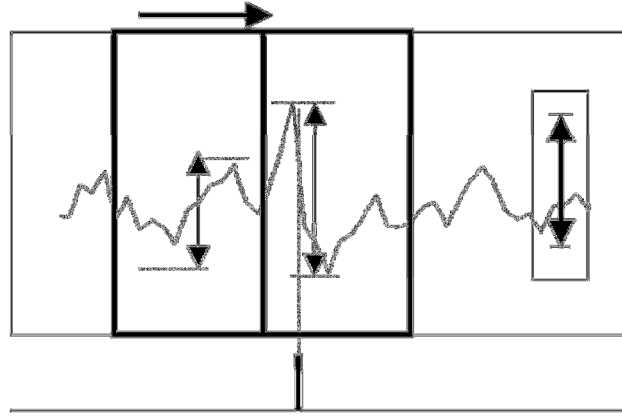


Figura 2.11: Identificação de um *spike*. Modificada de (CHIAPPALONE, 2003).

Do ponto de vista fisiológico, o *spike* é uma alteração muito rápida na amplitude e no espectro de frequências do sinal extracelular. Essa alteração da atividade basal pode ser resultante do disparo de um potencial de ação por uma única célula, ou de um conjunto de células que disparam simultaneamente resultando no *spike*.

b) Taxa média de disparo

A taxa média de disparo, do inglês *Mean Firing Rate* (MFR), pode ser estimada como a razão entre o número de *spikes* registrados (N) e o intervalo temporal de observação (T), isto é,

$$MFR = \frac{\int_0^T \sum_{s=1}^N (\delta(t - t_s)) dt}{T} = \frac{N}{T} \quad (2.10)$$

onde δ é a função delta de Dirac, t é o tempo e t_s é o instante temporal do *spike*.

A MFR é usada para caracterizar o nível de atividade eletrofisiológica da rede: se um eletrodo apresenta uma $MFR < 0,2$ spike/s, ele é considerado inativo e, então, é descartado de análises futuras.

c) Intervalo entre spikes

A distribuição de intervalos entre *spikes*, do inglês *Inter-Spike-Interval* (ISI), fornece uma estimação estatística da probabilidade de disparo do *spike* subsequente relativo a um *spike* de referência. Matematicamente, pode ser expresso como:

$$ISI(\tau) = \frac{1}{N-1} \sum_{s=1}^{N-1} \delta(t_{s+1} - t_s - \tau) \quad (2.11)$$

onde N é o número total de *spikes*, δ é a função delta de Dirac, τ é a largura da janela e t_s é o instante temporal do *spike*.

2.5.2 Análise de *Burst*

a) Detecção de *burst*

O algoritmo de detecção de *burst* é baseado em dois parâmetros principais. Uma vez que *bursts* são constituídos de vários *spikes* que estão próximos entre si, um valor ISImax é definido para declarar que um *spike* pertence a um *burst*. Além disso, desde que *bursts* são espaçados por centenas de milissegundos, um valor IBImin é definido para distinguir dois *bursts* consecutivos. Assumindo ISImax = IBImin, e aplicando o critério supracitado para a sequência de *spikes*, a sequência de *Bursts* (BT) pode ser obtida como segue:

$$BT(t) = \sum_{b=1}^M \left[A_b \cdot \prod \left(\frac{t - t_b - \frac{T_b}{2}}{T_b} \right) \right] \quad (2.12)$$

onde T_b é a duração do *burst*, t_b é o instante de tempo que o *burst* se inicia, M é número do *burst*, e A_b é amplitude do *burst*. Assim, os *bursts* são identificados e suas características (isto é, duração, taxa, etc) são armazenadas para análise (CHIAPPALONE, 2005).

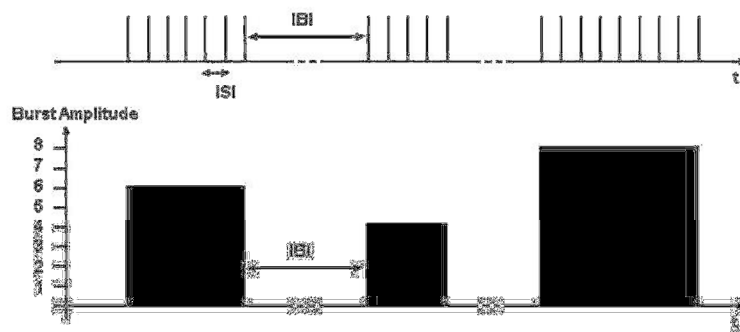


Figura 2.12: Intensidade e intervalo entre *bursts*. Modificada de (CHIAPPALONE, 2003).

Do ponto de vista fisiológico, um *burst* trata-se de uma sucessão de potenciais de ação provenientes de uma única célula ou de um conjunto de células. Existem algoritmos de *spike sorting* que conseguem definir o número de células envolvidos na formação do *burst* bem como separar os *spikes* gerados por cada um desses neurônios.

b) *Taxa média de burst*

A taxa média de *burst*, do inglês *Mean Bursting Rate (MBR)*, calcula o número de *bursts* por minuto e é definido como:

$$MBR = \frac{M}{T} \quad (2.13)$$

onde M é o número de *bursts*, e T é a janela temporal de observação.

c) *Intervalo entre bursts*

O intervalo entre *bursts*, do inglês *Inter-Burst-Interval (IBI)*, é análogo ao ISI, porém calculado para a atividade de *burst*. É definida como:

$$IBI(T_b) = \frac{1}{M-1} \sum_{b=1}^{M-1} \delta(t_{b+1} - t_b - T_b) \quad (2.14)$$

onde δ é a função delta de Dirac, T_b é a duração do *burst*, t_b é o instante de tempo que o *burst* se inicia, M é número do *burst*. O IBI representa o intervalo de tempo entre dois *bursts* consecutivos.

2.6 Considerações Finais

Neste capítulo foram apresentados os principais conceitos de neurofisiologia e eletrofisiologia que embasam esta dissertação. A MEA é uma nova ferramenta que vem sendo largamente difundida nos laboratórios de eletrofisiologia para o estudo dos processos neuronais associados ao comportamento coletivo de neurônios. A MEA permite o estudo de diversos mecanismos biológicos associados à dinâmica neuronal, tais como plasticidade, conectividade, dentre outros.

A MEA registra o potencial extracelular de um preparo biológico (cultura de células ou fatias de tecido) em relação a um eletrodo-padrão e a análise desses sinais dá-se por meio do processamento clássico de *spikes* e *bursts*. Além disso, estatísticas básicas são empregadas para quantificar esses registros e encontrar padrões de disparo no intuito de inferir sobre o comportamento coletivo de centenas de neurônios.

A tecnologia MEA pode ser considerada uma metodologia nova (não convencional) no campo da eletrofisiologia e trata-se de uma área fértil de pesquisas. Uma etapa fundamental dessa linha de pesquisa consiste em definir técnicas matemáticas para o

processamento desses sinais, uma vez que a quantidade de dados gerados em medidas MEA é cada vez maior devido ao aumento do número de eletrodos nesses dispositivos.

Enquanto a MEA registra o potencial extracelular de um conjunto de neurônios, a tecnologia *Patch-Clamp* mede o potencial intracelular em uma única célula. Em geral, essa técnica visa medir a corrente que flui por um único canal iônico, ou por um conjunto de canais iônicos de uma mesma célula. Assim, é importante frisar que a MEA não tem como objetivo tornar a tecnologia *Patch-Clamp* obsoleta, mas sim possibilitar a realização de experimentos laboratoriais que não são viáveis com *Patch-Clamp*, como o registro simultâneo da atividade elétrica de centenas de neurônios e pesquisar o comportamento complexo que emerge dessa atividade coletiva.

CAPÍTULO 3

REVISÃO RUÍDOS

3.1 Introdução

Ruídos são distúrbios, interferências que ocorrem quando se mensura um determinado sinal. Todos os tipos fundamentais de ruído são estocásticos por natureza. Suas propriedades médias podem ser mensuradas, mas seus valores instantâneos no tempo não podem ser preditos. Muitos processos ruidosos tem uma distribuição Gaussiana da amplitude instantânea versus tempo (SHERMAN-GOLD, 1993).

Este capítulo está dividido em duas partes principais. Inicialmente, são examinadas as fontes de ruído presentes em membranas biológicas e, então, algumas inferências sobre as propriedades da membrana podem ser feitas a partir de medições do ruído de membrana (STEVENS, 1972). Em seguida, são discutidos os ruídos gerados a partir dos dispositivos físicos envolvidos no processo de medição. Estes ruídos podem resultar dos instrumentos de medida (eletrodos), da instrumentação eletrônica (amplificadores), de fontes externas (lâmpadas fluorescentes, monitores, vibrações mecânicas, etc) e de processos de digitalização do sinal (SHERMAN-GOLD, 1993).

Os tipos de ruídos descritos neste capítulo são caracterizados em termos de sua densidade espectral de potência.

3.2 Ruído devido às propriedades elétricas da membrana (STEVENS, 1972)

Medidas realizadas em membranas nervosas e musculares fornecem um valor médio da variável sob investigação. Por exemplo, em experimentos do tipo *voltage-clamp* em membranas excitáveis, a corrente mensurada é o valor médio das correntes individuais que fluem em uma grande população de canais iônicos. Assim, não é possível inferir sobre o comportamento de membros individuais de uma população (STEVENS, 1972). Por isso, muitos pesquisadores têm estudado o ruído elétrico em membranas nervosas e musculares a fim de obter mais informações que possam ajudar a revelar mecanismos em um nível mais microscópico (DERKSEN & VERVEEN, 1966, apud STEVENS, 1972; KATZ & MILEDI, 1970, 1971, apud STEVENS, 1972).

Com base na teoria física, no mínimo quatro fontes de ruído elétrico devem estar presentes em membranas nervosas e musculares. São elas:

- (a) Ruído térmico (*Johnson-Nyquist noise*)
- (b) Ruído balístico (*shot noise*)
- (c) Ruído 1/f (*Flicker noise*)
- (d) Flutuações de condutâncias.

Cada um desses ruídos será descrito detalhadamente abaixo.

3.2.1 Ruído térmico.

A agitação térmica de portadores de carga, principalmente dos íons, faz surgir o potencial de membrana e flutuações de corrente na membrana. A densidade espectral de potência do ruído térmico é proporcional à parte real da impedância complexa passiva da membrana, ou seja,

$$S_{te}(f) = 4kT \cdot \text{Re}\{Z(f)\} \quad (3.1)$$

onde $S_{te}(f)$ é a densidade espectral de potência do ruído de tensão, $\text{Re}\{Z(f)\}$ é a parte real da impedância complexa $Z(f)$ da membrana, f é a frequência, k é a constante de Boltzman e T é a temperatura absoluta.

Se a tensão é mantida constante e a corrente de membrana é mensurada, a corrente de ruído tem a seguinte densidade espectral de corrente:

$$W_{te}(f) = 4kT \cdot \text{Re}\left\{\frac{1}{Z(f)}\right\} \quad (3.2)$$

Então, para uma membrana representada por um circuito RC paralelo, a tensão de ruído tem a seguinte densidade espectral:

$$S_{te}(f) = \frac{4kTR}{1 + 4\pi^2(RCf)^2} \quad (3.3)$$

E a corrente de ruído tem a seguinte densidade espectral:

$$W_{te}(f) = \frac{4kT}{R} \quad (3.4)$$

onde R e C são a resistência e a capacitância da membrana respectivamente.

A partir da medida de $S_{te}(f)$ é possível estimar os valores de R e C e então confirmar que a membrana pode ser representada por um circuito RC paralelo.

No entanto, a membrana nervosa não é exatamente representada por um circuito RC ideal e uma predição mais exata da densidade espectral da tensão de ruído para o axônio gigante da lula pode ser encontrada em (STEVENS, 1972).

De acordo com (3.1) e (3.2) somente a parte real da impedância complexa da membrana poderia ser determinada. No entanto, toda a impedância complexa pode ser estimada porque sua componente imaginária pode ser calculada simplesmente fazendo-se a transformada de Hilbert da parte real.

3.2.2 Ruído balístico (*Shot noise*)

Seja $F(t)$ a corrente que flui através de um circuito como o resultado do movimento de um único íon se movendo através da membrana. Para simplificar, vamos assumir que cada íon tem aproximadamente o mesmo deslocamento dentro da membrana, que os íons movem independentemente entre si e que eles entram na membrana de acordo com um processo de Poisson com uma taxa r . De acordo com a teoria do ruído balístico, a densidade espectral $W_{ba}(f)$ da corrente de ruído desta fonte, sob condições de *voltage clamp*, deve ser dado por

$$W_{ba}(f) = r |\mathcal{F}\{F(t)\}|^2 \quad (3.5)$$

\mathcal{F} denota a transformada de Fourier. Sob condições de *current clamp*, o espectro da tensão de ruído $S_2(f)$ é dado por

$$S_{ba}(f) = W_{ba}(f) |Z(f)|^2 \quad (3.6)$$

desde que a impedância complexa da membrana $Z(f)$ filtra a corrente de ruído, deve ser observado que (3.6) é uma relação geral entre o espectro de tensão e de corrente.

Como o espectro de corrente do ruído balístico está relacionado a $F(t)$, que por sua vez reflete o movimento do íon dentro da membrana, medidas de $W_{ba}(f)$ podem, a princípio, retratar a passagem do íon através da membrana. No entanto, $W_{ba}(f)$ é provavelmente imensurável na prática porque a densidade espectral teria que ser determinada em frequências extremamente altas. A exigência para medidas em altas frequências provém do fato de que quando um único íon transita através da membrana,

esse deve causar somente um breve fluxo de corrente, que por sua vez implica que a transformada de Fourier desta função se espalha sobre um intervalo de frequências muito grande.

3.2.3 Ruído 1/f (*Flicker noise*)

De acordo com a lei de Hooge (HOOGE, 1969, apud STEVENS, 1972; HOOGE & GAAL, 1971, apud STEVENS, 1972), a densidade espectral da corrente de ruído mensurada sob condições de *voltage clamp* é proporcional ao quadrado da corrente média, e inversamente proporcional ao número de cargas conduzidas através do meio bem como à frequência, então:

$$W_{1/f}(f) = \frac{AI^2}{N_T f} \quad (3.7)$$

$W_{1/f}(f)$ é a densidade espectral da corrente de ruído, N_T é o número total de cargas conduzidas dentro da membrana, I é corrente média, f é a frequência, e A é uma constante igual a 2×10^{-3} para elétrons em metais (HOOGE, 1969, apud STEVENS, 1972) e 1 para íons em soluções salinas 0,1M (HOOGE & GAAL, 1971, apud STEVENS, 1972). Como descrito anteriormente, em uma situação de *current clamp*, a densidade espectral de tensão $S_{1/f}(f)$ está relacionada à $W_{1/f}(f)$ por

$$S_{1/f}(f) = W_{1/f}(f) |Z(f)|^2 \quad (3.8)$$

De acordo com a lei de Hooge, o espectro do ruído 1/f comporta-se como se fosse produzido por flutuações de condutância dadas por:

$$M_{1/f}(f) = \frac{Ag^2}{N_T f} \quad (3.9)$$

onde $M_{1/f}(f)$ é a densidade espectral de flutuações de condutância, e g é a condutância média do mecanismo em questão. A condutância está relacionada à mobilidade iônica por

$$g = quN_T \quad (3.10)$$

onde q é a magnitude de uma única carga iônica e u é a mobilidade média por íon para o canal com um comprimento fixo. Substituindo esta relação em (3.9) obtém-se a seguinte expressão:

$$M_{1/f}(f) = \frac{Augq}{f} \quad (3.11)$$

que pode ser solucionada para a mobilidade média de um único íon como:

$$u = \frac{M_{1/f}(f)f}{Agq} \quad (3.12)$$

Assumindo que a lei de Hooge pode ser aplicada para a membrana nervosa, então, (3.12) produz a mobilidade média de um único íon como uma função da condutância proveniente de medições de $M_{1/f}(f)$. Por exemplo, se a condutância da membrana é alterada por algum mecanismo que muda as mobilidades iônicas dentro da membrana, este mecanismo pode ser estudado através de (3.12); alternativamente, se o aumento da condutância ocorre pela abertura de um número maior de canais somente com dois estados, a mobilidade estimada para um único íon por (3.12) deve ser aproximadamente constante.

3.2.4 Flutuações de condutância

Flutuações de condutância em membranas nervosas e musculares surgem quando os mecanismos fundamentais que determinam a condutância da membrana são inerentemente probabilísticos. Por exemplo, (KATZ & MILEDI, 1971, apud STEVENS, 1972) propuseram formalmente que o mecanismo de condutância da placa motora é descrito por um processo aleatório como o ruído balístico descrito anteriormente.

Dependendo dos mecanismos de condutância do modelo microscópico, diferentes tipos de espectro de ruído podem surgir das flutuações de condutância. Na discussão seguinte, dois modelos diferentes, ambos baseados nas equações de Hodgkin-Huxley (HODGKIN & HUXLEY, 1952), foram considerados e estas duas interpretações das equações de Hodgkin-Huxley produzem diferentes espectros de ruído.

a) Primeira interpretação das equações de Hodgkin-Huxley

Cada canal iônico é protegido por quatro macromoléculas que podem mudar suas conformações e bloquear o canal. Se qualquer uma das moléculas bloqueia o canal, então

íons potássio não podem passar através dele, se todas as moléculas estão em seus estados conformacionais abertos, então o canal está aberto e tem uma condutância γ (a condutância quando o canal está fechado é assumido igual a zero). As taxas de mudanças conformacionais são voltagem-dependentes e são dadas pelas taxas constantes α_n e β_n de Hodgkin-Huxley. Assume-se que cada um dos portões moleculares podem ter somente duas conformações (aberto e fechado). (3.13) descreve a probabilidade $p(k|t)$ que, dado um portão molecular no estado k no tempo 0, a molécula está na conformação aberta no tempo t .

$$\tau \frac{dp(k|t)}{dt} + p(k|t) = n_\infty \quad (3.13)$$

$$\tau = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \quad (3.14)$$

Nas equações acima, α_n , β_n e n_∞ têm o mesmo significado como nas equações de Hodgkin-Huxley (veja Seção 2.2.6); k pode denotar a conformação aberta (o) e fechada (c) do portão molecular. $n(t)$ é probabilidade de que uma molécula esteja em sua conformação aberta no tempo t , sem restrição de sua conformação inicial, e é dada por (3.15).

$$n(t) = p(o)p(o|t) + p(c)p(c|t) \quad (3.15)$$

O canal somente é aberto se todas as quatro macromoléculas estão em suas conformações abertas, de modo que a probabilidade de um canal estar aberto é igual a n^4 . Neste caso, supõe que os portões moleculares são independentes, ou seja, eles não se interagem. A condutância média $g_K(V, t)$ no tempo t é o número médio de canais abertos Nn^4 (onde N é o número total de canais) multiplicada pela condutância γ de um canal aberto.

$$g_K(V, t) = N\gamma n^4 \quad (3.16)$$

(3.13) a (3.16) descrevem um modelo probabilístico que é equivalente às equações ordinárias de Hodgkin-Huxley.

A densidade espectral das flutuações de condutância é dada pela Transformada de Fourier da função covariância. (STEVENS, 1972) demonstra como se obtém a função covariância para uma membrana contendo N canais iônicos) e é dada por:

$$M_4(f) = N\gamma^2 n_\infty^4 \sum_{j=1}^4 \binom{4}{j} n_\infty^{4-j} (1 - n_\infty)^j \frac{2 \left(\frac{\tau}{j}\right)}{1 + \left(2\pi f \frac{\tau}{j}\right)^2} \quad (3.17)$$

O espectro das flutuações de condutância é constante em baixas frequências e diminui de acordo com $1/f^2$ no limite das altas frequências, que são para frequências bem acima de $2/\pi\tau$.

b) Segunda interpretação das equações de Hodgkin-Huxley

Uma derivação alternativa do espectro das flutuações de condutância é baseada em uma interpretação literal das equações de Hodgkin-Huxley em que a variável n é tratada com sendo sujeito para flutuações aleatórias de uma fonte não especificada. Este tratamento então faz use de um teorema, teorema de flutuação-dissipação (KUBO, 1957, apud STEVENS, 1972), adaptado da mecânica estatística.

As equações linearizadas de Hodgkin-Huxley (veja (STEVENS, 1972) para maiores detalhes) podem ser usadas para predizer a densidade espectral de flutuações de condutância espontâneas na membrana nervosa; por exemplo, se a diminuição/relaxamento/abrandamento da condutância de potássio para seu valor de estado estacionário é descrito (para respostas na região linear) pela função $R(t)$, então a densidade espectral das flutuações de condutância $M'_4(f)$ é dada por:

$$M'_4(f) = K \operatorname{Re} \mathcal{F}\{R(t)\} \quad (3.18)$$

onde K é uma constante.

Do teorema de flutuação-dissipação, expresso em (3.18), o espectro das flutuações de condutância $M'_4(f)$ (para uma tensão constante) é dado por:

$$M'_4(f) = \frac{2\sigma^2\tau}{1 + (2\pi\tau f)^2} \quad (3.19)$$

onde a constante voltagem dependente σ^2 não é fornecida por esta teoria. (STEVENS, 1972) fornece maiores detalhes para a obtenção de (3.18). O espectro de corrente $W'_4(f)$ sob condições de *voltage clamp* é dado por:

$$W'_4(f) = M'_4(f)\hat{V} \quad (3.20)$$

onde \hat{V} é a diferença entre o potencial de membrana e o potencial de equilíbrio de potássio; $S'_4(f)$ é obtido a partir de:

$$S'_4(f) = W'_4(f)|Z(f)|^2 \quad (3.21)$$

Ambos os modelos probabilísticos das equações de Hodgkin-Huxley fornecem um espectro que é plano nas regiões de baixas frequências e diminui assim como $1/f^2$ no limite de alta frequência. A frequência de corte, que é a frequência em que o declínio $1/f^2$ extrapolado intercepta o limite de baixa frequência, é diferente nos dois modelos. No primeiro modelo (3.17) a frequência de corte é $2/\pi\tau$, ao passo que para o segundo modelo (3.19), ela é quatro vezes mais baixa, ou seja, $1/2\pi\tau$. Além disso, o formato preciso da transição entre os limites de baixa e alta frequência é diferente nos dois casos, mas este efeito seria mais difícil de detectar em experimentos.

Um uso potencial para o espectro de flutuações de condutância, então, é para distinguir entre os dois tipos de modelos descritos aqui. Por um lado são os modelos que basicamente interpretam n como uma probabilidade de que um dos quatro componentes está em um dado estado, e por outro lado, são os modelos que veem n como uma variável de estado – que é, como uma única variável, o valor que especifica o estado de cada canal de potássio (independente) – sujeita a contínuas flutuações aleatórias. Comparando a frequência de corte do espectro do ruído ao valor de τ daquela tensão obtida em experimentos do tipo *voltage clamp*, pode ser possível decidir entre estes dois modelos.

c) Dificuldade de separar o espectro de várias fontes

A principal limitação prática em fazer inferências sobre processos da membrana a partir de medidas de ruído é a dificuldade em separar o espectro de diferentes fontes. Por meio de manobras fisiológicas apropriadas é possível separar as várias fontes de espectro de flutuações de condutância. Por exemplo, estudando a membrana em situações onde canais sódio são em essência totalmente inativados. Contudo, o ponto principal é que a

separação das componentes espectrais é uma tarefa difícil e deve ser aproximado experimentalmente.

3.3 Ruído devido às propriedades elétricas do *set-up* experimental

Agora serão discutidos os ruídos devidos ao *set-up* experimental de laboratórios de eletrofisiologia (SHERMAN-GOLD, 1993). A discussão seguinte é baseada na instrumentação de *patch-clamp*, no entanto, também é válida para a instrumentação MEA.

3.3.1 Ruídos fundamentais

Os principais tipos de ruídos fundamentais são: ruído térmico, ruído balístico; ruído $1/f$ e ruído dielétrico. Os três primeiros ruídos já foram descritos na seção 3.2 no contexto de membranas excitáveis. Para evitar repetições, esses ruídos serão descritos novamente apenas para ressaltar suas principais características em metais e semicondutores. O entendimento dos ruídos fundamentais é de suma importância para compreensão dos demais tipos de ruído presentes em medida eletrofisiológicas.

a) Ruído térmico

É resultado do movimento de cargas excitadas num meio condutor. Para o resistor, o ruído térmico pode ser representado como fonte de tensão ou como fonte de corrente. A densidade espectral de potência (PSD) do ruído térmico é branco, ou seja, não varia com a frequência. Observa-se também que o ruído térmico da fonte de tensão aumenta com o aumento da resistência, enquanto que o ruído térmico da fonte de corrente diminui com o aumento da resistência. A PSD para o ruído térmico é a mesma descrita na seção 3.2.1, no entanto, no contexto de instrumentação eletrônica, a impedância consiste apenas da parte real.

b) Ruído balístico

Surge quando o fluxo de corrente atravessa uma barreira de potencial, por exemplo, em uma junção P-N em um dispositivo semicondutor. Desde que barreiras de potencial não estão presentes em elementos resistivos simples, resistores não exibem ruído balístico. Um exemplo importante de ruído balístico é a entrada equivalente da corrente de ruído em um amplificador operacional que surge da corrente de vazamento I_b (também conhecida como corrente de porta para dispositivos com entrada FET (Transistor de Efeito de Campo)).

c) Ruído dielétrico

Um capacitor sem perdas ideal não produz ruído térmico. No entanto, todos os materiais dielétricos reais exibem alguma perda que resulta na geração de ruído térmico. Para dielétricos com perdas relativamente baixas, a densidade espectral deste ruído $W_D(f)$ pode ser descrita em termos do fator de dissipação D e da capacitância C_D do dielétrico:

$$W_D(f) = 4kTDC_D(2\pi f) \quad (3.22)$$

onde f é a frequência em Hz. A PSD do ruído dielétrico aumenta linearmente com o aumento da frequência. Em eletrofisiologia, a fonte mais importante deste tipo de ruído são os vidros usados na fabricação das pipetas para *patch voltage clamp*.

d) Ruído de excesso ou ruído $1/f$

Ruído de excesso ou “ruído $1/f$ ” pode ser definido como qualquer ruído que está presente em um elemento de circuito em adição aos ruídos fundamentais já descritos. Por exemplo, na presença de corrente direta todos os resistores exibem ruído de baixa frequência cuja densidade espectral de potência varia inversamente com a frequência. Diferentes tipos de resistores exibem quantidades diferentes de ruído $1/f$. A PSD do ruído de excesso aumenta conforme a frequência diminui. A magnitude deste ruído é diretamente proporcional à corrente DC que flui através do resistor. Dispositivos semicondutores também exibem ruído $1/f$.

3.3.2 Ruído de amplificação

O ruído intrínseco de um amplificador operacional (AO) pode ser descrito por uma tensão de ruído de entrada equivalente E_n em série com a entrada negativa (–) do AO e uma corrente de ruído de entrada equivalente I_n entre as entradas positivas (+) e negativas (–) desse mesmo AO (Fig. 3.1).

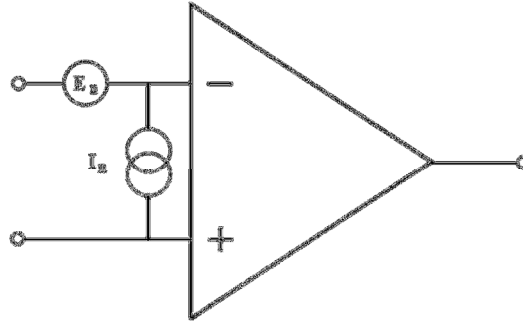


Figura 3.1: Esquema do ruído de um amplificador operacional. Modificado de (SHERMAN-GOLD, 1993).

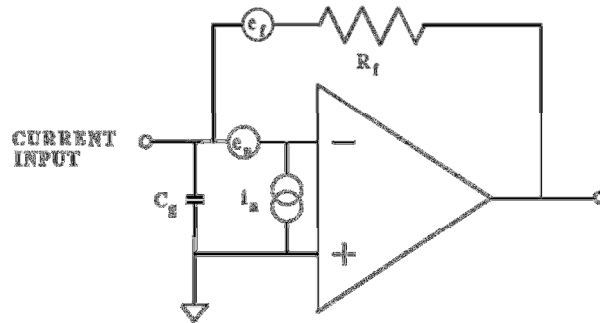


Figura 3.2: Modelo simplificado de um conversor corrente-tensão. Modificado de (SHERMAN-GOLD, 1993).

Considere o esquema simplificado de um conversor corrente-tensão ilustrado na Fig. 3.2 como um exemplo útil para a análise do ruído em um circuito operacional. Neste circuito e_n e i_n são as PSDs das tensões de entrada e das correntes de ruídos respectivamente, e e_f é a PSD do ruído (térmico e excesso) do resistor de resposta R_f . A corrente a ser mensurada é introduzida no terminal denominado “entrada”. Para simplificar, a entrada positiva (+) é aterrada. C_g é uma capacitância qualquer entre a entrada negativa e o terra, que inclui a capacitância de entrada do amplificador mais ruído parasita. A PSD do ruído na saída do conversor IV, $S_{out}(f)$ pode ser mostrado como segue:

$$S_{out}(f) = i_n^2 R_f^2 + e_f^2 + e_n^2 (1 + 4\pi^2 f^2 R_f^2 C_g^2) \quad (3.23)$$

Dividindo a expressão acima por R_f^2 , a PSD de entrada referida, $S_{in}(f)$, é então dada por:

$$S_{in}(f) = i_n^2 + \frac{e_f^2}{R_f^2} + e_n^2 \left(\frac{1}{R_f^2} + 4\pi^2 f^2 C_g^2 \right) \quad (3.24)$$

Em geral, i_n , e_n e e_f são funções da frequência: i_n é o ruído balístico da entrada de corrente do amplificador, mas mostra algum comportamento $1/f$ em baixas frequências; e_f é o ruído térmico e o ruído de excesso de R_f ; e e_n também mostra comportamento $1/f$ em frequências baixas a moderadas.

No caso de um *voltage patch clamp*, o valor de R_f é selecionado de tal modo que seja muito alto, para fornecer um ganho adequado para determinar correntes minúsculas (pA) e para minimizar a contribuição de ruído deste resistor.

É importante observar que para larguras de banda acima de poucos quilohertz, em (3.23) o termo originando de e_n e C_g domina o ruído total. A corrente através de um capacitor é diretamente proporcional à taxa de variação de tensão através deste capacitor ($I = C(\frac{dV}{dt})$). Portanto, a tensão de ruído na entrada negativa (-) do amplificador produz corrente de ruído através do capacitor C_g . Este ruído aumenta com o aumento da frequência simplesmente porque as componentes de frequências mais altas da tensão de ruído envolvem mudanças de tensão mais rápidas. A corrente de ruído através do capacitor é produzida pelo resistor de resposta e, portanto aparece como ruído na saída do amplificador.

3.3.3 Ruído do eletrodo

O ruído associado aos eletrodos de registro é significativo e frequentemente dominante na maior parte das medições eletrofisiológicas.

a) Ruído de eletrodo em single-channel patch voltage clamping

O recipiente mais a pipeta adicionam uma significativa quantidade de capacitância à entrada do *headstage*. Denotando a capacitância do recipiente mais do eletrodo como C_{he} , a PSD da corrente de ruído proveniente de e_n é dado por $4\pi^2 e_n^2 (C_{in} + C_{he}) f^2$. A capacitância do recipiente pode variar de 1 a 5pF; capacitâncias maiores estão associadas com recipientes com blindagem metálica. A capacitância da pipeta depende da profundidade de imersão da pipeta, o tipo de vidro usado, a espessura da parede da pipeta, e o uso de revestimento elastômero de silicone. Obviamente, do ponto de vista de ruído, é importante minimizar a capacitância do recipiente e da pipeta.

- Ruído dielétrico

O ruído dielétrico da pipeta pode ser um dos principais contribuintes para o ruído total em *patch voltage clamping*; em algumas situações ele pode ser a fonte de ruído dominante. O ruído dielétrico que chega da pipeta depende do fator de dissipação D do vidro usado para fabricar a pipeta, da capacitância da pipeta (C_D) e da presença de uma cobertura de elastômero de silicone cobrindo toda a região cônica das pipetas. Para pipetas não revestidas o valor de C_D é determinado pela constante dielétrica ϵ do vidro, a razão entre o diâmetro externo (OD) e o diâmetro interno (ID) da pipeta, a profundidade de imersão da pipeta no banho, e até certo ponto pelas características de puxamento do vidro e da geometria próxima a sua ponta.

O ruído dielétrico é provavelmente a maior fonte de ruído para pipetas fabricadas de vidros, uma exceção são as pipetas fabricadas de quartzo. Pipetas de quartzo deveriam produzir quantidades muito baixas de ruído dielétrico devido a baixa constante dielétrica do quartzo ($\epsilon = 3,8$) e de seu fator de dissipação extremamente baixo ($D \approx 10^{-5} - 10^{-4}$). Contudo, devido ao alto ponto de fusão do quartzo ($\approx 1600^\circ\text{C}$), somente recentemente tornou-se prático puxar pipetas para *patch clamp* de quartzo.

- Ruído proveniente da resistência e capacitância distribuída da pipeta

A maior parte da resistência de uma pipeta de patch clamp reside na sua ponta ou na região muito próximo a ela. Em contrapartida, a capacitância de uma pipeta não revestida com elastômero de silicone pode variar linearmente com a profundidade de imersão dentro do banho. Valores mais significativos de resistência são encontrados em regiões da pipeta mais distantes da ponta. A tensão de ruído térmico desta resistência excederá muito a tensão de ruído de entrada do próprio *headstage*, com quem está em série. A situação real é complicada porque ambos, a resistência e a capacitância da pipeta, são distribuídos.

Sobre o intervalo de frequência de interesse para *patch voltage clamping*, a PSD (Amp^2/Hz) deste ruído deve aumentar com o aumento da frequência assim como f^2 .

- Propriedades de ruído de pipetas patch de quartzo

Para vidros com o produto $D\epsilon$ mais baixo, a PSD estimada do ruído da pipeta aumenta com o aumento da frequência assim como $f^{1,1} - f^{1,3}$ (intervalo de frequências 2 – 20 Hz, profundidade de imersão $\approx 2\text{mm}$). Isto indica que ruído dielétrico domina o ruído

total da pipeta para esses vidros. Contudo, para o quartzo, a PSD estimada do ruído de pipeta aumenta muito mais abruptamente com o aumento da frequência ($f^{1,8} - f^{1,9}$ no intervalo de frequências 2 – 20 Hz). Isto indica que o ruído dielétrico não é mais a fonte dominante de ruído para pipetas patch fabricadas de quartzo. Os dados descritos acima são consistentes com a interpretação que para pipetas de quartzo “ruído R-C distribuído” tem se tornado o mecanismo de ruído dominante devido a contribuição muito reduzida do ruído dielétrico.

- Ruído proveniente da resistência da pipeta e da capacitância patch

A capacitância, C_p , do patch está em série com a resistência da pipeta inteira, R_e . A tensão do ruído térmico de R_e produzirá corrente de ruído em conjunto com a capacitância patch. A PSD deste ruído, $S_p^2(f)$, é dada por

$$S_p^2(f) = 4\pi^2 e_e^2 C_p^2 f^2 \quad (3.25)$$

onde $e_e^2 = 4kTR_e$ é a tensão de ruído térmico da pipeta. Em geral, este ruído deve ser muito pequeno, mas ele pode se tornar significativo quando a área patch é grande; por exemplo, quando uma grande “bolha” da membrana é sugada dentro da ponta da pipeta.

3.3.4 Ruído do selo

A potência espectral, $S_{sh}(f)$, do ruído proveniente do selo formado entre a membrana e o vidro da pipeta quando a tensão aplicada é igual a zero é dada por:

$$S_{sh}(f) = 4kTRe\{Y_{sh}\} \quad (3.26)$$

onde $Re\{Y_{sh}\}$ é a parte real da admitância do selo Y_{sh} . O ruído de selo mínimo estimado resulta do pressuposto de que $Re\{Y_{sh}\} = 1/R_{sh}$, onde R_{sh} é a resistência DC do selo. Contudo, é possível que a PSD do ruído de selo possa aumentar acima do nível mínimo, dado por $4kT/R_{sh}$, conforme a frequência aumenta (isto é, a parte real da admitância do selo pode aumentar com a frequência) devido a capacitância do vidro e a membrana que compõem a parede do selo.

3.3.5 Fontes externas de ruído

Interferências provenientes de fontes externas podem ser eliminadas quase totalmente em um sistema bem projetado, mas podem tornar-se a fonte de ruído dominante

se precauções apropriadas não forem tomadas. A forma mais comum de interferência é a frequência da rede elétrica (50 ou 60 Hz e harmônicos) de fontes de alimentação, luzes fluorescentes, etc. Instrumentos bem-projetados não introduzirão quantidades significativas de interferência de suas fontes de alimentação internas. Todavia, um ambiente de laboratório típico é cheio de fontes de interferência provenientes de fontes externas para a instrumentação eletrônica envolvida em uma medida particular. Estas fontes de interferência incluem motores que estão próximos aos locais de medidas, elevadores, estações de rádio e televisão e vídeos monitores de computadores (que produzem um indesejado tempo de cronometragem de 16 kHz ou frequências superiores).

Na maioria dos casos, tais fontes de ruído podem ser controladas através de aterramento, blindagem e filtragem. Em alguns casos, a blindagem pode aumentar o ruído ao invés de diminuí-lo. Por exemplo, blindagem metálica da pipeta usada em *patch clamp*. Tal blindagem aumenta a capacitância na entrada do amplificador. Neste caso, o aterramento de objetos metálicos próximos, tais como microscópios, fornece blindagem adequada. Outra fonte de ruído externa é a vibração, que pode ser transmitida através do solo ou através do ar, e um isolamento adequado dessa vibração sempre é necessário para medidas eletrofisiológicas muito sensíveis.

3.3.6 Ruído de digitalização

Quantização é a aproximação de cada valor de um sinal por um múltiplo inteiro de uma quantidade elementar δ , que é o passo de quantização. Esta aproximação adiciona um sinal de ruído, chamado ruído de quantização, ao sinal original. Quando o sinal a ser digitalizado é razoavelmente grande em relação ao passo de quantização δ , a potência do ruído de quantização pode ser aproximada por $\delta^2/12$.

No processo de conversão analógico-digital, o sinal é amostrado bem como quantizado. A frequência de amostragem é denotada por f_s . Neste caso, toda a potência do ruído de quantização na saída do ADC aparece na banda de frequência de DC a $f_s/2$. A densidade espectral de potência é, em geral, branca (isto é, constante sobre a banda de frequência) e tem o valor de $\delta^2/6f_s$.

É obvio que o passo de quantização δ deve ser relativamente pequeno em relação ao sinal que está sendo mensurado. No entanto, dificuldades podem surgir quando se deseja medir pequenas variações embutidas em sinais com amplitudes elevadas. Para medidas eletrofisiológicas uma resolução de 12 a 16 bits em conjunto com uma quantidade variável de pré-amplificadores é adequado.

3.3.7 Aliasing

Um sinal pode ser completamente determinado por um conjunto de amostras regularmente espaçadas em intervalos $T = 1/f_s$ desde que esse conjunto não contenha componentes espectrais com uma frequência igual ou maior do que $f_s/2$. Esta é basicamente uma sentença do teorema da amostragem e f_s é a frequência de amostragem. O termo $f_s/2$ será denotado por f_n e é denominada como Frequência de Nyquist. As componentes de frequência do sinal digitalizado que se encontram acima de f_n resultarão em réplicas invertidas destas componentes de frequências mais altas dentro do intervalo de frequência de 0 a f_n , consequentemente produzindo *aliases*.

Se f_x é a frequência de uma componente do sinal (desejado ou ruído) acima f_n , então a frequência de seu *alias*, f_a , é dado por $f_a = |f_x - kf_s|$ onde os colchetes, $| \ |$, indicam o valor absoluto, f_s é a frequência de amostragem e k é um inteiro positivo de tal modo que f_a cai dentro do intervalo $0 \leq f_a \leq f_n$.

Aliasing não aumenta a quantidade total de ruído, mas o desvia de frequências mais altas para frequências mais baixas. Uma vez que *aliasing* ocorre, ele não pode ser desfeito por qualquer operação digital. A solução é amostrar muito mais rápido ($> 2 \cdot f_{max}$) ou, se uma dada frequência f_s é necessária, deve-se usar um filtro analógico *anti-aliasing* para reduzir adequadamente a amplitude de todas as componentes de frequências acima de $f_s/2$.

Se a PSD do ruído não é branca, mas se aumentar segundo f^2 com o aumento da frequência – como é o caso do ruído de alta frequência proveniente de um *patch voltage clamp* – as consequências de *aliasing* podem ser muito severas.

A exigência para evitar significativo *aliasing* é que todas as componentes de frequências acima de f_n devem ser adequadamente evitadas. Usando um filtro de Bessel (tipicamente 4 ou 8 pólos) para *anti-aliasing*, a escolha da frequência de corte relativa a f_n depende das características do ruído e também de quanto *aliasing* pode ser tolerado.

3.3.8 Filtragem

A largura de banda de um filtro é selecionada para reduzir o ruído a níveis aceitáveis de modo que o sinal desejado possa ser adequadamente observado. A filtragem antes do processo de digitalização também é necessária para prevenir *aliasing*. Se o sinal a ser mensurado é grande em comparação com o ruído de fundo, então a largura de faixa do filtro – e a taxa de digitalização apropriada – pode ser escolhida com base na resolução temporal desejada; larguras de banda maiores permitem que eventos mais rápidos sejam

determinados. Contudo, em várias medidas eletrofisiológicas, uma largura de banda muito larga resulta em níveis de ruído de fundo que irão obscurecer os sinais de interesse. Em tais situações é necessário fazer compromissos entre a quantidade de ruído que pode ser tolerado versus a resolução temporal que é obtida depois da filtragem.

Em termos práticos, isto significa que um filtro com uma resposta impulsiva estreita, e, portanto, um tempo de subida rápido, terá uma atenuação bastante gradual no domínio da frequência. Reciprocamente, um filtro com um corte mais nítido no domínio da frequência terá uma resposta impulsiva mais espalhada e um tempo de subida mais lento.

Entre os filtros mais usados, aqueles que fornecem a melhor resolução com pouco ou nenhum *overshoot* e ressonância da resposta ao degrau são os filtros Gaussianos e Bessel (à medida que a ordem do filtro de Bessel aumenta, ele se aproxima de um filtro Gaussiano). Um filtro Gaussiano verdadeiro é fácil de ser implementado digitalmente, mas não é frequentemente produzido como um filtro analógico. Filtros Bessel são geralmente mais usados em aplicações analógicas. Um filtro Gaussiano tem uma resposta impulsiva com o formato da distribuição Gaussiana; sua resposta ao degrau não tem *overshoot*. O tempo de subida da resposta ao degrau de um filtro Gaussiano é aproximadamente $0,34/f_c$, onde f_c é a frequência de -3dB em Hertz. Contudo, no domínio da frequência a atenuação deste filtro é muito gradual. Um filtro de Bessel de 8ª ordem aproxima esta resposta no domínio do tempo e no domínio da frequência. Claramente, em termos de redução do ruído, um filtro cuja função transferência atenua sua resposta mais rapidamente depois que ela atinge f_c parece ser mais desejado. Filtros digitais podem realizar cortes mais nítidos. Infelizmente, contudo, filtros de corte preciso são caracterizados por *overshoot* severos e prolongadas ressonâncias em suas respostas ao degrau. Adicionalmente, para um dado valor de f_c , seus tempos de subida podem ser aproximadamente duas vezes aquele de um filtro Gaussiano ou um filtro de Bessel. Por causa disto, filtros de corte muito nítidos são desejáveis para medidas no domínio da frequência, mas indesejados para medidas no domínio do tempo. De fato, a fim de realizar a mesma resolução temporal com um filtro de corte preciso que é realizado com um filtro Gaussiano ou de Bessel é necessário usar um valor mais alto de f_c . Neste caso, o filtro de corte exato (com sua f_c mais alta) passará tanto ou mesmo mais ruído (dependendo das características espectrais do ruído) quanto a mais gradual atenuação do filtro Gaussiano ou de Bessel quando os dois têm sido estabelecidos para fornecer essencialmente resolução temporal equivalente.

Quando resolução temporal é considerada, filtros de corte preciso não são a melhor solução. Filtros de corte preciso devem somente ser usados quando dados no domínio do tempo são coletados.

Uma alternativa útil para ajustar a largura de faixa do filtro analógico para conseguir uma relação sinal-ruído ótima é digitalizar os dados em uma taxa rápida através de um filtro de Bessel com sua frequência fixa de -3dB para prevenir *aliasing*. Os dados de banda larga digitalizados podem então ser filtrados digitalmente para atingir uma relação sinal-ruído aceitável. Em tais situações mais de um filtro são usados em série. A desvantagem para esta aproximação geral é que o armazenamento inicial de dados será aumentado devido a alta taxa de digitalização.

3.4 Atividade Espontânea e Ruído Biológico

A atividade elétrica espontânea (BLANKENSHIP & FELLER, 2010) ocorre durante os estágios iniciais de desenvolvimento celular, ela precede o acontecimento das sinapses. Geralmente ocorre célula por célula e não através das células (como na sinapse). Tem a função de regular os processos primários do desenvolvimento neuronal e iniciar a formação de conexões, sendo essencial para o desenvolvimento dos sistemas mais complexos (hipocampo, cerebelo, retina, musculares).

Em um estágio mais adiantado de desenvolvimento, as conexões excitatórias em todos esses sistemas amplificam a despolarização nas células espontaneamente ativas, iniciando a atividade de rede que tem mecanismos alternativos que irão suprir, ou melhor, manter de qualquer maneira a atividade espontânea, em uma possível alteração dessa atividade que possa vir a ocorrer devido ao desenvolvimento. A atividade neuronal que emerge da atividade espontânea e é mantida pela própria rede de neurônios é denominada atividade autossustentada (ROXIN et al, 2004).

Um desses mecanismos alternativos acontece devido aos neurônios marca-passos, que na ausência de estímulos externos, conduzem as despolarizações que originam a atividade elétrica espontânea, pois possuem potenciais de membrana instáveis, por isso conseguem se despolarizar ciclicamente (BLANKENSHIP & FELLER, 2010).

Além deste mecanismo alternativo, a atividade elétrica espontânea possui mecanismos que auxiliam na formação da rede neural. São eles: despolarização por GABA; conexões transitórias; transmissão extra sináptica e junções gap.

Durante o desenvolvimento neuronal, GABA e glicina possuem ação excitatória, fundamental para a propagação da atividade espontânea. Na medula espinhal, no hipocampo, no neocórtex e no cerebelo, as células que se tornarão interneurônios inibitórios na idade adulta são a principal fonte de despolarização durante o desenvolvimento.

As conexões transitórias são conexões sinápticas presentes somente durante os estágios de desenvolvimento neuronal, que ajudam na formação de rede, porém na vida adulta elas se tornam insignificantes. A transmissão extra sináptica ocorre via neurotransmissores que irão ativar receptores não só de neurônios pós-sinápticos como também de outras células, tendo assim, forte influência no desenvolvimento das redes neurais. As junções GAP são fundamentais para que ocorra a propagação da atividade neural durante o desenvolvimento de acordo com alguns estudos.

Todos esses mecanismos que geram a atividade elétrica espontânea podem ter relação com o ruído biológico encontrado nos registros MEA de culturas em desenvolvimento. O ruído – perturbações aleatórias de sinais – representa um problema fundamental para o processamento de informações e afeta todos os aspectos do funcionamento do sistema nervoso. No entanto, a natureza, o significado e o impacto do ruído no sistema nervoso só foram tratados de forma quantitativa recentemente (FAISAL et al, 2008).

Quando uma cultura ativa de neurônios é tratada com a droga tetrodotoxina (TTX), o sinal registrado é denominado silêncio elétrico (VOLGUSHEV et al, 2006; MURTHY et al, 2001), uma vez que os potenciais de ação foram inibidos na cultura, e portanto o sinal proveniente de tal cultura de neurônios não apresenta *spikes* nem *bursts*. Assim, o silêncio elétrico constitui em ruído biológico e ruído de instrumentação.

(FAISAL et al, 2008) revisa as fontes de ruído no sistema nervoso, desde o nível molecular até o nível comportamental. Ele destaca como o ruído afeta as redes neuronais e os princípios que o sistema nervoso aplica para combater os efeitos nocivos desse ruído. Além disso, os benefícios potenciais do ruído para o SN são brevemente discutidos. Nesse artigo, o ruído é classificado como sendo de três tipos: ruído sensorial, ruído celular e ruído motor. Fontes de ruído sensorial incluem a transdução de sinais externos em sinais elétricos para o SN; fontes de ruído celular incluem os canais iônicos de membranas excitáveis, a transmissão sináptica e as interações da rede; enquanto que neurônios motores e músculos são fontes de ruído motor.

Uma das maiores fontes de ruído dentro dos neurônios são os canais iônicos voltagem-dependentes que ficam embebidos na membrana neuronal. Estes canais são macromoléculas que estão sujeitos a mudanças aleatórias de seus estados conformacionais devido a agitação térmica, e quando estas mudanças ocorrem entre um estado de condutância e outro de não condutância, o canal age com uma fonte microscópica de corrente de ruído que é injetada dentro da célula (HILLE, 1992; DeFELICE, 1981).

A corrente de ruído pode mudar o comportamento da atividade de *spikes* do neurônio, afetando a distribuição das respostas de latência (LECAR & NOSSAL, 1971a, 1971b; CLAY & DeFELICE, 1983; RUBINSTEIN, 1995), a propagação de *spikes* nas estruturas dendríticas ramificadas (HORIKAWA, 1991, 1993), a geração de potenciais de ação espontâneos (SKAUGEN & WALLOE, 1979; STRASSBERG & DeFELICE, 1993; CHOW & WHITE, 1996), e a confiabilidade e precisão do sincronismo dos *spikes* (SCHNEIDMAN et al, 1998). Além dos efeitos sobre os potenciais de ação, o ruído de canal também causa flutuações sublimiâres no potencial de membrana (STEINMETZ et al, 2000).

3.5 Ruído e MEA

(KIM & KIM, 2000; CHEN et al, 2009, NENADIC & BURDICK, 2005; SHAHID et al, 2010) processaram o sinal bruto MEA para detectar *spikes* e/ou *bursts* em registros de sinais extracelulares. Foram usadas desde abordagem simples baseadas em limiares até detectores mais sofisticados baseados em entropia aproximada, *wavelet* e estatísticas de ordem elevada respectivamente. No entanto, nenhuma ou pouca consideração foi feita sobre o ruído no qual o sinal de interesse está inserido. Os algoritmos para detecção de *spikes* que são calculados da amplitude do sinal geralmente não empregam nenhuma técnica para administrar o ruído e, portanto, não tem um bom desempenho em sinais ruidosos (SHAHID et al, 2010).

(CHEN et al, 2009) usa uma metodologia baseada em entropia aproximada (ApEn) combinada com uma janela deslizante de 20 ms para quantificar a complexidade de quatro padrões de atividade espontânea (*spikes* aleatórios, *spikes* tônicos, *pseudobursts* e *bursts* típicos) de redes neuronais do hipocampo conservadas em cultura. As curvas dinâmicas de ApEn mostram diferenças evidentes entre os quatro padrões bem como nos valores de ApEn que se encontram em diferentes intervalos.

(SHAHID et al, 2010) propõe uma técnica denominada *CoB* (do inglês, *Cepstrum of Bispectrum*) para detecção de *spikes* baseada na teoria de deconvolução cega e estima a ocorrência de *spikes* como uma sequência impulsiva. Desde que *CoB* é baseada em estatísticas de ordem elevada (HOS), ele suprime o efeito de qualquer ruído Gaussiano ou não-Gaussiano, desde que com distribuição simétrica. Esta técnica pressupõe, então, que o ruído da MEA é Gaussiano e a informação de *spikes* e *bursts* é não Gaussiana. No entanto, não apresenta nenhum embasamento teórico ou experimental para confirmar tal afirmativa.

Diante do contexto apresentado acima, há uma carência de trabalhos na literatura que discutem de forma conceitual e experimental o ruído inerente aos registros extracelulares MEA. Além disso, a quantificação, bem como a qualificação, desse ruído é fundamental para que as técnicas de detecção de *spikes* funcionem corretamente.

3.6 Considerações Finais

Este capítulo discutiu o ruído intrínseco dos registros de sinais extracelulares MEA. Essas fontes de ruído podem ser agrupadas em dois grandes conjuntos: ruído devido às propriedades das membranas excitáveis e o ruído devido à instrumentação envolvida no aparato experimental de registro.

Os ruídos fundamentais são o ruído térmico, ruído balístico, ruído $1/f$ e ruído dielétrico. O ruído térmico é resultado do movimento de cargas excitadas num meio condutor; o ruído balístico surge quando um fluxo de corrente atravessa uma barreira de potencial; o ruído $1/f$ surge em adição aos outros ruídos fundamentais e sua PSD é inversamente proporcional à frequência; e o ruído dielétrico surge em materiais dielétricos, como os capacitores.

Os ruídos fundamentais surgem tanto do preparo biológico devido ao movimento dos íons através da membrana neuronal quanto nos circuitos que constituem o *set-up* experimental. A agitação térmica dos íons através da membrana faz surgir o potencial de membrana e flutuações de corrente na membrana. Esses ruídos em conjunto fazem surgir o ruído de canal iônico e/ou ruído celular. Além desses ruídos (FAISAL et al, 2008) discute os ruídos sensoriais e motores que são inerentes do sistema nervoso.

Os ruídos dominantes no *set-up* experimental são: ruído de amplificação, ruído devido ao eletrodo, ruído de selo, fontes externas de ruído, ruído de digitalização, *aliasing* e filtragem. As formas mais comuns de interferência externa em registros extracelulares são a frequência da rede elétrica (50 ou 60 Hz e harmônicos) de fontes de alimentação,

luzes fluorescentes, motores que estão próximos aos locais de medidas, elevadores, estações de rádio e televisão e vídeos monitores de computadores. Na maioria dos casos, tais fontes de ruído podem ser controladas através de aterramento, blindagem e filtragem.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Introdução

Este capítulo descreve a aquisição dos dados analisados nesta dissertação. Além disso, o texto aborda uma breve teoria sobre processos estocásticos e suas propriedades. Em seguida, são descritos os métodos empregados neste trabalho para a análise e processamento de sinais aleatórios. O enfoque principal dessa análise concentra-se em apresentar testes estatísticos para estacionariedade e Gaussianidade dos dados em estudo.

4.2 Aquisição dos dados

4.2.1 Culturas Neuronais

Culturas primárias de neurônios corticais do hipocampo de rato foram realizadas, extraindo-se o tecido de embriões com 18 dias de desenvolvimento, após anestesia e tomados todos os cuidados necessários, estipulados pelo Comitê de Ética da Universidade de Gênova. CHIAPPALONE (2003) fornece maiores detalhes sobre o preparo de culturas neuronais dissociadas. O procedimento geral para cultivar neurônios corticais é dividido em quatro fases (ALBERTS, 1997):

Fase 1: Preparação da pré-cultura.

Fazer uma solução de Poli-D-Lisina (PDL) na concentração de 0,1 mg/ml de água destilada e acrescentar 80-100mL desta solução na arranjo de substratos e deixar descansar por uma noite. No dia seguinte, retirar o PDL e o lavar com água destilada para limpar o excesso, uma vez que ele, em solução, é tóxico para as células. Depois disso, aplicar a solução de Laminina a 0,02mg/ml e deixar descansar durante 2 a 3 horas. Retirar a solução de Laminina, lavando duas vezes com água destilada e, finalmente, secar as lâminas antes de aplicar as células.

Fase 2: Dissecção

Neurônios corticais são obtidos de embriões de ratos com 18 ou 19 dias de desenvolvimento. Os passos principais do procedimento de dissecção são listados abaixo:

- Anestesiá-lo com O₂/CO₂.
- Colocar o animal anestesiado em uma superfície limpa.
- Borrifar com uma solução de etanol 70% a pele do abdome inferior e fazer um corte transversal no músculo abdominal inferior para expor o útero.
- Remover todo o útero com os embriões e o coloque numa placa de Petri com HBSS (Solução Salina Balanceada de Hank). A HBSS é uma mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e outros componentes; age como uma solução nutritiva em cultivo celular.
- Remover cada filhote de seus sacos embrionários, cortar as cabeças e as reunir em outra placa de Petri contendo HBSS.
- Com uma pequena tesoura, cortar a pele e a cartilagem, expondo a superfície do cérebro e, cuidadosamente, extrair o cérebro do crânio.
- Separar e isolar os lobos corticais com a ajuda de um par de fórceps afiados e remover completamente as meninges antes de extrair o hipocampo.
- Depois que as partes do hipocampo são dissecadas, localizar o bulbo olfatório na borda rostral e o cortar ao longo com o fórceps. Finalmente, antes de coletar o hemisfério cortical, cortar o gânglio da base.

Fase 3: Dissociação das células

Depois de toda essa preparação, mover a placa para um fluxo laminar esterilizado. Cortar cada córtex em partes pequenas e as transferir, com uma pipeta de Pasteur sinalizadora, para um tubinho de centrífuga de 15 mL, contendo 2-3 mL de solução de tripsina a 0,125%, para cada córtex. O hipocampo é tratado na mesma solução de tripsina, porém não será picado. Colocar o tubo em banho-maria a 37°C e incubá-lo por 20-25 minutos para o córtex e 15-18 minutos para o hipocampo. Sacudir gentilmente os tubos a cada 5 minutos.

Passado o tempo, remover o tubo do banho-maria e retirar o máximo possível de tripsina com a pipeta. Bloquear a digestão proteolítica adicionando ao tecido cerca de 5-8mL de meio Neurobasal contendo 10% de soro FBS (Soro Fetal Bovino – corresponde ao fator de

crescimento da cultura). Repetir este procedimento duas vezes, gentilmente, retirando o sobrenadante e adicionar o tecido em 1-3 mL do mesmo meio, sem o soro. Para obter uma única suspensão de células, triturar o tecido, com auxílio de uma pipeta, 5 a 10 vezes para as células do hipocampo e de 10 a 20 vezes para as células corticais.

Centrifugar cada suspensão de células por 5 minutos a 900-1000 rpm e reter as células em 10mL de meio Neurobasal suplementado com 2% de B-27 e 1% de Glutamax-1. Contar o número de células com um hemocítômetro e diluir a suspensão das células corticais a uma concentração final de $6 - 8 \times 10^5$ células por mL e 60 – 80 μ L em cada um dos poços de cultura do arranjo microeletrodo.

Fase 4: Manutenção da cultura

Colocar o preparo biológico em uma incubadora umedecida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Cada semana trocar parte do meio antigo por um meio novo. Modificações frequentes do meio podem causar perda da solubilidade de fatores de crescimento da glia. Neurônios e células da glia permanecendo em co-cultura melhoram o desenvolvimento das conexões sinápticas da rede neuronal. Células da glia presentes no dispositivo continuam a se dividir e proliferar. Usar Ara-C (Citosina Arabinosídeo Trifosfato), que atua como um inibidor de replicação e crescimento excessivo de células não neurais. Quatro dias depois de ter plaqueado as células, acrescentar 50 μ L de 200 μ M de solução Ara-C (concentração final de 10 μ M). Incubar por 24-36 horas e, depois deste tempo, modificar o meio.

4.2.2 Medidas

As culturas cresceram sobre MEA's planares contendo 60 microeletrodos de nitreto de titânio (TiN), cujas dimensões principais correspondem a 30 μ m de diâmetro e 200 μ m de espaçamento entre si, distribuídos em um arranjo 8×8 , com os cantos excluídos. O aparato experimental consistiu de uma MEA propriamente dita, um banco de 60 amplificadores integrados (cada qual associado a um microeletrodo), com ganho total absoluto de 1200, um controlador de temperatura, um computador pessoal equipado com uma placa PCI de aquisição de dados para monitoramento em tempo real, um microscópio invertido, uma mesa antivibratória e uma gaiola de Faraday. Os dados foram monitorados e gravados usando o software comercial *MCRack* (*MultichannelSystems, Reutigen, Germany*).

Três culturas de atividade elétrica neuronal espontânea foram monitoradas, sendo estas identificadas por C1, C2 e C3. Cada MEA foi retirada da estufa de CO₂ e colocada sobre o respectivo banco de amplificadores. As medidas foram iniciadas após 20 minutos da deposição da cultura sobre os eletrodos, com o objetivo de permitir às células de se adaptarem ao novo ambiente. Em seguida, para cada cultura, foram coletados quatro registros consecutivos de amostra do sinal de atividade neural espontânea, sendo que cada um desses registros teve duração de 5 minutos. A frequência de amostragem utilizada foi de 10 kHz. Justificativas práticas do ponto de vista de instrumentação e da fisiologia, para tal procedimento, podem ser encontradas em (CHIAPPALONE et al., 2006).

Entre a 3^a e 4^a SIV (semana *in vitro*) a cultura neuronal completa a maturação das conexões excitatórias, observando-se o pico da taxa média de *bursts*, e a partir da 5^a SIV o padrão de conectividade sináptica atinge a maturidade, estabilização, ou seja, a cultura estaria mais propícia a apresentar formas rudimentares de “aprendizado ou de memória”, ou ainda ser influenciada por estímulos “sensoriais” externos (CHIAPPALONE et al., 2006). Por isso, a cultura C1 foi observada no 21^o dia de incubação ou dia *in vitro* (DIV), a cultura C2 foi observada no 39^o DIV e a cultura C3 foi monitorada no 41^o DIV. Assim, as atividades elétricas espontâneas registradas durante 20 minutos das culturas C1, C2 e C3 foram denominadas experimentos “Inativa”, “DIV39” e “DIV41” respectivamente.

O experimento “Inativa” foi analisado usando o *software* detector de *spikes* *Spike Manager* (CHIAPPALONE et al., 2006) e foi constatado ausência de atividade elétrica significativa, além da frequência de disparo inferior a 1 kHz, vide Seção 5.2 para maiores detalhes. Assim, a cultura C1 pode ser considerada inativa. No entanto, a inatividade desta deve estar associada com a dificuldade de conexão do preparo biológico com os microeletrodos da MEA (SCHWARTZ, 2004), uma vez que culturas em DIV21 podem normalmente atingir uma taxa média de disparo de até 2,2 *spike/s* (CHIAPPALONE et al., 2006). Cabe observar que a inatividade dessa cultura foi natural, ou seja, o experimento não foi dimensionado para gerar ou induzir tal fenômeno. Já nos experimentos realizados com C2 e C3 não foi constatada inatividade da cultura. Assim, tais culturas são denominadas ativas.

O experimento denominado “TTX” consistiu em um registro realizado na cultura C3 após ser adicionado 20 µMolar da droga tetrodotoxina (TTX) sobre a cultura. Essa droga bloqueia os canais de sódio dos neurônios, e consequentemente minimiza a atividade

de *spikes* e *bursts* (KANDEL, 2000). Assim, o experimento “TTX” consiste somente em ruído biológico e ruído de instrumentação.

Já no registro do experimento denominado “NoNeurons”, não havia cultura neuronal sobre a MEA, tratando-se apenas de ruído de instrumentação devido aos amplificadores. Este registro deve ser confrontado com o registro da cultura C2.

Em síntese, as seguintes abreviaturas serão adotadas:

- “Inativa”: Registro da atividade elétrica espontânea em uma MEA na presença de cultura neuronal inativa no 21º DIV (fonte: cultura C1).
- “DIV39”: Registro da atividade elétrica espontânea em uma MEA na presença de cultura neuronal ativa no 39º DIV (fonte: cultura C2).
- “DIV41”: Registro da atividade elétrica espontânea de uma MEA na presença de cultura neuronal ativa no 41º DIV (fonte: cultura C3).
- “TTX”: Registro da atividade elétrica espontânea da cultura neuronal C3, à qual foi adicionado 20 μ Molar de TTX para inibir os potenciais de ação no 41º DIV.
- “NoNeurons”: Registro do ruído eletrônico em um dispositivo MEA, antes da medida da atividade elétrica de C2.

4.3 Variáveis Aleatórias

A variável aleatória X é uma função que atribui um número real, $X(\xi)$, para cada resultado ξ no espaço amostral de um experimento aleatório (LEON-GARCIA, 1994).

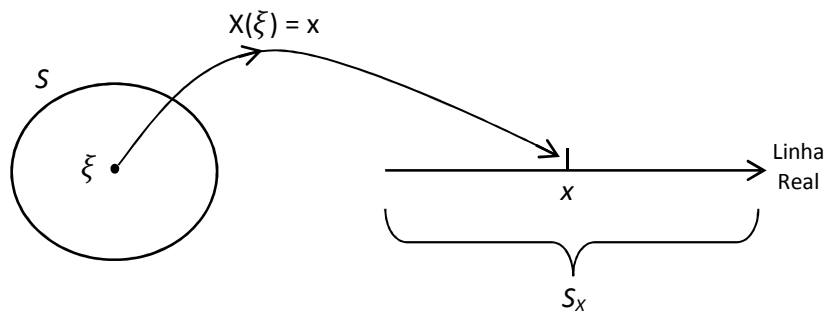


Figura 4.1: Relação entre o espaço amostral S de um evento aleatório e uma variável aleatória $X(\xi)$.

4.3.1 Função Distribuição de Acumulada

A função distribuição acumulada (fdc) de uma variável aleatória X é definida como a probabilidade do evento $\{X \leq x\}$:

$$F_X(x) = P[X \leq x] \quad \text{para } -\infty < x < +\infty \quad (4.1)$$

que é a probabilidade de que a variável aleatória X assumira valores no conjunto $(-\infty, x]$. O evento $\{X \leq x\}$ e sua probabilidade variam conforme x é variado, em outras palavras, $F_X(x)$ é a função da variável x (LEON-GARCIA, 1994).

4.3.2 Função Densidade de Probabilidade

Para uma variável aleatória contínua, a função densidade de probabilidade (fdp) de X é definida como a derivada de $F_X(x)$ se existir (LEON-GARCIA, 1994).

$$f_X(x) = \frac{dF_X(x)}{dx} \quad (4.2)$$

A fdp é uma maneira alternativa de especificar a informação contida na função distribuição acumulada e representa a probabilidade de que X pertença a um pequeno intervalo na vizinhança de x , ou seja, $\{x < X \leq x + dx\}$, se X for uma variável aleatória contínua.

4.3.3 Variável Aleatória Gaussiana

Há muitos fenômenos naturais e artificiais cuja variável aleatória X consiste na soma de uma grande quantidade de variáveis aleatórias. A descrição exata da fdp de X em termos das variáveis aleatórias que o compõe pode se tornar uma tarefa muito complexa e difícil. Contudo, em condições muito gerais, conforme o número de componentes se torna muito grande, a cdf de X se aproxima de uma variável aleatória Gaussiana (veja Teorema Central do Limite na Seção 4.3.6). Esta variável aleatória é tão frequente em problemas de aleatoriedade que é conhecida como variável aleatória normal.

A fdp de uma variável aleatória Gaussiana X , conforme ilustrado na Fig. 4.2, é dada por:

$$f_X(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-(x-\mu)^2/2\sigma^2} \quad -\infty < x < \infty \quad (4.3)$$

onde μ é a média e σ é o desvio padrão.

A cdf da variável aleatória Gaussiana é dada por:

$$P[X \leq x] = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \int_{-\infty}^x e^{-(x-\mu)^2/2\sigma^2} dx \quad (4.4)$$

A mudança de variável $t = (x - \mu)/\sigma$ em (4.4) acima resulta em:

$$F_X(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{(x-\mu)/\sigma} e^{-t^2/2} dt \quad (4.5)$$

$$= \Phi\left(\frac{x - \mu}{\sigma}\right) \quad (4.6)$$

onde $\Phi(x)$ é a fdc de uma variável aleatória Gaussiana com $\mu = 0$ e $\sigma = 1$:

$$\Phi(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-t^2/2} dt \quad (4.7)$$

Portanto, qualquer probabilidade envolvendo uma variável aleatória Gaussiana pode ser expressa em termos de $\Phi(x)$.

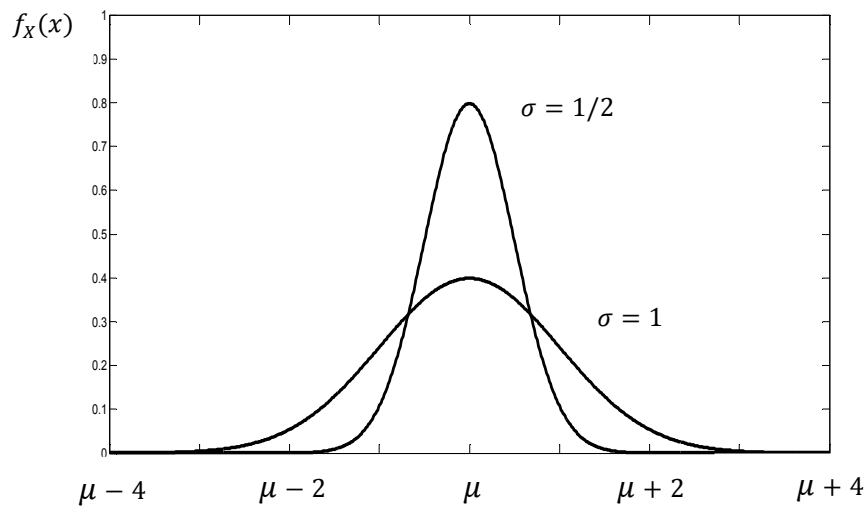


Figura 4.2: Função densidade de probabilidade de uma variável aleatória Gaussiana.

4.3.4 Médias Estatísticas

a) Valor Esperado de uma Variável Aleatória

O valor esperado ou a média de uma variável aleatória X é definido por:

$$E[X] = \int_{-\infty}^{+\infty} x f_X(x) dx \quad (4.8)$$

Se $f_X(x)$ for visto como uma distribuição de massa sobre a linha real, então $E[X]$ representa o centro de massa desta distribuição. Quando um sinal de energia é mensurado, quaisquer desvios nos valores da média são indicativos de mudanças no potencial, que podem ter origem técnica, tais como flutuações nos amplificadores (BRONZINO et al, 1981).

Teorema: Se X é uma variável aleatória cuja fdp é simétrica em torno de μ , então $E[X] = \mu$ (veja Fig. 4.2).

b) Momentos

O k -ésimo momento de uma variável aleatória X é definido por (LEON-GARCIA, 1994):

$$\alpha_k = E[X^k] = \int_{-\infty}^{\infty} x^k f_X(x) dx \quad (4.9)$$

O k -ésimo momento central de uma variável aleatória X é definido como (LATHI, 1998):

$$\mu_k = E[(X - E[X])^k] = \int_{-\infty}^{\infty} (x - E[X])^k f_X(x) dx \quad (4.10)$$

O segundo momento central de uma variável aleatória X é de especial importância. Ele é chamado variância de X e é denotado por σ_X^2 , onde σ_X é conhecido como o desvio padrão da variável aleatória X .

$$\begin{aligned} \sigma_X^2 &= E[(X - E[X])^2] \\ \sigma_X^2 &= E[X^2 - 2E[X]X + E[X]^2] \\ &= E[X^2] - 2E[X]E[X] + E[X]^2 \\ &= E[X^2] - E[X]^2 \end{aligned} \quad (4.11)$$

Então, a variância de X é igual ao valor quadrático médio menos o quadrado da média. Quando a média é zero, a variância é igual ao valor quadrático médio. No contexto de processamento de sinais, a variância da distribuição de amplitude de um sinal está diretamente relacionada com a potência total desse sinal (BRONZINO et al, 1981).

Para um conjunto particular de N observações independentes e identicamente distribuídas (iid) de uma variável aleatória X com média e variância desconhecidas, ou seja, $X = [x_1, \dots, x_N]$, a média amostral \bar{x} e a variância amostral $\hat{\sigma}^2$ são usadas para estimar $E[X]$ e σ_X^2 respectivamente:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (4.12)$$

$$\hat{\mu}_2 = \hat{\sigma}^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (4.13)$$

A média e a variância são os dois parâmetros mais importantes usados para sintetizar a pdf de uma variável aleatória. Outros parâmetros são ocasionalmente usados.

A obliquidade é definida como o terceiro momento central normalizado e é estimada por:

$$\sqrt{b_1} = \frac{\hat{\mu}_3}{\hat{\mu}_2^{3/2}} = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^3}{\left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \right)^{3/2}} \quad (4.14)$$

onde $\hat{\mu}_2$ e $\hat{\mu}_3$ são os momentos centrais estimados de segunda e terceira ordem respectivamente, \bar{x} é a média amostral e N é o número de observações da variável aleatória X . A obliquidade mede o grau de assimetria em torno da média, assim se a fdp é simétrica em torno da média, então sua obliquidade é zero. No contexto de sinais EEG, um valor diferente de zero do índice obliquidade reflete a presença de eventos monofásicos na forma de onda desse sinal (BRONZINO et al, 1981).

A curtose é definida como o quarto momento central normalizado e é estimada por:

$$b_2 = \frac{\hat{\mu}_4}{\hat{\mu}_2^2} = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^4}{\left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \right)^2} \quad (4.15)$$

onde $\hat{\mu}_4$ é o momento central estimado de quarta ordem. A curtose revela o grau de achatamento de uma distribuição. Um valor de curtose maior do que aquele de uma distribuição normal ($b_2 > 3$) significa que a distribuição é leptocúrtica (ou supergaussiana) ou simplesmente mais pontiaguda do que a curva normal. Um valor menor do que aquele de uma distribuição normal ($b_2 < 3$) significa uma distribuição platicúrtica (ou subgaussiana) ou mais achatada (BRONZINO et al, 1981). Uma descrição estatística mais detalhada sobre o significado estatístico da curtose é encontrado em (LIANG et al, 2008).

A curtose é frequentemente usada com uma medida quantitativa de não-Gaussianidade de uma variável aleatória ou sinal, mas alguns cuidados devem ser tomados (OJA, 2001). A curtose de um sinal supergaussiano pode ter valores muito grandes (o máximo é infinito em princípio), mas o valor mínimo da curtose de um sinal subgaussiano é limitado de modo que o valor mínimo possível é zero (quando a variância é normalizada para a unidade). Então comparar a não-Gaussianidade de sinais supergaussianos e subgaussianos usando a curtose não é apropriado. Contudo, a curtose pode ser usada como uma medida simples de não-Gaussianidade se os sinais a serem comparados são do mesmo tipo, ambos subgaussianos ou supergaussianos (OJA, 2001). (BRONZINO et al, 1981) relata em seu trabalho sobre sinais de eletroencefalografia que valores positivos mais elevados de curtose estão presentes quando o EEG contém *spikes* transientes, grupos de ondas de alta voltagem isolados, etc.

4.3.5 Leis dos Grandes Números

A média amostral e os estimadores de frequência relativa são usados para estimar o valor esperado das variáveis aleatórias e as probabilidades dos eventos. As leis dos grandes números relatam condições em que estes estimadores se aproximam dos valores verdadeiros dos parâmetros estimados conforme o número de amostras se torna grande.

4.3.6 Teorema Central do Limite

O teorema central do limite relata que a fdc de uma soma de várias variáveis aleatórias independentes com média e variância finitas se aproxima daquela de uma variável aleatória Gaussiana. Este resultado permite aproximar a fdp da soma de várias variáveis aleatórias por aquela de uma variável aleatória Gaussiana, quando a quantidade destas variáveis tende a infinito.

4.3.7 Distribuição F

A distribuição F é uma distribuição de probabilidade contínua. Uma variável aleatória de uma distribuição F surge como a razão de duas variáveis qui-quadrado:

$$\frac{U_1/d_1}{U_2/d_2} \quad (4.16)$$

onde U_1 e U_2 são distribuições qui-quadrado com d_1 e d_2 graus de liberdade respectivamente, e U_1 e U_2 são independentes.

A função densidade de probabilidade de uma variável aleatória F_{d_1, d_2} é dada por:

$$f(x) = \frac{\sqrt{\frac{(d_1 x)^{d_1} d_2^{d_2}}{(d_1 x + d_2)^{d_1 + d_2}}}}{x \cdot B\left(\frac{d_1}{2}, \frac{d_2}{2}\right)} \quad (4.17)$$

para $x \geq 0$, onde d_1 e d_2 são inteiros positivos e B é a função Beta (KAY, 1993).

Tabela 4.1: Parâmetros estatísticos da distribuição F .

Média	$\frac{d_2}{d_2 + 2}, \quad \text{para } d_2 > 2$
Variância	$\frac{2d_2^2(d_1 + d_2 - 2)}{d_1(d_2 - 2)^2(d_2 - 4)}, \quad \text{para } d_2 > 4$
Obliquidade	$\frac{(2d_1 + d_2 - 2)\sqrt{8(d_2 - 4)}}{(d_2 - 6)\sqrt{d_1(d_1 + d_2 - 2)}}, \quad \text{para } d_2 > 6$
Curtose	$\frac{20d_2 - 8d_2^2 + d_2^3 + 44d_1 - 32d_1d_2 + A}{d_1(d_2 - 6)(d_2 - 8)(d_1 + d_2 - 2)/12}, \quad \text{para } d_2 > 8$ onde $A = 5d_2^2d_1 - 22d_1^2 - 5d_2d_1^2 - 16$

A distribuição F aparece frequentemente como a distribuição sob a hipótese nula de um teste estatístico, especialmente em testes de razão de verossimilhança (KAY, 1993).

4.4 Processos Estocásticos

Processo estocástico pode ser definido como uma família de variáveis aleatórias indexadas, por exemplo, no tempo ou no espaço (LEON-GARCIA, 1994). O gráfico da função $X(t, \xi)$ versus t , para t fixo, é chamado **realização** ou **função amostra** do processo estocástico.

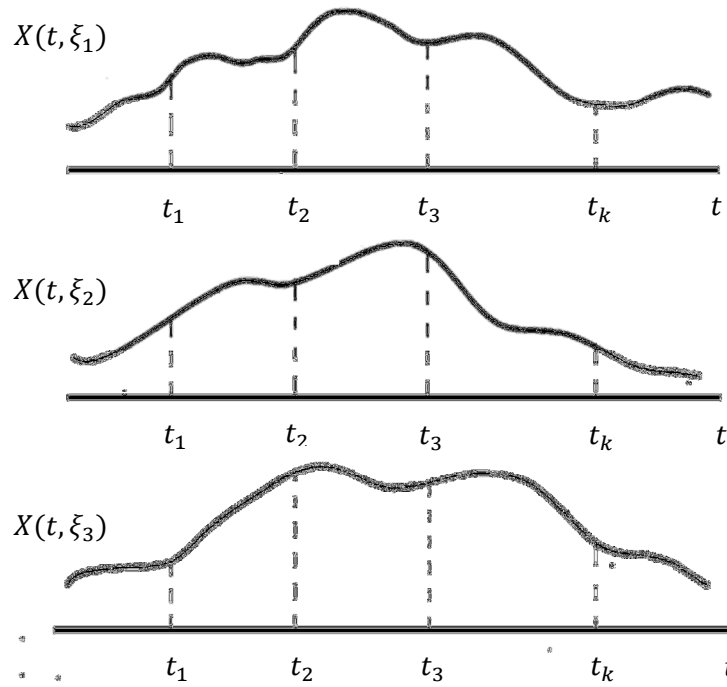


Figura 4.3: Várias realizações de um processo estocástico.

Sejam X_1, X_2, \dots, X_k k variáveis aleatórias obtidas pela amostragem do processo estocástico $X(t, \xi)$ nos tempos t_1, t_2, \dots, t_k :

$$X_1 = X(t_1, \xi), X_2 = X(t_2, \xi), \dots, X_k = X(t_k, \xi), \text{ onde } \xi \in \Omega \quad (4.18)$$

onde Ω é o espaço amostral.

Então, um processo estocástico é especificado pela coleção de funções distribuição acumulada conjuntas de k -ésima ordem:

$$F_{X_1, \dots, X_k}(x_1, x_2, \dots, x_k) = P[X_1 \leq x_1, X_2 \leq x_2, \dots, X_k \leq x_k] \quad (4.19)$$

para qualquer k e qualquer escolha dos instantes de amostragem t_1, t_2, \dots, t_k .

4.4.1 Média e as Funções de Autocorrelação e Autocovariância

Os momentos das amostras temporais de um processo estocástico podem ser usados para especificar parcialmente o processo aleatório porque eles resumem a informação contida nas fdc's conjuntas (LEON-GARCIA, 1994).

A média de um processo aleatório $X(t)$ pode ser definida por

$$m_X(t) = E[X(t)] = \int_{-\infty}^{\infty} x f_{X(t)}(x) dx \quad (4.20)$$

onde $f_{X(t)}(x)$ é a pdf de $X(t)$. Em geral, $m_X(t)$ é uma função do tempo. Tendências no comportamento de $X(t)$ são refletidas nas variações de $m_X(t)$ com o tempo.

A função autocorrelação $R_X(t_1, t_2)$ de um processo aleatório $X(t)$ é definida como o momento conjunto de $X(t_1)$ e $X(t_2)$.

$$R_X(t_1, t_2) = E[X(t_1)X(t_2)] = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} xy f_{X(t_1)X(t_2)}(x, y) dx dy \quad (4.21)$$

onde $f_{X(t_1)X(t_2)}(x, y)$ é a fdp bivariada de $X(t)$. Em geral, a autocorrelação é uma função de t_1 e t_2 .

A função autocovariância $C_X(t_1, t_2)$ de um processo aleatório $X(t)$ é definida como a covariância de $X(t_1)$ e $X(t_2)$.

$$C_X(t_1, t_2) = E[\{X(t_1) - m_X(t_1)\}\{X(t_2) - m_X(t_2)\}] \quad (4.22)$$

A variância de $X(t)$ pode ser obtida de $C_X(t, t)$:

$$\sigma_X^2 = E[\{X(t) - m_X(t)\}^2] = C_X(t, t) \quad (4.23)$$

4.4.2 Processos estocásticos Gaussianos

Um processo aleatório $X(t)$ é um processo estocástico Gaussiano se as variáveis aleatórias $X_1 = X(t_1), X_2 = X(t_2), \dots, X_k = X(t_k)$ são variáveis aleatórias Gaussianas conjuntas para todo k , e todas as escolhas de t_1, t_2, \dots, t_k . (Observe que esta definição se aplica para processos contínuos e discretos no tempo). A fdp conjunta das variáveis

aleatórias Gaussianas conjuntas é determinada pelo vetor de médias \mathbf{m} e pela matriz de covariância K (LEON-GARCIA, 1994):

$$f_{X_1, X_2, \dots, X_k}(x_1, x_2, \dots, x_k) = \frac{e^{-1/2(\mathbf{x}-\mathbf{m})^T K^{-1}(\mathbf{x}-\mathbf{m})}}{(2\pi)^{k/2} |K|^{1/2}} \quad (4.24)$$

onde

$$\mathbf{m} = \begin{bmatrix} m_X(t_1) \\ \vdots \\ m_X(t_k) \end{bmatrix}$$

$$K = \begin{bmatrix} C_X(t_1, t_1) & C_X(t_1, t_2) & \dots & C_X(t_1, t_k) \\ C_X(t_2, t_1) & C_X(t_2, t_2) & \dots & C_X(t_2, t_k) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ C_X(t_k, t_1) & C_X(t_k, t_2) & \dots & C_X(t_k, t_k) \end{bmatrix}$$

e o operador $|K|$ representa o determinante de K .

Portanto, processos aleatórios Gaussianos tem a propriedade especial de que suas pdf's conjuntas são completamente especificadas pela média do processo $m_X(t)$ e pela função covariância $C_X(t_1, t_2)$. Um processo estocástico Gaussiano também apresenta a propriedade de que a operação linear sobre um processo Gaussiano (por exemplo, soma, derivada ou integral) resulta em outro processo Gaussiano. Estas duas propriedades, combinado com o fato que muitos sinais e ruídos são precisamente modelados como Gaussianos, faz com que processos estocásticos Gaussianos representem um modelo muito útil em processamento de sinais.

4.4.3 Processos aleatórios iid

Seja X_n um processo aleatório discreto no tempo consistindo de uma sequência de variáveis aleatórias independentes, identicamente distribuídas (iid) com cdf comum $F_X(x)$, média m , e variância σ^2 . A sequência X_n é chamada de processo aleatório iid (LEON-GARCIA, 1994). A fdc conjunta para qualquer instante de tempo n_1, \dots, n_k é dada por:

$$\begin{aligned} F_{X_1, \dots, X_k}(x_1, x_2, \dots, x_k) &= P[X_1 \leq x_1, X_2 \leq x_2, \dots, X_k \leq x_k] \\ &= F_X(x_1) F_X(x_2) \dots F_X(x_k) \end{aligned} \quad (4.25)$$

onde por simplicidade X_k denota X_{n_k} . A média de um processo iid é obtido em (4.26):

$$m_X(n) = E[X_n] = m \quad \text{para todo } n \quad (4.26)$$

Então, a média é constante.

A função autocovariância é obtida em (4.27) como segue. Se $n_1 \neq n_2$, então

$$C_X(n_1, n_2) = E[(X_{n_1} - m)(X_{n_2} - m)] \quad (4.27)$$

$$E[(X_{n_1} - m)]E[(X_{n_2} - m)] = 0 \quad (4.28)$$

desde que X_{n_1} e X_{n_2} são variáveis aleatórias independentes. Se $n_1 = n_2 = n$, então:

$$C_X(n_1, n_2) = E[(X_n - m)^2] = \sigma^2 \quad (4.29)$$

A autocovariância de um processo iid pode ser expressa na forma compacta como:

$$C_X(n_1, n_2) = \sigma^2 \delta_{n_1, n_2} \quad (4.30)$$

onde $\delta_{n_1, n_2} = 1$ se $n_1 = n_2$ e 0 caso contrário.

A função de autocorrelação do processo iid é encontrado a partir de (4.31):

$$R_X(n_1, n_2) = C_X(n_1, n_2) + m^2 \quad (4.31)$$

4.4.4 Processos estocásticos estacionários

a) Processo estocástico estacionário no sentido estrito

Um processo estocástico $X(t)$ é dito ser estritamente estacionário se nenhuma de suas características são afetadas por um desvio na origem do tempo, isto é, se os dois processos $X(t)$ e $X(t + \Delta t)$ têm as mesmas características estatísticas para qualquer Δt .

b) Processo estocástico estacionário no sentido amplo

Uma condição muito mais fraca é aquela de estacionariedade no sentido amplo em um intervalo finito no tempo. Se

$$E[X(t)] = \mu = \text{constante} \quad (4.32)$$

E se a função de autocorrelação é dada por:

$$R(t_i, t_j) = R(\tau), \quad \tau = |t_j - t_i| \quad (4.33)$$

para todo t , t_i e t_j , então $X(t)$ é dito ser estacionário no sentido amplo no intervalo.

Sob condições de estacionariedade no sentido amplo, um processo estocástico Gaussiano $X(t)$ é completamente especificado pela sua média e função autocorrelação no intervalo (McEWEN, 1975).

c) Processos Ergódicos

Um processo ergódico é aquele cujas características estatísticas como a média e a função autocorrelação podem ser calculadas de uma única função amostra. Em outras palavras, para um processo ergódico, todas as médias possíveis do conjunto são iguais às correspondentes médias no tempo de uma de suas funções amostra. Como uma média no tempo não pode ser uma função do tempo, é evidente que um processo ergódico é necessariamente um processo estacionário, mas o contrário não é verdade (LATHI, 1998).

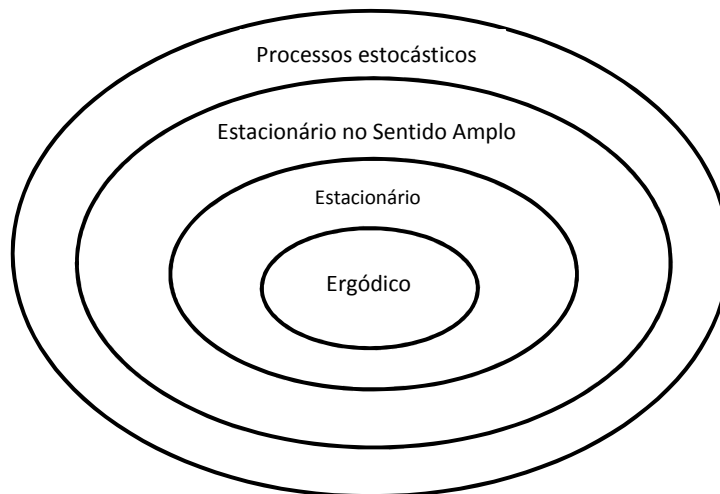


Figura 4.4: Classificação dos processos estocásticos.

4.5 Análise de Sinais Estocásticos

4.5.1 Densidade Espectral de Potência

A densidade espectral de potência (PSD) é um método que permite analisar processos estocásticos. A PSD permite ter uma visão do processo aleatório no domínio da frequência.

Seja $X(t)$ um processo estocástico estacionário no sentido amplo contínuo no tempo com média m_X e função autocorrelação $R_X(\tau)$. A densidade espectral de potência de $X(t)$ é dada pela transformada de Fourier da função autocorrelação:

$$\begin{aligned} S_X(f) &= \mathcal{F}\{R_X(\tau)\} \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} R_X(\tau) \cdot e^{-j2\pi f\tau} d\tau \end{aligned} \quad (4.34)$$

Para um processo com valores reais, a função de autocorrelação é uma função par de τ .

$$R_X(\tau) = R_X(-\tau) \quad (4.35)$$

Substituindo em (4.34) implica que

$$\begin{aligned} S_X(f) &= \int_{-\infty}^{\infty} R_X(\tau) \cdot \{\cos 2\pi f\tau - j\sin 2\pi f\tau\} d\tau \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} R_X(\tau) \cdot \cos 2\pi f\tau d\tau \end{aligned} \quad (4.36)$$

Desde que a integral do produto de uma função par ($R_X(\tau)$) por uma função ímpar ($\sin 2\pi f\tau$) é zero. (4.36) implica que $S_X(f)$ é uma função par com valores reais em f . $S_X(f)$ é não negativa:

$$S_X(f) \geq 0 \text{ para todo } f \quad (4.37)$$

A função de autocorrelação pode ser recuperada da densidade espectral de potência aplicando a inversa da transformada de Fourier de (4.34):

$$\begin{aligned}
R_X(\tau) &= \mathcal{F}^{-1}\{S_X(f)\} \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} S_X(f) \cdot e^{j2\pi f\tau} df
\end{aligned} \tag{4.38}$$

Em engenharia elétrica é muito comum chamar o segundo momento de $X(t)$ como potência média.

$$E[X^2(t)] = R_X(0) = \int_{-\infty}^{\infty} S_X(f) df \tag{4.39}$$

A Eq. (4.37) estabelece que a potência média de $X(t)$ é obtida integrando, $S_X(f)$ na frequência. Isto é consistente com o fato de que $S_X(f)$ é a “densidade de potência” de $X(t)$ em função da frequência f .

Desde que as funções autocorrelação e autocovariância são relacionadas por $R_X(\tau) = C_X(\tau) + m_X^2$, a densidade espectral de potência é dada por:

$$\begin{aligned}
S_X(f) &= \mathcal{F}\{C_X(\tau) + m_X^2\} \\
&= \mathcal{F}\{C_X(\tau)\} + m_X^2 \delta(f)
\end{aligned} \tag{4.40}$$

onde usamos o fato que a Transformada de Fourier de uma constante é a função delta de Dirac. Dizemos que $m_X(t)$ é a média (em engenharia, diz-se componente DC) de $X(t)$.

4.5.2 Processos aleatórios discretos no tempo

Seja X_n um processo aleatório estacionário no sentido amplo discreto no tempo com média m_X e autocorrelação $R_X(k)$. A densidade espectral de potência é definida pela transformada de Fourier da sequência autocorrelação.

$$\begin{aligned}
S_X(f) &= \mathcal{F}\{R_X(k)\} \\
&= \sum_{k=-\infty}^{\infty} R_X(k) e^{-j2\pi f k}
\end{aligned} \tag{4.41}$$

A transformada inversa aplicada em (4.41) pode ser dada por:

$$R_X(k) = \int_{-1/2}^{1/2} S_X(f) e^{j2\pi f k} df \quad (4.42)$$

4.5.3 Periodograma de Welch

Um método clássico bastante utilizado para estimar a densidade espectral é o periodograma. Seja $X = [x_1, x_2, \dots, x_N]$ uma amostra de um processo estacionário no sentido amplo. Assuma por simplicidade que $E[X] = 0$. Seja $S_X(f)$, $|f| \leq 1/2$, a densidade espectral de potência de X . A amostra X será dividida Q segmentos, que provavelmente se sobrepõem, de comprimento P cada. Se $X_1 = [x_1, x_2, \dots, x_P]$ for o primeiro segmento, $X_2 = [x_{1+D}, x_{2+D}, \dots, x_{P+D}]$ for o segundo segmento, então, o q -ésimo segmento será dado por $X_q = [x_{1+(q-1)D}, x_{2+(q-1)D}, \dots, x_{P+(q-1)D}]$.

Esquemáticamente tem-se que:

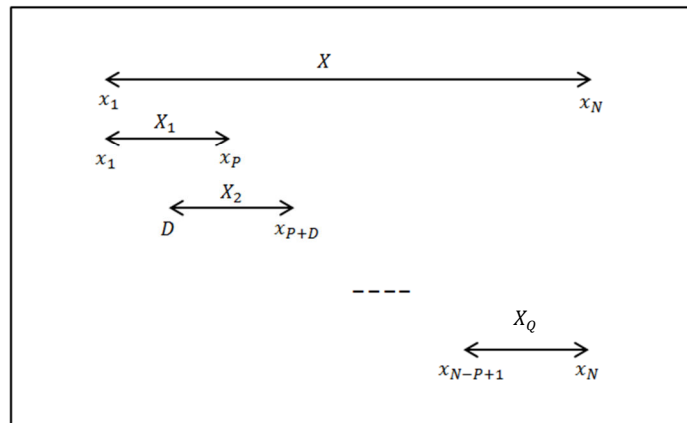


Figura 4.5: Figura esquemática da divisão da amostra X em Q segmentos de comprimento P cada um, com sobreposição.

Para cada segmento de comprimento P foi calculado um periodograma modificado. Uma janela $W = [w_1, w_2, \dots, w_P]$ é escolhida e a seguinte sequência é formada: X_1W, X_2W, \dots, X_QW . A transformada de Fourier foi calculada para cada membro dessa sequência obtendo $A_1(n), A_2(n), \dots, A_Q(n)$:

$$A_q(n) = \frac{1}{P} \sum_{i=1}^P X_q(x_i) \cdot W(w_i) \cdot e^{-\frac{2qjin}{P}}, \quad q = 1, 2, \dots, Q \quad (4.43)$$

Onde $j = \sqrt{-1}$. Finalmente, obtém-se Q periodogramas modificados:

$$\hat{p}_q(f_n) = \frac{P}{U} |A_q(n)|^2 \quad q = 1, 2, \dots, Q \quad (4.44)$$

onde

$$f_n = \frac{n}{P} \quad n = 0, 1, \dots, P/2$$

$$U = \frac{1}{P} \sum_{i=0}^P [W(w_i)]^2$$

O espectro estimado é a média destes periodogramas

$$\hat{P}_x(f_n) = \frac{1}{Q} \sum_{q=1}^Q \hat{p}_q(f_n) \quad (4.45)$$

4.5 Testes de Estacionariedade no Sentido Amplo e Gaussianidade

Assuma que $[x_1, \dots, x_{2N}]$ foi obtido pela amostragem de um sinal MEA $x(t)$ limitado em banda acima da taxa de Nyquist durante o intervalo de tempo $[0, 2NT]$, onde T é o período de amostragem e $2N$ é o número de amostras, conforme a Fig. 4.6.

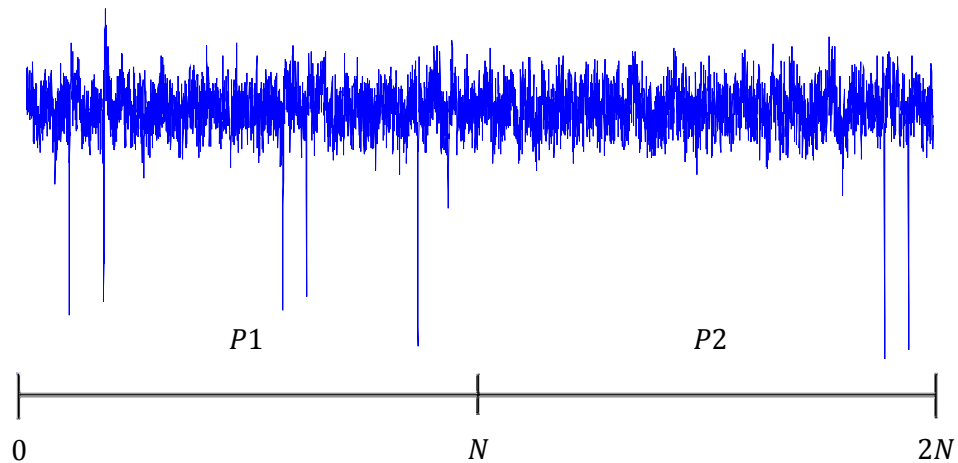


Figura 4.6: Ilustração de uma janela de sinal MEA de duração $2NT$ ms, dividido em dois subconjuntos $P1$ e $P2$ com N amostras cada.

Embora uma determinação exata do grau de estacionariedade no sentido amplo e Gaussianidade de $x(t)$ neste intervalo não sejam possíveis, estimativas úteis dessas propriedades estatísticas podem ser obtidas pela aplicação de certos procedimentos de testes de hipóteses (McEWEN, 1975).

4.5.1 *Mean Ratio Test (MRT)* para estacionariedade

Um procedimento para determinar se $[x_1, \dots, x_{2N}]$ pode ser considerado um conjunto de amostras provenientes de uma função estacionária no sentido amplo deve ser baseado na condição de que as distribuições de amplitude e o espectro de potência calculado para os subconjuntos de amostras $[x_1, \dots, x_N]$ e $[x_{N+1}, \dots, x_{2N}]$ não devam ser significativamente diferentes. Especificamente, um teste para a estacionariedade de um conjunto de amostras pode ser construído dividindo-se, primeiramente, o conjunto em dois subconjuntos iguais e calculando-se um histograma de amplitude e o espectro de potência para cada subconjunto (McEWEN, 1975). Então, o teste razão média (do inglês *Mean Ratio Test* – MRT) pode ser empregado para comparar as funções de distribuição espectral dos subconjuntos de amostras.

a) *Estimação da Densidade Espectral de Potência* (OLSEN et al., 2008)

O espectro de um vetor de observações, $[x_1, x_2, \dots, x_N]$, pode ser estimado pelo periodograma de Welch definido em (4.45). Versões janeladas do periodograma fornecem uma estimativa melhor do espectro e reduzem os efeitos de dispersão. O periodograma de Welch foi escolhido para ser empregado nesta metodologia, pois seus valores são essencialmente independentes para frequências diferentes.

Lema 1 (OLSEN et al, 2008): O periodograma estimado é assintoticamente distribuído como uma distribuição qui-quadrado com dois graus de liberdade, isto é,

$$\frac{2 \cdot \hat{P}(f_n)}{S(f_n)} \sim \chi^2_2 \quad (4.46)$$

onde $S(f_n)$ denota a densidade espectral avaliada na frequência f_n . Quando dois segmentos a serem comparados são partes de um processo estacionário (Fig. 4.6), as componentes $\hat{P}_2(f_n)/\hat{P}_1(f_n)$, $n = 0, 1, \dots, N/2$, são aproximadamente independentes e identicamente distribuídas como uma distribuição $F_{2,2}$ para N grande. A soma dos valores dos

periodogramas sobre L frequências serão aproximadamente distribuídas como a distribuição F com $2L$ e $2L$ graus de liberdade ($F_{2L,2L}$).

Para procurar e localizar mudanças no espectro de um sinal MEA, foram calculados os periodogramas (4.45) para subconjuntos de amostras desses sinais e tentou-se determinar se há uma mudança no periodograma de um subconjunto de amostras para o outro. O número de observações em um segmento de sinal $[x_1, \dots, x_{2N}]$ é $2N$. Uma diferença estatisticamente significativa entre os espectros dos subconjuntos amostrais $[x_1, \dots, x_N]$ e $[x_{N+1}, \dots, x_{2N}]$ indica que há uma mudança no espectro do segmento $[x_1, \dots, x_{2N}]$ e portanto, o processo é não estacionário.

Um segmento de sinal MEA de duração $2NT$ ms ilustrado na Fig. 4.6 foi dividido em dois segmentos ($P1$ e $P2$) de comprimentos iguais. Os espectros de potência foram estimados para cada um dos segmentos ($P1$ e $P2$) e foram comparados, verificando a razão dos dois periodogramas. Mais precisamente, tem-se as razões:

$$R(f_1, \dots, f_{N/2}) = \left[\frac{\hat{P}_2(f_1)}{\hat{P}_1(f_1)}, \dots, \frac{\hat{P}_2(f_{N/2})}{\hat{P}_1(f_{N/2})} \right] \quad (4.47)$$

onde N é igual ao número de observações de cada subconjunto de um segmento de sinal MEA. Desde que o periodograma é simétrico em torno da Frequência de Nyquist ($f_{N/2}$), somente a primeira metade do periodograma é usada. A componente DC produz um pico espectral na frequência zero (f_0), obscurecendo outras características importantes do periodograma, então esta frequência é removida da análise. A componente DC representa a média da série temporal e, portanto este método não é muito bom para detectar mudanças na média.

b) Teste estatístico para comparar segmentos de séries temporais.

Para cada uma das janelas de tempo a serem testadas (Fig. 4.6), foram calculados os periodogramas da primeira metade e da segunda metade desta janela e em seguida a razão destes dois periodogramas foi obtida seguindo (4.47). O método padrão para testar não-estacionariedades é baseado na média das razões dos periodogramas (*Mean Ratio Test - MRT*). Outros testes estatísticos também poderiam ser escolhidos, mas para os propósitos deste trabalho, este teste funciona bem.

Os espectros da primeira metade da janela de tempo (subconjunto 1) e da segunda metade da mesma janela (subconjunto 2) são dados por $\{S_1(f_1), \dots, S_1(f_{N/2})\}$ e $\{S_2(f_1), \dots, S_2(f_{N/2})\}$, respectivamente. O objetivo é testar $H_0: S_1(f_j) = S_2(f_j)$ ou equivalentemente $H_0: S_2(f_j)/S_1(f_j) = 1, j = 1, 2, \dots, N/2$.

Uma aproximação natural é usar os valores do periodograma para estimar estas razões e então testar H_0 . O periodograma não é um estimador consistente da densidade espectral (LEON-GARCIA, 1994); por isso será considerado um nível mais grosseiro do problema e então, será testado se os espectros são iguais sobre uma banda de frequência, $B_k = \{f: f_k \pm (L-1)/(2N)\}$, onde L representa a quantidade de valores de frequências nessa banda, e os centros dessas bandas de frequências são dadas por $f_k = ((2k-1)L+1)/(2N)$. Isto significa que o teste é dado por: $H_0: S_2(f_k)/S_1(f_k) = 1, k = 1, 2, \dots, K$, onde $K = [N/(2L)]$. Quando H_0 é verdadeiro, a razão média (MR) é igual a 1:

$$MR = (1/K) \sum_{k=1}^K S_2(f_k)/S_1(f_k) = 1 \quad (4.48)$$

Para testar se há uma mudança nas propriedades estatísticas do segmento MEA ilustrado na Fig. 4.6, o teste é o seguinte: $H_0: MR = 1$ contra $H_1: MR \neq 1$. Uma escolha natural do teste estatístico é então:

$$\widehat{MR} = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \frac{\hat{P}_{2L}(f_k)}{\hat{P}_{1L}(f_k)} \quad (4.49)$$

onde $\hat{P}_{iL} = \left(\frac{1}{L}\right) \sum_{j=(k-1)L+1}^{kL} P_i(f_j)$, $i = 1, 2$. Isto significa que \hat{P}_{1L} e \hat{P}_{2L} são os periodogramas, média de L frequências, das observações de cada um dos dois segmentos de amostras que compõem uma janela de dados.

Observe que $Cov(\hat{P}_1(f_k), \hat{P}_2(f_l)) \rightarrow 0$ para todas as frequências de Fourier, mesmo quando $k = l$ (OLSEN et al, 2008), e como o periodograma estimado é assintoticamente distribuído como uma distribuição qui-quadrado com dois graus de liberdade conforme o Lema 1 e (4.46), as condições da distribuição F são assintoticamente satisfeitas para a relação entre \hat{P}_{2L} e \hat{P}_{1L} . Assim, pode-se escrever que as variáveis $F_k = \hat{P}_{2L}(f_k)/\hat{P}_{1L}(f_k)$, $k = 1, 2, \dots, K$, são assintoticamente (conforme $N \rightarrow \infty$) independentes e identicamente distribuídas como uma distribuição $F_{2L, 2L}$. Isto significa que $E[F_k] = 2L/(2L-2)$ (veja

Tab. 4.1 na Seção 4.3.7) e por isso $E[\widehat{MR}] = 2L/(2L - 2)$. O teste rejeita H_0 quando \widehat{MR} é significativamente diferente de $2L/(2L - 2)$. No teste da Razão Média, avalia-se se a esperança da razão de \hat{P}_{2L} e \hat{P}_{1L} é igual a esperança de uma distribuição $F_{2L,2L}$.

A quantidade de momentos definidos para a distribuição F depende do segundo grau de liberdade da distribuição F . Por exemplo, a variância de uma distribuição F é definida quando o segundo grau de liberdade é maior ou igual a 5. No *Mean Ratio Test*, $L = 3$ é escolhido para obter momentos de segunda ordem finitos e também se trata de um compromisso entre obter uma distribuição F “contínua” e minimizar as perdas de características do periodograma. Para obter um teste de duas amostras, as razões inversas foram incluídas no teste que significa que ambos $\widehat{MR} = (1/K) \sum_{k=1}^K \hat{P}_{2L}(f_k)/\hat{P}_{1L}(f_k)$ e $\widehat{MR}^I = (1/K) \sum_{k=1}^K \hat{P}_{1L}(f_k)/\hat{P}_{2L}(f_k)$ estão sendo testados.

Uma mudança na série temporal é aceita como significante se o teste da razão for significante. Portanto, o teste estatístico é comparado com um valor crítico apropriado. Com o objetivo de estabelecer este valor, calculou-se a Tab. 4.2 de acordo com a metodologia discutida a seguir.

Tabela 4.2: Valores críticos para o teste MRT.

$2N$	$\alpha = 0,05$	$2N$	$\alpha = 0,05$
100	2,2185	1.000	1,2774
200	1,7415	1.500	1,2210
400	1,4761	2.000	1,1675
600	1,3736	2.500	1,1681
800	1,3146	10.000	1,0803

Para um conjunto de $2N$ amostras, o valor crítico para o teste da Razão Média pode ser encontrado simulando séries temporais, por exemplo, de uma distribuição IID $N(0,1)$ ou simulando razões provenientes de uma distribuição F . Para este trabalho, 500.000 realizações de comprimento $2N$ de uma distribuição $N(0,1)$ foram simuladas. O teste estatístico MR foi calculado para cada uma dessas realizações. Finalmente, para um teste com nível de significância α , o valor crítico (MR_{crit}) para amostras de tamanho ($2N$) é escolhido como o valor onde α por cento dos 500.000 valores dos testes estatísticos

simulados são maiores que MR_{crit} . Os resultados das simulações indicam que esta abordagem é plausível mesmo que as amostras da série temporal original não sejam do tipo iid (OLSEN et al, 2008).

Teste MR : rejeite H_0 se $\max(\widehat{MR}, \widehat{MR}^I) > MR_{crit}$.

Quando $[x_1, \dots, x_N]$ e $[x_{n+1}, \dots, x_{2N}]$ são testadas desta maneira, a rejeição da hipótese de distribuições espectrais idênticas, indica que o segmento de sinal MEA $[x_1, \dots, x_{2N}]$ não pode ser modelado com confiança como uma função amostral de um processo estocástico estacionário no sentido-amplo dentro do intervalo $[0, 2NT]$. Então, rejeição desta hipótese, para um dado conjunto de amostras, constitui um limite inferior empírico sobre o intervalo de estacionariedade no sentido-amplo, isto é, neste caso o intervalo de estacionariedade no sentido amplo para o processo aleatório de modo que $x(t)$ seja uma função amostra é assumido ser menor do que $2NT$ (McEWEN, 1975).

Algoritmo 4.1: Algoritmo para a realização do teste MR para uma janela de sinal ilustrado na Fig. 4.6.

- 1º) Determine um vetor de amostras independentes e identicamente distribuídas de tamanho $2N$;
- 2º) Formule as hipóteses nula e alternativa:
 - $H_0: MR = 1$;
 - $H_1: MR \neq 1$.
- 3º) Determine o nível de significância α ;
- 4º) Determine o valor crítico (MR_{crit}) para o teste estatístico (Tab. 4.2)
- 5º) Calcule \widehat{MR} de acordo com (4.49);
- 6º) Teste MR : rejeite H_0 se $\max(\widehat{MR}, \widehat{MR}^I) > MR_{crit}$.

4.5.2 Teste Jarque-Bera para normalidade

O teste das distribuições de amplitudes de um conjunto de amostras de MEA $[x_1, \dots, x_{2N}]$ para Gaussianidade ou normalidade é realizado por meio de um teste não-paramétrico denominado teste Jarque-Bera (*JB*). O teste *JB* tem ótimas propriedades assintóticas de poder e bom desempenho para amostras finitas. Devido à sua simplicidade, este teste é uma ferramenta útil em análises estatísticas (JARQUE & BERA, 1987).

a) O teste de escore

Nesta seção será apresentado um procedimento geral para a construção de testes estatísticos eficientes e computacionalmente simples baseados no teste de escore em uma “família geral de distribuições”. Detalhes matemáticos sobre o teste de escore, também conhecido com teste multiplicador de Lagrange, podem ser encontrados em (COX & HINKLEY, 1974). Aqui será introduzida apenas a notação e resultados necessários à sua compreensão.

Considere uma variável aleatória u com função densidade de probabilidade $f(u)$. Para um dado conjunto de $2N$ observações independentes de u , seja u_1, \dots, u_{2N} , denote por $l(\theta) = l_1(\theta) + \dots + l_{2N}(\theta)$ o logaritmo da função de verossimilhança, onde $l_i(\theta) = \log f(u_i)$, $\theta = (\theta_1', \theta_2')'$ é o vetor dos argumentos de $l(\cdot)$, e θ_2 possui dimensão r por 1. Assuma que o interesse aqui é testar a hipótese $H_0: \theta_2 = 0$.

Defina $d_j = \sum_{i=1}^{2N} \partial l_i(\theta) / \partial \theta_j$ e $J_{jk} = E \left[\sum_{i=1}^{2N} \left(\frac{\partial l_i(\theta)}{\partial \theta_j} \right) \left(\frac{\partial l_i(\theta)}{\partial \theta_k} \right)' \right]$, para $j = 1, 2$ e $k = 1, 2$. Fixe \hat{d}_j e \hat{J}_{jk} para denotar d_j e J_{jk} avaliados no restrito estimador da máxima verossimilhança (obtido pela imposição da restrição $\theta_2 = 0$) de θ , denominado $\hat{\theta}$.

Sob condições gerais, pode ser mostrado (COX & HINKLEY, 1974) que a estatística definida por:

$$LM = \hat{d}_2' (\hat{J}_{22} - \hat{J}_{21} \hat{J}_{11}^{-1} \hat{J}_{12})^{-1} \hat{d}_2 \quad (4.50)$$

é, sob $H_0: \theta_2 = 0$, assintoticamente distribuída como uma distribuição χ^2 com r graus de liberdade, abreviado por χ_r^2 . Um teste para $H_0: \theta_2 = 0$, baseado em (4.50), será classificado como um teste de escore ou teste *LM*.

Dois aspectos deste teste devem ser considerados. Primeiro, o teste *LM* é assintoticamente equivalente ao teste da razão de verossimilhanças, implicando que ele tem as mesmas características de poder assintótico inclusive poder assintótico local máximo

(COX & HINKLEY, 1974). Segundo, para calculá-lo somente é exigido estimação sob a hipótese nula. Em problemas inferenciais, estimação sob H_0 é facilmente efetuada tornando o teste computacionalmente atrativo, quando comparado a outros procedimentos assintoticamente equivalentes (isto é, teste da razão de verossimilhanças e teste de Wald) (COX & HINKLEY, 1974). Por estas duas razões (bom poder e cálculo simples) o teste LM será usado, ao invés de outros, no procedimento inferencial.

O procedimento para a construção do teste de Gaussianidade usa o princípio do método multiplicador de Lagrange, que já foi bastante aplicado em muitos problemas econômicos; por exemplo, veja (BYRON, 1970), (GODFREY, 1978) e (BREUSCH & PAGAN, 1980). Todavia, tem sua característica distinta na formulação de $l(\theta)$. Em vez de assumir uma função densidade de probabilidade ‘particular’ para u_i (ou transformação de u_i), assume-se que a verdadeira função densidade de probabilidade para u_i pertence a uma ‘família geral’ (por exemplo, a família Pearson), da qual a distribuição sob H_0 é um membro particular. Assim, aplica-se o princípio multiplicador de Lagrange para testar H_0 dentro desta ‘família geral’ de distribuições. O teste obtido dessa forma é conhecido ter ótimas propriedades de poder para grandes amostras para membros da ‘família geral’ especificada. Todavia, isto não implica que o teste estatístico não terá boas propriedades de poder para distribuições que não são membros da ‘família geral’ especificada. (JARQUE & BERA, 1987) mostraram que o teste pode realizar-se com bom poder mesmo para distribuições não pertencentes à ‘família geral’ a partir do qual o teste foi derivado.

b) Teste para normalidade de observações

Agora, o método multiplicador de Lagrange será usado para derivar um teste adicional para a normalidade de observações, o qual é simples de calcular e assintoticamente eficiente.

Considere um conjunto de $2N$ observações independentes de uma variável aleatória X , diga $[X_1, X_2, \dots, X_{2N}]$ conforme ilustrado na Fig. 4.6, e assuma que o interesse é testar a normalidade de X . Denote a média populacional desconhecida de X_i por $\mu = E[X_i]$ e, por conveniência, escreva:

$$X_i = \mu + u_i \quad (4.51)$$

Assuma que a função densidade de probabilidade de u_i , $f(u_i)$, é um membro da família Pearson, a qual é uma família de distribuições de probabilidades contínuas. Essa condição

não é muito restritiva, devido à ampla gama de distribuições que estão incluídas nela (por exemplo, membros particulares desta família são as distribuições normal, exponencial, beta, gama, t de Student e F) (JARQUE & BERA, 1987). A função densidade de probabilidade Pearson é definida para ser uma solução válida para a equação diferencial (KENDALL & STUART, 1969):

$$\frac{df(u_i)}{du_i} = \frac{(c_1 - u_i)f(u_i)}{(c_0 - c_1u_i + c_2u_i^2)} \quad (-\infty < u_i < \infty) \quad (4.52)$$

onde

$$c_0 = \frac{4b_2 - 3b_1}{10b_2 - 12b_1 - 18} \mu_2 \quad (4.53)$$

$$c_1 = \sqrt{\mu_2} \cdot \sqrt{b_1} \cdot \frac{b_2 + 3}{10b_2 - 12b_1 - 18} \quad (4.54)$$

$$c_2 = \frac{2b_2 - 3b_1 - 6}{10b_2 - 12b_1 - 18} \quad (4.55)$$

$$\sqrt{b_1} = \frac{\hat{\mu}_3}{\hat{\mu}_2^{3/2}} \quad (4.56)$$

$$b_2 = \frac{\hat{\mu}_4}{\hat{\mu}_2^2} \quad (4.57)$$

$$\hat{\mu}_j = \sum_{i=1}^{2N} \frac{(x_i - \bar{x})^j}{2N} \quad (4.58)$$

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{2N} \frac{x_i}{2N} \quad (4.59)$$

Segue que o logaritmo da função de verossimilhança das $2N$ observações $[x_1, \dots, x_{2N}]$ pode ser escrito como:

$$l(\mu, c_0, c_1, c_2) = -2N \log \left[\int_{-\infty}^{\infty} \exp \left[\int \frac{c_1 - u_i}{c_0 - c_1 u_i + c_2 u_i^2} du_i \right] du_i \right] + \sum_{i=1}^N \left[\int \frac{c_1 - u_i}{c_0 - c_1 u_i + c_2 u_i^2} du_i \right] \quad (4.60)$$

Sob condições de normalidade, b_1 é igual a 0 e b_2 é igual a 3, implicando que $c_1 = 0$ e $c_2 = 0$. O objetivo aqui é testar a hipótese de normalidade, que significa, da expressão para $f(u_i)$, testar $H_0: c_1 = c_2 = 0$. Seja $\theta_1 = (\mu, c_0)'$, $\theta_2 = (c_1, c_2)'$ e $\theta = (\theta_1, \theta_2)'$, bem como as definições da Seção 4.5.2a, então o teste estatístico *LM* será denotado por teste *JB* (JARQUE & BERA, 1987) cuja equação principal é apresentada em (4.61):

$$JB = 2N \left[\frac{\sqrt{b_1}^2}{6} + \frac{(b_2 - 3)^2}{24} \right] \quad (4.61)$$

Observe que $\sqrt{b_1}$ e b_2 , são respectivamente, os coeficientes amostrais obliquidade e curtose descritos na Seção 4.3.4 deste capítulo. Dos resultados relatados na Seção 4.5.2a, sabe-se que, sob $H_0: c_1 = c_2 = 0$, JB é assintoticamente distribuída como χ_2^2 , e que um teste baseado em (4.61) é assintoticamente localmente mais poderoso. A hipótese H_0 é rejeitada, para grandes amostras, se o valor calculado em (4.61) é maior do que o valor crítico (JB_{crit}) geralmente estimado de uma distribuição χ_2^2 . Então, o teste *JB* é: Rejeite H_0 se $JB > JB_{crit}$.

Vários testes para normalidade das observações estão disponíveis. Por exemplo, há testes baseados em qualquer uma das quantidades $\sqrt{b_1}$ ou b_2 . Estes possuem ótimas propriedades, para grandes amostras, se o afastamento da normalidade é devido a qualquer dos dois índices, obliquidade ou curtose (GEARY, 1947). Em adição, há testes abrangentes baseados no uso conjunto de $\sqrt{b_1}$ e b_2 . Um exemplo é o teste *R* sugerido por (PEARSON et al, 1977); veja também (D'AGOSTINO & PEARSON, 1973).

É importante observar que (4.61) foi demonstrada em (BOWMAN & SHENTON, 1975). (BOWMAN & SHENTON, 1975) apenas apresentaram a expressão estatística, e observaram que era assintoticamente distribuída como χ_2^2 sob normalidade; no entanto, eles não estudaram suas propriedades para amostras grandes. Contudo, (JARQUE &

BERA, 1987) mostraram que (4.61) é um teste de escore (ou seja, um teste estatístico), e portanto descobriram um princípio que prova sua eficiência assintótica.

Para determinar a distribuição de (4.61) sob H_0 , (JARQUE & BERA, 1987) recorreram à simulação computacional diante da dificuldade de obtê-la analiticamente. Foi demonstrado que JB é invariante ao parâmetro escalar, isto é, que o valor de JB é o mesmo se calculado com X_i/σ em vez de X_i (para $\sigma > 0$). (JARQUE & BERA, 1987) assumiram que a variância de X é igual a 1 e geraram 10000 conjuntos de $2N$ variáveis pseudo-aleatórias de uma distribuição $N(0,1)$. Então, para cada um destes 10000 conjuntos, JB foi calculado, gerando 10000 valores de JB sob H_0 . Quando a quantidade de valores de JB é grande o suficiente, obtém-se uma aproximação tão boa quanto desejada para a distribuição de JB e, então, determina-se o ponto crítico do teste (JB_{crit}) para um dado nível de significância α , ou a probabilidade do erro tipo I para o valor calculado de JB para um conjunto particular de observações. Além disso, (JARQUE & BERA, 1987) apresentaram um estudo comparando o poder de amostras finitas de JB com aquelas de outros testes existentes para normalidade.

(WUERTZ & KATZGRABER, 2009) gerou uma tabela extensa de pontos significantes para o teste JB . Os valores desta tabela são mais precisos do que aqueles gerados por (JARQUE & BERA, 1987) pois foram gerados com 10^7 réplicas de conjuntos de $2N$. Os valores de JB_{crit} para $\alpha = 0,10$ e $\alpha = 0,05$ estão sintetizados na Tab 4.4. Valores críticos para $2N$ não tabelados são obtidos por interpolação (spline cúbica).

Tabela 4.3: Valores críticos para o teste Jarque-Bera (WUERTZ & KATZGRABER, 2009).

$2N$	$\alpha = 0,10$	$\alpha = 0,05$	$2N$	$\alpha = 0,10$	$\alpha = 0,05$
10	1,6232	2,5247	300	4,1891	5,7732
20	2,3470	3,7954	500	4,3317	5,8551
35	2,8814	4,5929	800	4,4274	5,9103
50	3,1834	4,9757	1000	4,4568	5,9242
75	3,4862	5,2777	1600	4,5132	5,9569
100	3,6734	5,4300	2400	4,5424	5,9671
150	3,9041	5,5984	10000	4,5888	5,9857
200	4,0327	5,6758			

Algoritmo 4.2: Algoritmo para a realização do teste JB para um trecho de sinal ilustrado na Fig. 4.6.

- 1º) Determine um vetor de amostras independentes e identicamente distribuídas de tamanho $2N$;
- 2º) Formule as hipóteses nula e alternativa:
 - H_0 : o vetor de amostras pertence a uma distribuição normal com média e variância desconhecida;
 - H_1 : o vetor de amostras não é proveniente de uma distribuição normal.
- 3º) Determine o nível de significância α ;
- 4º) Determine o valor crítico (JB_{crit}) para o teste estatístico (Tab. 4.3)
- 5º) Calcule JB de acordo com (4.61);
- 6º) Teste JB : rejeite H_0 se $JB > JB_{crit}$.

c) Significado da estatística JB

O valor de JB para distribuições não normais é diferente de zero, e aumenta conforme a quantidade de amostras $2N$ também aumenta. Contudo, para algumas distribuições, como a distribuição Gama, t-Student e Qui-quadrado, o valor de JB tende a zero quando os parâmetros k e v dessas distribuições tendem a infinito (veja Tab. 4.6). Isso ocorre porque essas distribuições tendem para um comportamento semelhante àquela de uma distribuição normal quando os parâmetros k e v tendem a infinito (KAY, 1993).

Tabela 4.4: JB para algumas distribuições de probabilidade.

Distribuição	$\sqrt{b_1}$	$b_2 - 3$	JB
Normal	0	0	0
Uniforme	0	-1,2	$2N \cdot 0,06$
Laplace	0	3	$2N \cdot 0,375$
Gamma	$6/k$	$2/\sqrt{k}$	$2N[6/k^2 + 1/6k]$
t-Student	$0, v > 3$	$6/(v - 4), v > 4$	$2N[0,5/(v - 4)^2]$
Qui-quadrado	$\sqrt{8/k}$	$12/k$	$2N[4/3k + 6/k]$

4.6 Avaliação estatística de sinais MEA

Todos os resultados apresentados no Capítulo 5 foram obtidos avaliando-se M segmentos disjuntos de duração $2NT$ ms cada, para canais individuais da MEA, isto é:

$$M = \frac{1200 \text{ s}}{2NT \text{ ms}} \quad (4.62)$$

onde $2N = [100 \ 200 \ 400 \ 600 \ 800 \ 1000 \ 1500 \ 2000 \ 2500 \ 10000]$ amostras.

Então, para $T = 0,1$ ms fixo, $2NT = [10 \ 20 \ 40 \ 60 \ 80 \ 100 \ 150 \ 200 \ 250 \ 1000]$ ms.

Para uma determinada duração de tempo $2NT$ ms, foi estimado o parâmetro estatístico média (4.12) para cada um dos M segmentos de um canal da MEA. Esse procedimento foi repetido para os demais canais da MEA de um experimento completo, gerando a matriz (4.63) de dimensão $60 \times M$. Em seguida, foi obtido o valor médio da estatística em questão para cada canal MEA, resultando no vetor (4.64) de dimensão 60×1 .

$$\begin{bmatrix} \bar{x}_{1,1} & \cdots & \bar{x}_{1,M} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \bar{x}_{60,1} & \cdots & \bar{x}_{60,M} \end{bmatrix} \quad (4.63)$$

onde $\bar{x}_{i,j}$ é o valor médio do segmento j , associado ao eletrodo i de MEA, sendo que $i = 1, 2, \dots, 60$ e $j = 1, 2, \dots, M$.

$$\begin{bmatrix} \bar{\bar{x}}_1 = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M \bar{x}_{1,j} \\ \vdots \\ \bar{\bar{x}}_{60} = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M \bar{x}_{60,j} \end{bmatrix} \quad (4.64)$$

onde $\bar{\bar{x}}_i$ é o valor médio associado à média de cada canal da MEA, sendo que $i = 1, 2, \dots, 60$. A média de todos os canais é \bar{x}_{2NT} com variância estimada $\hat{\sigma}_{2NT}^2$, dados em (4.65).

$$\begin{aligned} \bar{x}_{2NT} &= \frac{1}{60} \sum_{i=1}^{60} \bar{\bar{x}}_i \\ \hat{\sigma}_{2NT}^2 &= \frac{1}{60-1} \sum_{i=1}^{60} (\bar{\bar{x}}_i - \bar{x}_{2NT})^2 \end{aligned} \quad (4.65)$$

$$(\bar{x}, \hat{\sigma}_{\bar{x}})_{2NT} \quad \text{para } 2NT = [10 \ 20 \ 40 \ 60 \ 80 \ 100 \ 150 \ 200 \ 250 \ 1000] \text{ ms} \quad (4.66)$$

Os passos descritos foram repetidos para diferentes valores de $2NT$ ms considerando apenas um experimento, resultando em (4.66). Procedimento análogo foi realizado para todos os experimentos descritos na Seção 4.2, ou seja, Inativa, DIV39, DIV41, TTX e NoNeurons. Os resultados estão expressos na Fig. 5.6.

Também foram estimadas as estatísticas variância (4.13), obliquidade (4.14) e curtose (4.15). O procedimento é análogo àquele para estimar a média, que foi descrito nos dois parágrafos anteriores. Então, (4.67) foi obtido para o índice variância (Fig. 5.7), (4.68) para o índice obliquidade (Tab. 5.2 e Fig. 5.8) e (4.69) para o índice curtose (Tab. 5.3 e Fig. 5.9).

$$(\hat{\sigma}^2, \hat{\sigma}_{\hat{\sigma}^2}^2)_{2NT} \quad \text{para } 2NT = [10 \ 20 \ 40 \ 60 \ 80 \ 100 \ 150 \ 200 \ 250 \ 1000] \text{ ms} \quad (4.67)$$

$$(\sqrt{b_1}, \hat{\sigma}_{\sqrt{b_1}}^2)_{2NT} \quad \text{para } 2NT = [10 \ 20 \ 40 \ 60 \ 80 \ 100 \ 150 \ 200 \ 250 \ 1000] \text{ ms} \quad (4.68)$$

$$(b_2, \hat{\sigma}_{b_2}^2)_{2NT} \quad \text{para } 2NT = [10 \ 20 \ 40 \ 60 \ 80 \ 100 \ 150 \ 200 \ 250 \ 1000] \text{ ms} \quad (4.69)$$

Depois de verificar a sensibilidade dos sinais MEA às estatísticas média, variância, obliquidade e curtose, foi avaliado se esses sinais podem ser modelados como processos estacionários e gaussianos.

Para cada canal da MEA, M segmentos de duração $2NT$ ms foram avaliados para o teste de estacionariedade. Assim, para os 60 canais da MEA para um experimento completo, tem-se a matriz (4.70):

$$\begin{bmatrix} MRT_{1,1} & \cdots & MRT_{1,M} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ MRT_{60,1} & \cdots & MRT_{60,M} \end{bmatrix} \quad (4.70)$$

onde $MRT_{i,j}$ é o teste da Razão Média calculado de acordo com a Tab. 4.3 do segmento j , associado ao eletrodo i de MEA, sendo que $i = 1, 2, \dots, 60$ e $j = 1, 2, \dots, M$.

A porcentagem de segmentos MEA que não pode ser modelada como um processo estacionário (PSNE) foi calculado para cada canal. (4.70) foi obtido para todas as seguintes durações de tempo $2NT = [10 \ 20 \ 40 \ 60 \ 80 \ 100 \ 150 \ 200 \ 250 \ 1000]$ ms, resultando em

(4.71), onde k é índice do vetor $2NT(1 \times k)$. Todos os resultados foram corrigidos para o erro tipo I de falsas rejeições da hipótese sendo testada.

$$\begin{bmatrix} PSNE_{1,1} & \cdots & PSNE_{1,10} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ PSNE_{60,1} & \cdots & PSNE_{60,10} \end{bmatrix} \quad (4.71)$$

onde $PSNE_{i,k}$ é a porcentagem de segmentos não estacionários associado ao eletrodo i para a duração de tempo k , sendo que $i = 1, 2, \dots, 60$ e $k = 1, 2, \dots, 10$.

Usando o gráfico *box plot*, verificou-se se algum canal apresentava valores atípicos (*outliers*) de percentagens em relação ao grupo ao qual pertence para uma duração específica $2NT$ ms. Contudo, somente foram excluídos os canais cujas percentagens foram atípicas para todas as durações de tempo $2NT$ ms. A eliminação de canais para o passo seguinte foi evitada ao máximo. Além disso, todos os elementos $PSNE_{4,j}$ também foram eliminados, pois trata-se do registro efetuado pelo eletrodo-padrão da MEA, ou seja, o eletrodo 15 (veja Seção 2.4.2a).

Depois que alguns canais foram excluídos, (4.72) foi obtida calculando-se a média e variância entre as $PSNE$ para os canais remanescentes para os segmentos de tempo $2NT$. Os resultados deste teste de estacionariedade para o banco de dados sob estudo estão ilustrados na Fig. 5.10 e na Tab. 5.4.

$$\begin{bmatrix} \overline{PSNE}_1 & \hat{\sigma}_{PSNE_1}^2 \\ \vdots & \vdots \\ \overline{PSNE}_k & \hat{\sigma}_{PSNE_k}^2 \end{bmatrix}^T \quad (4.72)$$

onde $\overline{PSNE}_k = \frac{1}{CR} \sum_{i=1}^{CR} PSNE_i$, CR é o número de canais restantes depois que alguns eletrodos foram excluídos, $\hat{\sigma}_{PSNE_k}^2$ é a variância associada a \overline{PSNE}_k e $k = 1, 2, \dots, 10$.

O teste JB para a análise da normalidade dos dados foi aplicado seguindo o mesmo passo-a-passo discutido para o teste MRT para estacionariedade, culminando em (4.73) e os resultados para os dados investigados podem ser visualizados na Tab. 5.5 e na Fig. 5.11.

$$\begin{bmatrix} \overline{PSNG}_1 & \hat{\sigma}_{PSNG_1}^2 \\ \vdots & \vdots \\ \overline{PSNG}_j & \hat{\sigma}_{PSNG_k}^2 \end{bmatrix}^T \quad (4.73)$$

onde $\overline{PSNG}_k = \frac{1}{CR} \sum_{i=1}^{CR} PSNG_i$, CR é o número de canais restantes depois que alguns eletrodos foram excluídos, $\hat{\sigma}_{\overline{PSNG}_k}^2$ é a variância associada a \overline{PSNG}_k e $k = 1, 2, \dots, 10$.

4.7 Considerações Finais

Este capítulo apresentou a base de dados empregada neste trabalho, assim como os fundamentos teóricos para sua análise. (OLSEN et al, 2008) demonstrou que o teste da Razão Média é eficiente para detectar pontos de mudanças em séries temporais. Também apresentou a aplicação prática desse teste para encontrar mudanças nas temperaturas médias do hemisfério norte bem como na produtividade de uma fábrica. Em sinais MEA, quando ocorre um *spike* ou *burst*, intuitivamente, pode-se pensar que o espectro de frequência terá um padrão diferente daquele de ruído. Assim, tais ocorrências geram uma não-estacionariedade no sinal extracelular.

Em síntese, o teste da Razão Média compara a densidade espectral de potência estimada de trechos adjacentes de um sinal. Quando não é possível afirmar que as PSD's são iguais, então, diz-se que o sinal é não-estacionário. O teste *MR* testa a hipótese nula de que a razão média entre as PSD's é 1. O teste usa periodogramas para estimar as densidades espectrais e devido à remoção das componentes DCs desses periodogramas, o teste fica limitado em detectar mudanças na média do sinal.

Para analisar a Gaussianidade dos sinais MEA, o teste Jarque-Bera, que é muito empregado para testar a normalidade de dados econômicos, foi utilizado. Outra aplicação prática do teste *JB* pode ser visto em (BESDOK & YÜKSEL, 2005), que propuseram um filtro baseado na estatística *JB* para restaurar imagens altamente deterioradas por ruído impulsivo.

Em suma, o teste *JB* testa a hipótese nula de que os dados possuem uma distribuição Gaussiana com média e variância desconhecida. Esse teste assume que as amostras são independentes e identicamente distribuídas. No entanto, essa condição não é muito restritiva porque este teste funciona bem para séries de dados financeiros, onde não se pode assegurar a independência dos dados. Alguns trabalhos da literatura relatam uma limitação do teste *JB* que é sua sensibilidade à presença de valores atípicos (*outliers*) na distribuição de probabilidade. No contexto da MEA, tais valores atípicos podem estar associados com a presença de *spikes* no sinal.

CAPÍTULO 5

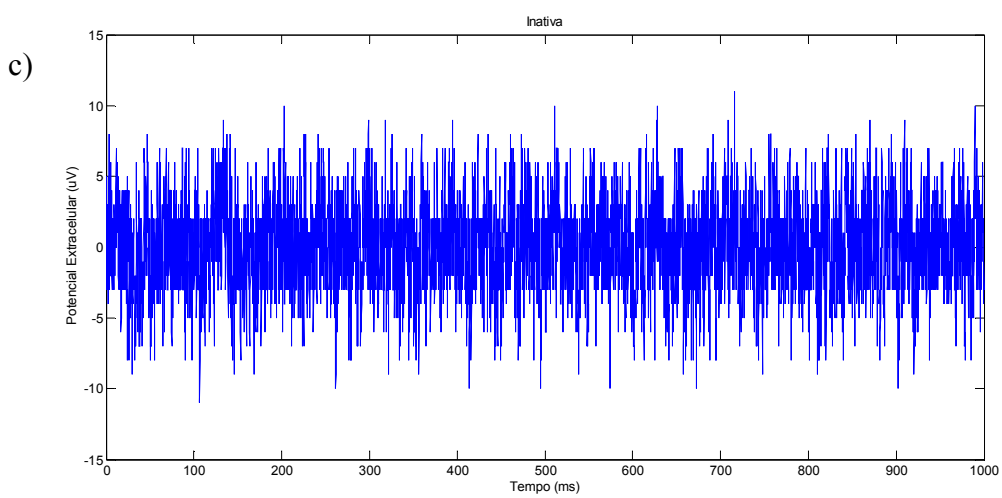
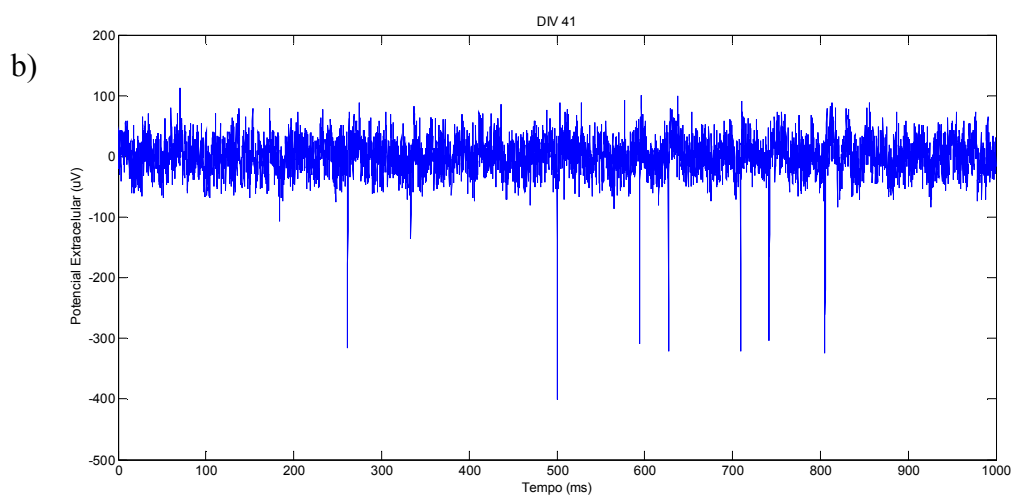
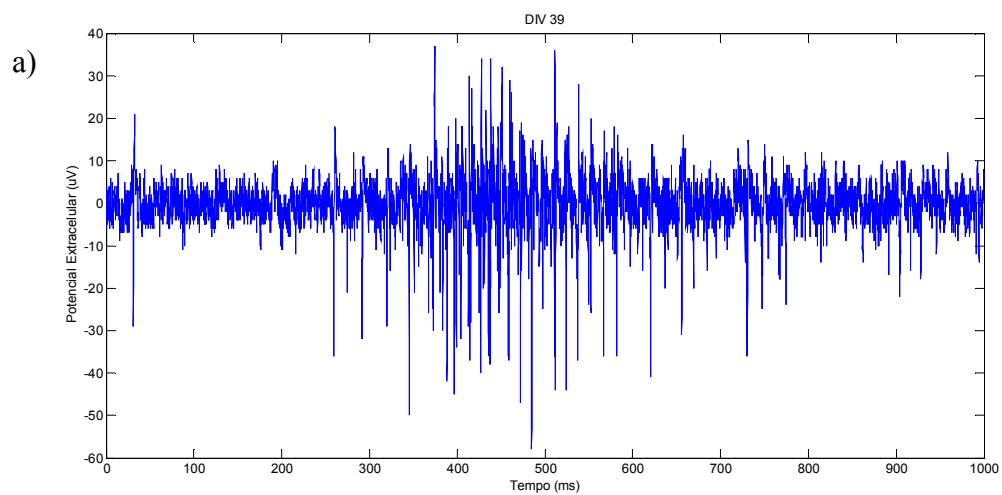
RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Introdução

Este capítulo compara os resultados obtidos para o banco de dados sob investigação do ponto de vista clássico (ver Seção 2.5) e através de uma nova abordagem que processa o sinal bruto MEA e analisa a estacionariedade e Gaussianidade desses sinais. Inicialmente, são apresentados os resultados da detecção de *spikes* e suas estatísticas. Em seguida, a análise se dá por meio dos momentos até quarta ordem, análise espectral e da estatística Jarque-Bera. Além de uma discussão sobre os resultados, também são feitas considerações importantes sobre os índices que são sensíveis aos sinais da MEA, bem como sobre a correlação entre o processamento clássico e as novas análises propostas nesta dissertação.

5.2 Técnica Clássica de Detecção de *Spikes*

Os cinco experimentos analisados neste capítulo foram descritos na Seção 4.2 do Capítulo 4. O banco de dados compreende dois experimentos de cultura ativa (DIV39 e DIV41), um experimento de cultura inativa, um experimento de ruído biológico (TTX), e um experimento de ruído de instrumentação (NoNeurons). Para cada experimento, um trecho de 1 s está ilustrado na Fig. 5.1. Observe a diferença entre as amplitudes de cada trecho MEA. Para o experimento DIV39 (cultura ativa), o potencial extracelular variou entre -60 a +40 μV , enquanto que DIV41, também cultura ativa, o potencial extracelular MEA varia em um intervalo de amplitude maior, entre -500 e +200 μV . Já para o experimento Inativa, a amplitude do potencial extracelular diminui bastante em relação aos experimentos de cultura ativa, encontrando-se no intervalo que vai de -15 a +15 μV . O sinal TTX, que consiste em ruído biológico e ruído experimental, varia no intervalo que vai de -100 μV a +100 μV . E finalmente, o ruído de instrumentação MEA, experimento NoNeurons, tem amplitudes no seguinte intervalo (-10, +10) μV .



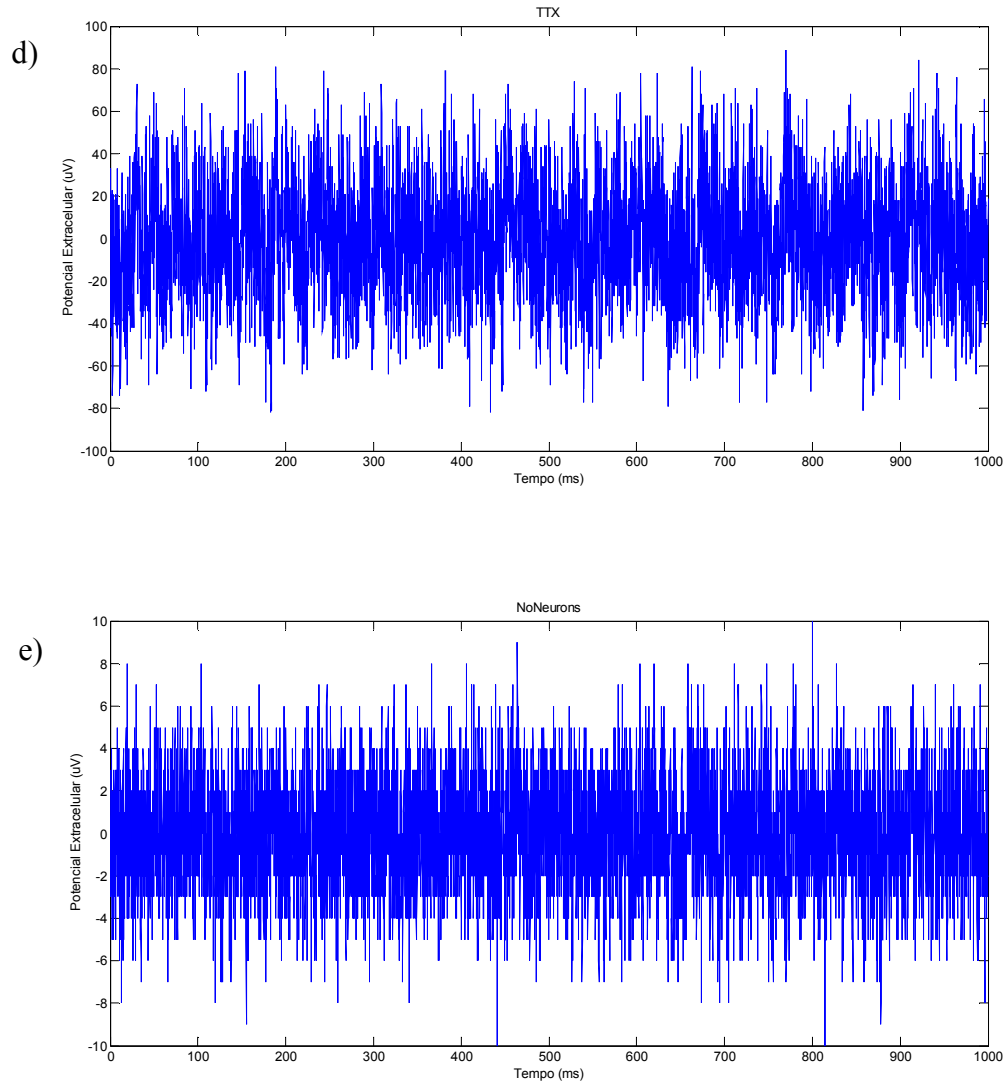


Figura 5.1: Trechos de sinais MEA de cada experimento: (a) DIV39, (b) DIV41, (c) Inativa, (d) TTX e (e) NoNeurons.

A análise clássica de *spikes* utiliza principalmente os seguintes quantificadores: gráficos de *Raster Plot*, histogramas de intervalos entre *spikes* (ISI), histograma de intervalos entre *bursts* (IBI), taxa média de disparo de *spike* (MFR) e a taxa média de ocorrência de *bursts* (MBR). Os resultados de detecção de *spikes* foram obtidos utilizando o software *Spike Manager* (CHIAPPALONE et al, 2006). O gráfico de *Raster plot* representa cada *spike* detectado como uma marca no instante de tempo onde o sinal bruto de tensão ultrapassa o limiar fixado no algoritmo detector de *spikes*.

Analizando os gráficos de *Raster Plot*, os histogramas ISI e os histogramas IBI (Figs. 5.2, 5.3 e 5.4 respectivamente), é possível notar atividade significativa somente nas culturas dos experimentos DIV39, DIV41, enquanto que para a cultura Inativa

quase não há *bursts*. Todavia, a quantidade de canais que apresentam *spikes* e/ou *bursts* é muito elevada para a cultura inativa, se comparada à DIV41. A maior atividade registrada encontra-se no experimento DIV39 seguido pelo DIV41, o que pode ser explicado pela diferença entre a idade dessas culturas. A partir dos gráficos de *Raster Plot* (Fig. 5.2), podemos dizer que a cultura DIV39 apresenta atividade elétrica em quase todos os canais e de forma sincronizada, caracterizando uma cultura ativa que já atingiu a maturação (CORNER, 2008), ou seja, as conexões sinápticas excitatórias atingiram um equilíbrio com as conexões inibitórias.

A cultura do experimento DIV41 apresenta atividade elétrica em vários canais, mas não em todos, o que pode explicar a diferença significativa no número de *spikes* e *bursts* encontrados em relação à cultura DIV39. Acredita-se que os neurônios da cultura DIV41 estejam agrupados em *clusters*, já que alguns eletrodos não possuem atividade elétrica expressiva. Por outro lado, a atividade presente nos canais ativos de DIV41 é muito mais significativa quando comparada à atividade de um único canal do registro da cultura Inativa, o que talvez explique o fato da cultura DIV21 ser considerada inativa.

O experimento Inativa, Fig. 5.2, apresenta padrões de atividade desorganizada presente em quase todos os eletrodos da MEA, o que caracteriza uma cultura cujos neurônios iniciam sua atividade espontânea isoladamente na rede, não evidenciando nenhum tipo de sincronismo (BLANKENSHIP & FELLER, 2010). De acordo com a literatura, uma cultura com 21 DIVs já possui evidências de sincronismo, já que ela começa a atingir a maturação e isto não é visto neste experimento. Por isso, diz-se que esta cultura é inativa, ou seja, está tendendo à morte celular.

A cultura TTX representa a mesma cultura que DIV41, porém com a adição da droga tetrodotoxina (TTX), um bloqueador de canais de sódio que inibe a geração e a condução do potencial de ação entre neurônios (KANDEL, 2000). A diferença de atividade registrada em ambas as culturas é bastante significativa, demonstrando o efeito do tratamento com a droga TTX, a qual inibiu a atividade bioelétrica da cultura. Este registro característico pode ser comparado ao registro de ruído de instrumentação NoNeurons, ou seja, a atividade registrada em TTX é semelhante àquela de um registro sem cultura no dispositivo MEA no contexto de detecção clássica de *spikes*. Por fim, as culturas TTX e NoNeurons não apresentam atividade de *spikes* expressiva, veja Fig. 5.2, e perceba que a ausência expressiva de *spikes* está coerente com o tipo de registro que ocorreu.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

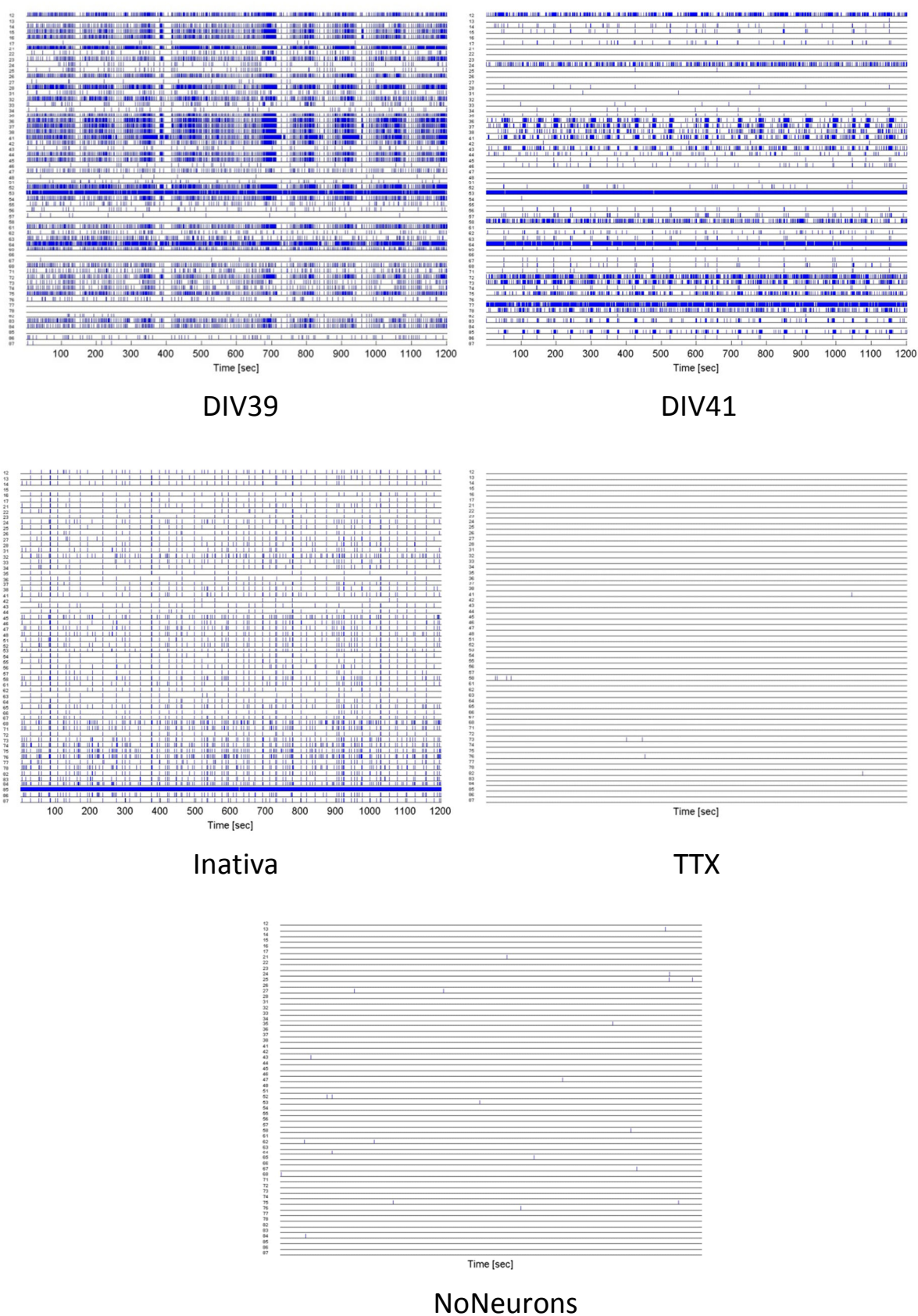


Figura 5.2: Gráficos de *Raster Plot* representando a atividade de cada cultura para os 60 canais da MEA durante 20 minutos de registro da atividade elétrica.

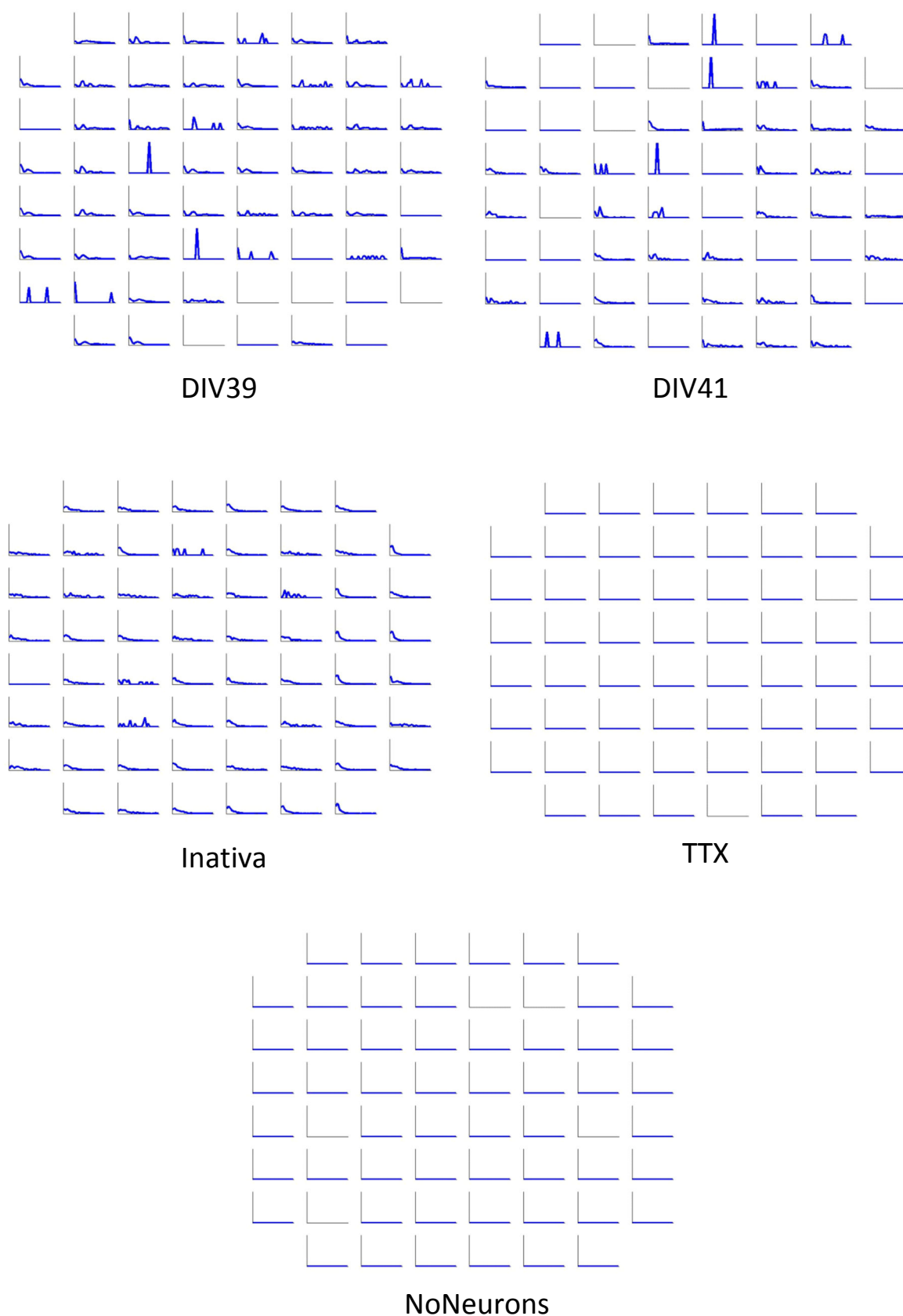


Figura 5.3: Histogramas de intervalos entre *spikes* (ISI) de cada cultura, representados nos 60 canais da MEA durante o registro da atividade elétrica (20 minutos).

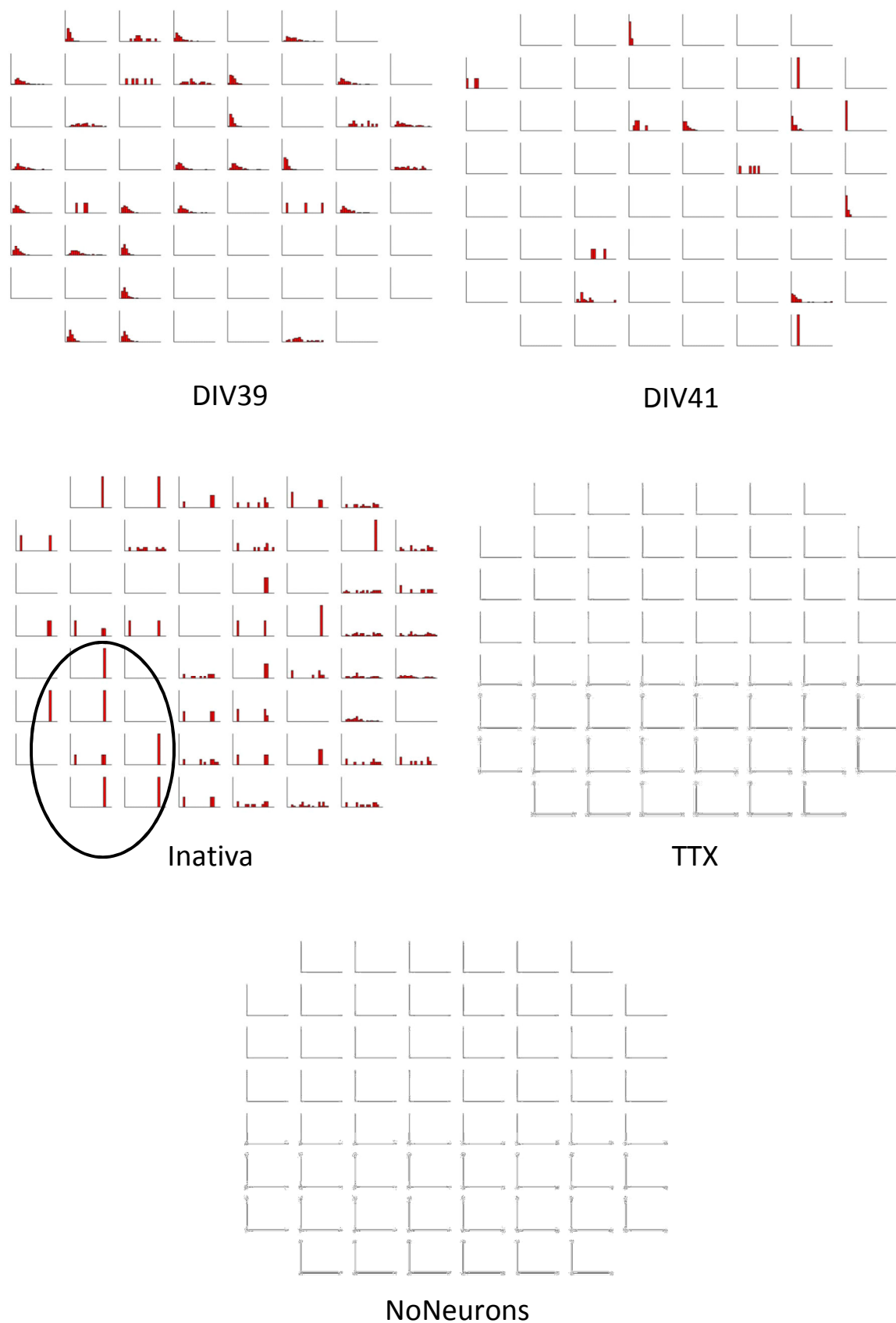


Figura 5.4: Histogramas de intervalos entre *bursts* (IBI) de cada cultura, representados nos 60 canais da MEA durante 20 min de registro da atividade elétrica.

Na Fig. 5.3, para DIV39 o intervalo entre *spikes* da maioria dos eletrodos possui uma distribuição mais espalhada quando comparado com o experimento DIV41, que representa uma cultura madura evoluindo para morte celular. Já na cultura Inativa os intervalos entre *spikes* estão mais concentrados em valores menores, mostrando que a maior parte da atividade elétrica registrada ocorre a intervalos menores de disparos de *spikes*, evidenciando a atividade individual dos neurônios dessa cultura. Por último, os experimentos TTX e NoNeurons não apresentam gráficos de intervalos entre *spikes*, já que a quantidade de *spikes* registrados foi considerada desprezível.

Os gráficos de histogramas de intervalos entre *bursts* são mostrados na Fig. 5.4 para cada experimento analisado. A cultura DIV39 apresenta intervalos entre *bursts* mais concentrados em valores menores, caracterizando *bursts* de maior duração ou *bursts* de maior frequência, como pode ser visto na Tab. 5.1b, se comparados com a cultura DIV41. Esta última apresenta resultados diferentes de IBI para cada canal onde eles são calculados, evidenciando poucos neurônios interconectados. Pode-se dizer que a atividade elétrica de cada canal não influencia mais na atividade elétrica dos demais, o que é característico de uma cultura com a rede neuronal debilitada. Como a cultura DIV41 está em processo de morte celular, pode-se dizer que a morte de alguns neurônios provavelmente comprometeu a comunicação da rede.

Ainda, na Fig. 5.4, podem ser vistos os histogramas IBI para a cultura Inativa, na qual se observa que em alguns canais há um pico nos gráficos, caracterizando intervalos entre *bursts* concentrados em valores específicos, enquanto que nos demais canais estes valores de intervalos entre *bursts* são distribuídos. Neste experimento, observa-se também que o comportamento de eletrodos muito próximos é semelhante, ou seja, alguns eletrodos, por exemplo, 16, 25, 26, 27, 28, 37 e 38, marcados por um círculo na Fig. 5.4, possuem valores de IBI concentrados. Pode-se dizer que os neurônios próximos a estes eletrodos estão conectados entre si, já que quanto mais próximo o corpo celular se encontra do eletrodo, maior a atividade elétrica registrada. Quando se compara os histogramas IBI de Inativa e DIV41 fica comprovado que no primeiro caso a atividade de canais com *burst* é significativamente maior.

Por fim, nos histogramas de intervalo entre *bursts* dos experimentos TTX e NoNeurons, não foi identificado nenhum valor de IBI, porque nestes dois experimentos não houve quantidade de *spikes* consideráveis. Uma vez que não há registro de *spikes*, consequentemente também não existirão *bursts*.

Além dos gráficos já descritos, o software *Spike Manager* também gera uma tabela com as estatísticas mais relevantes referentes aos cinco experimentos processados (Tab. 5.1): quantidade total de *spikes*, taxa média de disparos de *spikes*, quantidade de *spikes* aleatórios, quantidade de *spikes* que formam *bursts*, valor médio de *spikes* por *burst*, número total de *bursts*, duração média dos *bursts*, quantidade de *bursts* por minuto e intervalo entre *bursts*.

Tabela 5.1: Resultados estatísticos obtidos no *Spike Manager* para os cinco experimentos: (a) estatísticas de *spikes*; (b) estatísticas de *bursts*.

(a)

	<i>Spikes</i>			
	Total de <i>Spikes</i>	<i>Spikes</i> Aleatórios (%)	ISI Média (ms)	SD ISI Média
DIV39	4701	27,54	77,12	12,39
DIV41	1329	49,54	202,64	19,85
Inativa	725	17,7	8,37	11,13
TTX	0	0	0	0
NoNeurons	0	0	0	0

(b)

	<i>Bursts</i>					
	MBR (<i>bursts</i> /min)	Total de <i>Bursts</i>	Duração Média de <i>Bursts</i> (ms)	SD Duração de <i>Bursts</i>	IBI Média (seg)	SD IBI Média
DIV39	11,64	233,33	173,36	5,65	16,41	3,26
DIV41	2,75	55,11	149,89	11,33	50,06	6,36
Inativa	1,98	39,81	112	7,1	37,10	4,46
TTX	0	0	0	0	0	0
NoNeurons	0	0	0	0	0	0

Em geral, pode-se dizer que os experimentos com adição de TTX e na ausência de neurônios apresentam pouquíssimos *spikes* e *bursts*, já que o TTX inibe os potenciais de ação, o que caracteriza dois experimentos com comportamentos semelhantes. Analogamente, as culturas ativas apresentam comportamentos próximos, já que possuem mais *spikes* do que os experimentos de cultura Inativa ou sem neurônios.

O experimento de cultura ativa DIV41 apresenta uma quantidade elevada de *spikes* randômicos (50%), o desvio padrão da duração de *bursts*, bem como o desvio do IBI médio, são maiores do que aqueles do experimento DIV39, caracterizando uma atividade desorganizada em DIV41, levando a crer que esta cultura está tendendo a morte celular. Além disso, o valor elevado da estatística IBI Média também caracteriza uma redução da atividade elétrica nesta cultura.

Já o experimento DIV39, os valores para o desvio padrão da duração de *bursts*, assim como o desvio da estatística IBI média, são menores em relação a DIV41, indicando um elevado sincronismo na atividade neuronal de DIV39.

5.3 Medidas do histograma de amplitude

As análises dos dados apresentados na Seção 5.2 fazem uso de uma metodologia clássica baseada em detecção de *spikes* para aferir sobre os conjuntos de experimentos. Nas seções posteriores são apresentados os resultados obtidos com a nova abordagem baseada no processamento bruto do sinal MEA, proposta nesta dissertação.

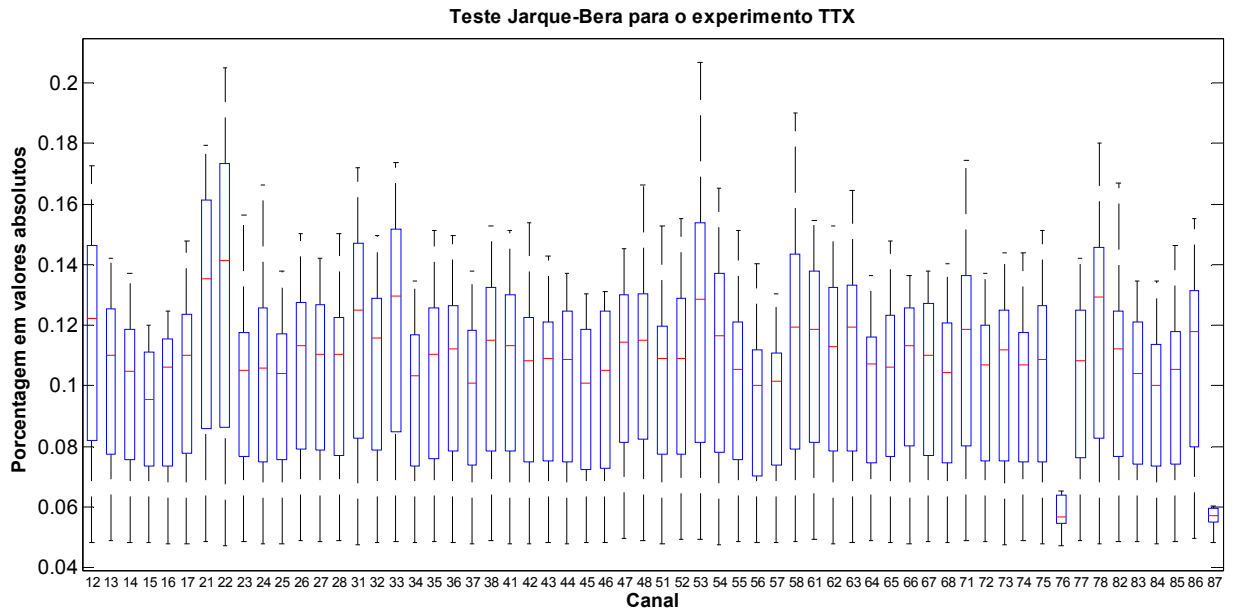
Para a correta interpretação dos resultados que seguem, alguns canais foram desconsiderados das análises matemáticas. Os canais excluídos para cada tipo de experimento estão relacionados abaixo.

- DIV39: canais 15 e 85.
- NoNeurons: canais 15 e 85.
- Inativa: canais 15 e 85.
- DIV41: canais 15, 76 e 87.
- TTX: canais 15, 76 e 87.

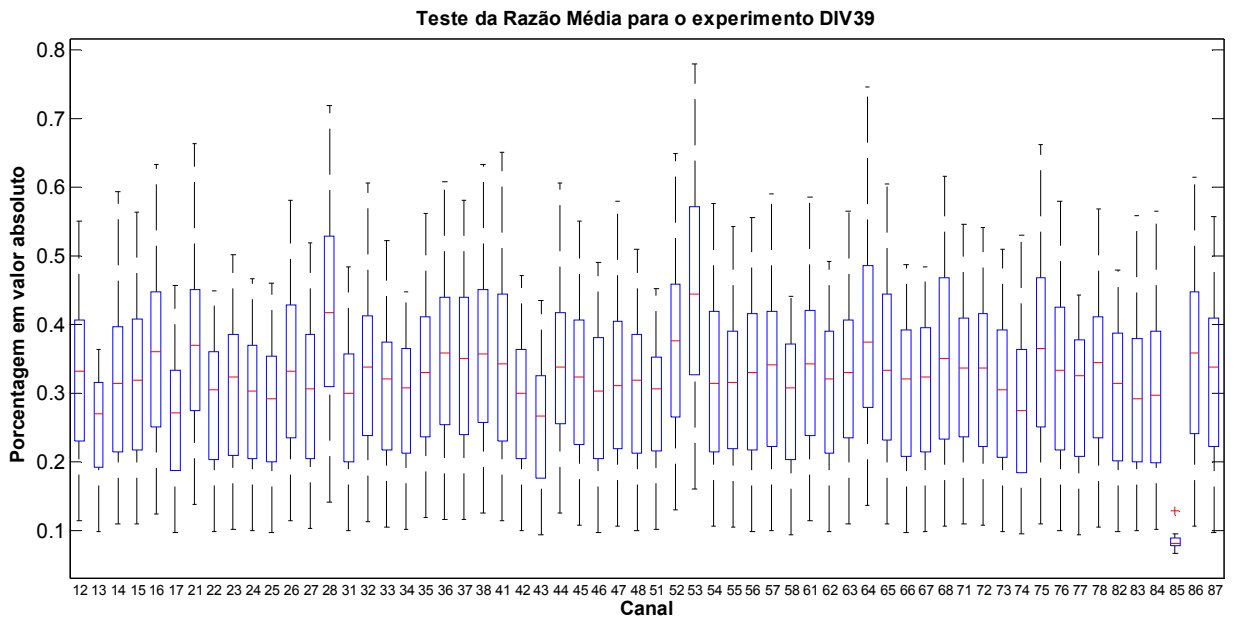
O canal 15 foi excluído de todos os experimentos. Esse canal é o eletrodo-padrão de cada um dos experimentos, ou seja, esse canal foi aterrado durante o registro do conjunto de dados. Isso significa que ele não possui informação de interesse para os propósitos desse estudo.

Com o auxílio da ferramenta *box plot* (Fig. 5.5), pode-se observar que além do canal 15, outros canais deveriam ser eliminados para análises futuras, pois eles apresentaram valores atípicos (*outliers*) para as estatísticas descritas na Seção 4.5 em relação ao conjunto de dados ao qual pertencem. Esses canais são o canal 85 para os experimentos DIV39, Inativa e NoNeurons; e os canais 76 e 87 para os experimentos DIV41 e TTX. Durante o registro, alguns canais podem apresentar um nível de ruído muito

mais elevado do que os demais e por isso, durante o registro, esses eletrodos também são aterrados (URL9). Além disso, evitou-se ao máximo eliminar registros do conjunto de dados, uma vez que o interesse deste trabalho é analisar o comportamento global de cada experimento.



(a)



(b)

Figura 5.5: Exemplos de gráficos *box plot* utilizados para excluir canais das análises de estacionariedade e Gaussianidade.

Os resultados para o sinal bruto da MEA apresentados neste capítulo foram obtidos aplicando-se a metodologia discutida nas Seções 4.5 e 4.6, para as seguintes janelas temporais expressas em milissegundos:

$$2T = [10 \ 20 \ 40 \ 60 \ 80 \ 100 \ 150 \ 200 \ 250 \ 1000] \text{ ms} \quad (5.1)$$

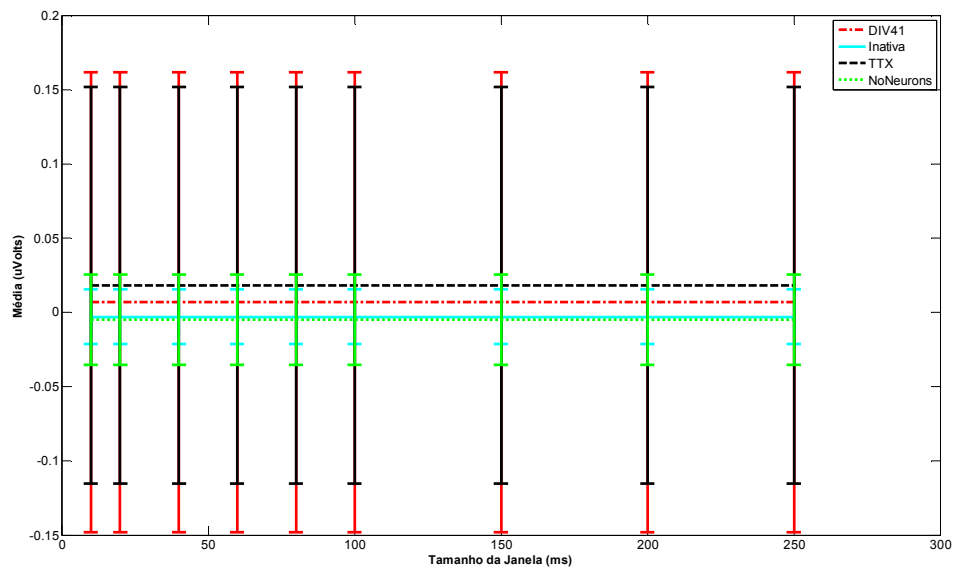
Além disso, a análise espectral de segmentos de sinal MEA de comprimento N foi obtida multiplicando-os por uma janela Hanning (5.2) com 50% de sobreposição.

$$w(n) = 0,5 \left(1 - \cos \left(2\pi \frac{n}{N} \right) \right), \quad 0 \leq n \leq N \quad (5.2)$$

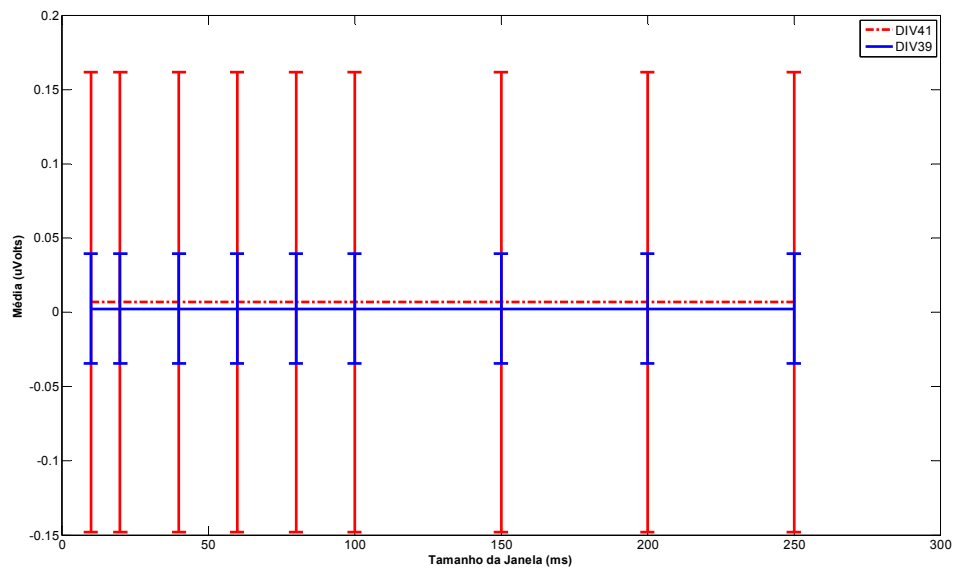
Inicialmente, quatro medidas estatísticas do histograma de amplitude do sinal MEA foram avaliadas em termos de sua confiabilidade e sensibilidade (BRONZINO et al, 1981) para distinguir entre os cinco conjuntos de sinais MEA. Esses índices estatísticos são: média, variância, obliquidade e curtose.

A média estimada de todos os experimentos são valores próximos a zero. Isso pode ser verificado na Fig. 5.6(a)-(b). Os valores médios da média estimada não dependeram do tamanho da janela de dados. E esse parâmetro estatístico não revela um padrão que possa distinguir entre os cinco experimentos. Conforme discutido no Cap. 4, uma variação na “média” é indicativo da presença de um desvio DC que pode ser produzido pelos amplificadores eletrônicos usados no registro (BRONZINO et al, 1981).

Os resultados obtidos na estimação da variância do conjunto de experimentos MEA estão representados na Fig. 5.7. Assim como a média, esta medida estatística também não dependeu fortemente dos tamanhos das janelas temporais. Neste caso, a variância também não exibe um padrão que possa distinguir entre os cinco experimentos. Isso é bastante evidente quando duas culturas ativas de idades semelhantes (experimento DIV39 e DIV41) revelam uma diferença pouco significativa entre as médias e, por outro lado, revelam uma enorme disparidade entre as medidas de variâncias. E também porque a variância estimada para o experimento TTX (ruído biológico) e aquela obtida para o experimento NoNeurons (ruído de instrumentação) foram bastante diferentes.

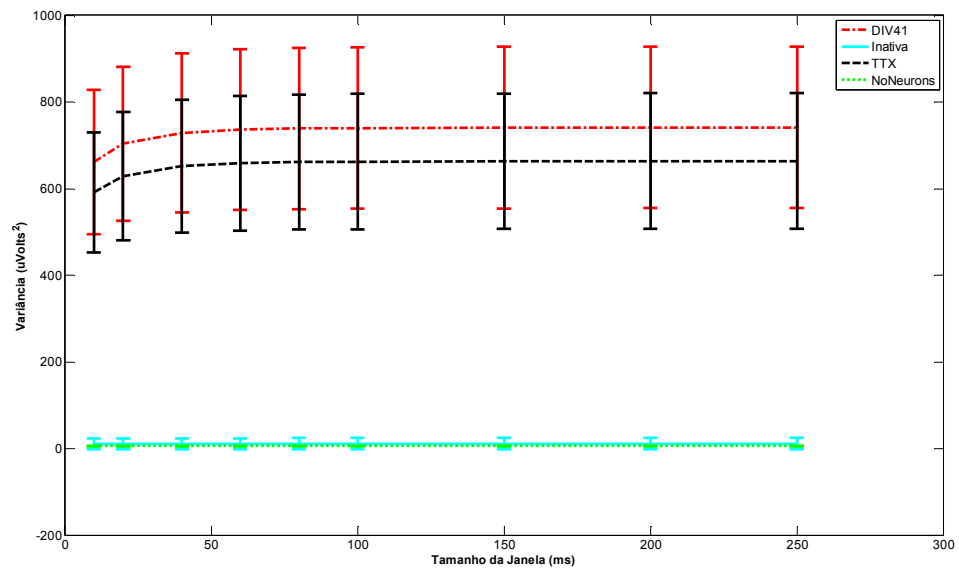


(a)

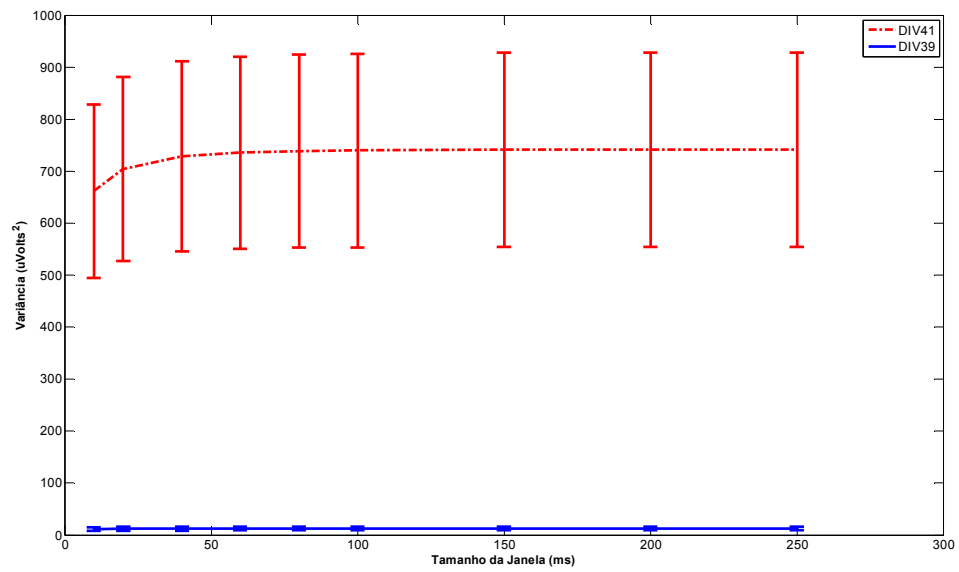


(b)

Figura 5.6: Valores médios da média estatística estimada para os cinco experimentos de sinais MEA.



(a)



(b)

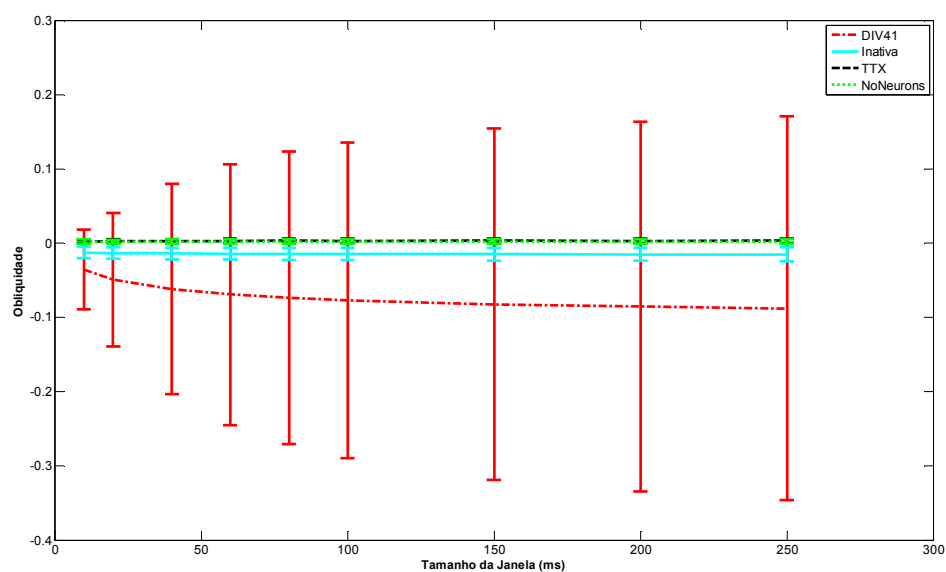
Figura 5.7: Variância média estimada do histograma de amplitude do sinal MEA.

Tabela 5.2: Valores médios da obliquidade do histograma de amplitude do sinal MEA.

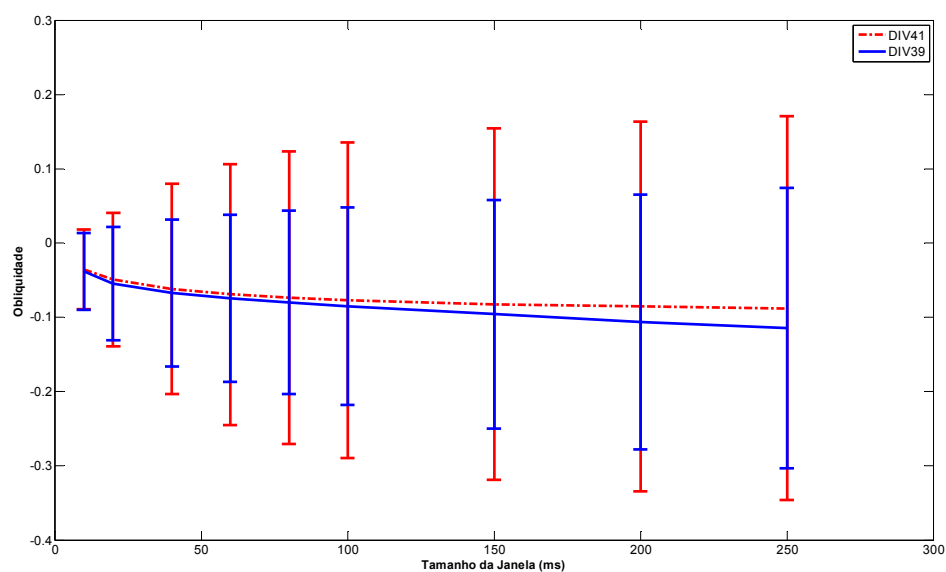
		Obliquidade									
		Tamanho da Janela (ms)									
		10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	Média	-0,0385	-0,0544	-0,0672	-0,0745	-0,08	-0,085	-0,0956	-0,106	-0,1146	-0,2205
	Desvio	0,0518	0,0764	0,0989	0,1125	0,1234	0,1328	0,1539	0,1715	0,1887	0,3876
DIV41	Média	-0,0355	-0,0492	-0,0621	-0,0693	-0,0738	-0,0771	-0,0825	-0,0853	-0,0878	-0,0965
	Desvio	0,0539	0,0896	0,1415	0,1758	0,1971	0,2126	0,2367	0,2487	0,258	0,285
Inativa	Média	-0,0126	-0,0133	-0,0139	-0,0143	-0,0145	-0,0145	-0,0149	-0,0151	-0,0155	-0,0195
	Desvio	0,0539	0,0896	0,1415	0,1758	0,1971	0,2126	0,2367	0,2487	0,258	0,285
TTX	Média	0,0022	0,0026	0,003	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031
	Desvio	0,0025	0,0027	0,0028	0,0028	0,0028	0,0029	0,0029	0,0028	0,0029	0,0029
NoNeurons	Média	0,0022	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,0019
	Desvio	0,0029	0,003	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031	0,0031

Resultados interessantes para distinguir entre os cinco experimentos foram encontrados com os índices estatísticos obliquidade e curtose. A Tab. 5.2 sintetiza os resultados obtidos na avaliação do índice de obliquidade e a Tab. 5.3 mostra os resultados obtidos para a estatística curtose. Os resultados apresentados em ambas as tabelas estão ilustrados nas Figs. 5.8 e 5.9.

Os índices obliquidade e curtose mostram certa padronização entre os diferentes experimentos. Pode-se observar que os experimentos NoNeurons e TTX apresentam os valores mais próximos de 0 para obliquidade e 3 para curtose. Nas Figs 5.8 e 5.9, as curvas para esses dois experimentos praticamente se sobrepõem quando esses dois índices estatísticos são comparados. Por outro lado, a magnitude dos índices obliquidade e da curtose dos experimentos DIV41 e DIV39 apresentaram valores maiores que 0 ou 3 respectivamente. Isso revela que a distribuição de probabilidade de tais experimentos tende a ser assimétrica em relação a média e é mais pontiaguda que a função distribuição Gaussiana.



(a)



(b)

Figura 5.8: Gráfico comparativo entre os cinco experimentos considerando a sensibilidade do sinal MEA ao índice estatístico obliquidade.

Tabela 5.3: Valores médios da curtose do histograma de amplitude do sinal MEA.

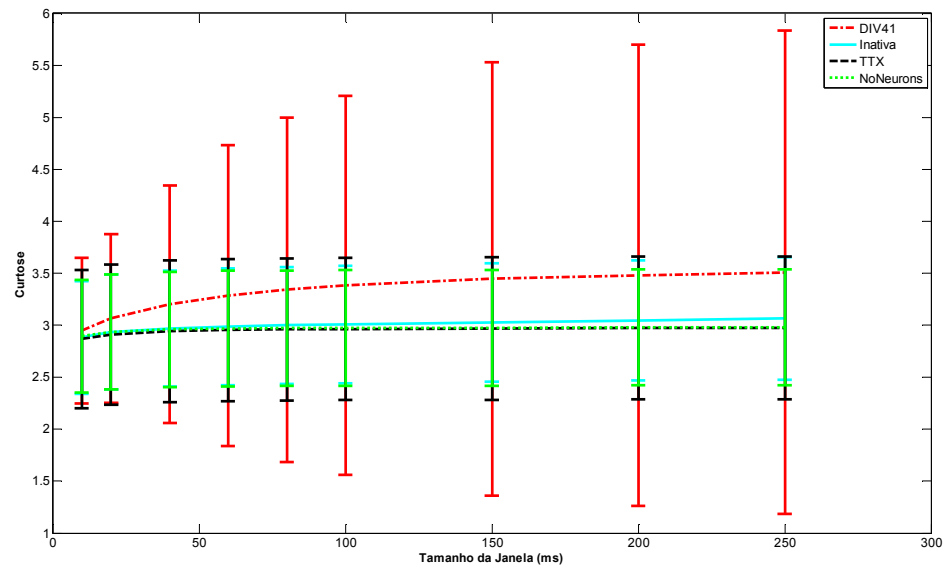
		Curtose									
		Tamanho da Janela (ms)									
		10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	Média	2,9381	3,0816	3,2239	3,3098	3,3757	3,4347	3,558	3,6729	3,7703	5,0686
	Desvio	0,5725	0,6565	0,7903	0,9016	1,0057	1,1052	1,3467	1,5532	1,7657	4,3544
DIV41	Média	2,9484	3,0663	3,2027	3,2868	3,3412	3,3815	3,4456	3,4809	3,5096	3,6152
	Desvio	0,6992	0,8131	1,1424	1,4454	1,6593	1,8226	2,085	2,2193	2,3238	2,6149
Inativa	Média	2,8809	2,9348	2,9708	2,9869	2,998	3,0058	3,0254	3,0455	3,0673	3,7072
	Desvio	0,5406	0,5505	0,5572	0,5603	0,5625	0,5643	0,5697	0,5777	0,5905	2,219
TTX	Média	2,8695	2,9106	2,9401	2,953	2,9602	2,9648	2,9711	2,9744	2,9764	2,9825
	Desvio	0,6642	0,6737	0,6805	0,6835	0,6852	0,6862	0,6877	0,6885	0,6889	0,6903
NoNeurons	Média	2,8954	2,9364	2,9594	2,9674	2,9715	2,974	2,9773	2,979	2,98	2,9831
	Desvio	0,5424	0,55	0,5544	0,5559	0,5566	0,5571	0,5577	0,558	0,5582	0,5588

A obliquidade do experimento Inativa apresentou valores intermediários entre aqueles de cultura ativa e aqueles de experimento de ruído. Já em termos de curtose, o experimento Inativa se assemelhou bastante àqueles de experimento de ruído.

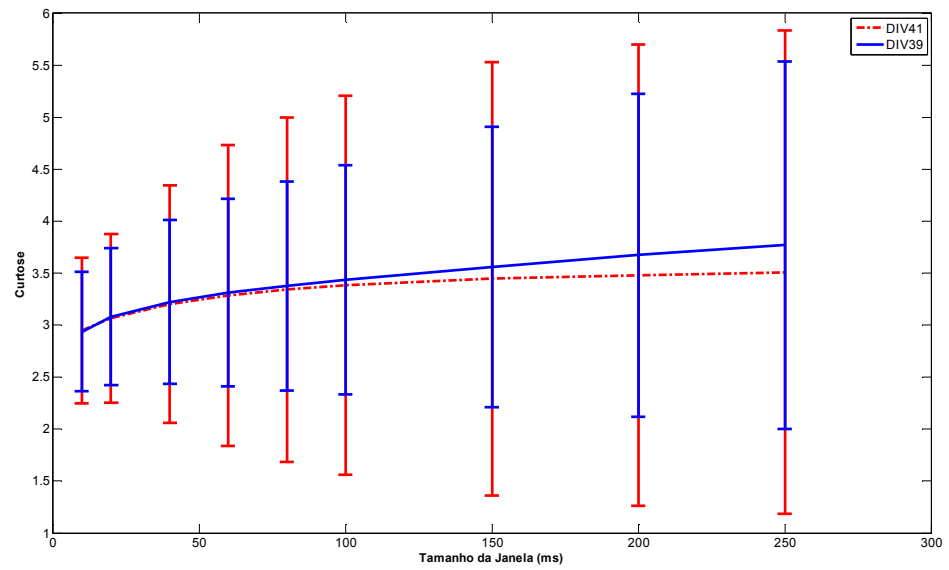
Os experimentos DIV39 e DIV41, ambas culturas ativas, apresentaram curvas de curtose e obliquidade semelhantes entre si. As culturas ativas apresentaram valores negativos de obliquidade. Conforme discutido no Cap. 4, esses resultados indicam a presença de polaridade de eventos monofásicos na forma de onda (BRONZINO et al, 1981). Sabendo que a distinção entre tais experimentos dos demais é a presença de *spikes*, portanto, a obliquidade negativa deve estar associada com a presença de potenciais de ação ao longo do sinal de cultura ativa.

Já para os experimentos de cultura ativa o parâmetro curtose foi, na maior parte do tempo, diferente de 3. Conforme discutido no Cap. 4, esse índice reflete a presença de transientes na forma de onda (BRONZINO et al, 1981). Tais eventos transitórios estão novamente associados com a presença de potenciais de ação ao longo do sinal sob análise.

Assim, pode-se concluir que os índices obliquidade e curtose são sensíveis aos sinais MEA. Tais índices podem ser usados para distinguir entre trechos de sinais que contém essencialmente ruído e trechos que contém além de ruído, potenciais de ação de um neurônio ou conjunto de neurônios.



(a)



(b)

Figura 5.9: Valores médios para o índice estatístico curtose para os cinco experimentos de sinais MEA.

5.4 Teste para análise da estacionariedade dos dados

Os resultados da investigação de estacionariedade estão sintetizados graficamente na Fig 5.10. Os mesmos resultados são apresentados na Tab. 5.4. Embora todos os resultados tenham sido corrigidos para o erro Tipo I (5.3) devido a falsas rejeições da hipótese sendo testada, erros do Tipo II devido a falsas aceitações dessa hipótese ainda podem existir. Além disso, estes resultados baseados em testes empíricos são necessários, mas não suficientes, para que os segmentos de amostras do sinal MEA possam ser modelados como a saída de um tipo particular de processo estocástico estacionário. Por estas razões, as porcentagens estimadas mostradas na Fig. 5.10 representam os limites empíricos inferiores das “verdadeiras” porcentagens correspondentes.

$$\begin{aligned} \text{Rejeições após correção (\%)} &= \text{Rejeições (\%)} - \alpha \cdot \text{Aceitações (\%)} \\ \text{Aceitações (\%)} &= 100\% - \text{Rejeições (\%)} \end{aligned} \quad (5.3)$$

O teste estatístico usado está descrito na Seção 4.5.1 que compara a densidade espectral de potência de dois segmentos de sinal MEA adjacentes. Se for identificada uma mudança estatisticamente significativa, tais segmentos de amostras MEA não serão considerados estacionários. Os resultados estão apresentados em porcentagem de segmentos não-estacionários (PSNE). O nível de significância usado foi de $\alpha = 5\%$.

Os resultados da análise de estacionariedade dos sinais MEA dependeram fortemente dos tamanhos das janelas temporais. Conforme o tamanho da janela aumenta, a porcentagem de segmentos não-estacionários (PSNE) também aumenta.

O experimento NoNeurons, ruído de instrumentação, apresentou a menor PSNE, bem como o menor desvio-padrão para PSNE, dentre todos os conjuntos de dados. Esse experimento consiste essencialmente de ruído de instrumentação, ou seja, é um ruído branco, que é um processo estocástico estacionário.

Por outro lado, os experimentos que apresentaram maior contraste com o experimento NoNeurons foram aqueles de cultura ativa (DIV39 e DIV41). DIV39 foi não-estacionário por até 53% do tempo com um desvio-padrão de 13%. Quanto maior o desvio-padrão maior a diferença entre a atividade elétrica entre os canais da MEA, e reciprocamente, quando o desvio-padrão é menor, indica que o padrão da atividade neuronal entre os canais são mais semelhantes entre si. Sabendo que a diferença entre os experimentos NoNeurons e Cultura Ativa é a presença de *spikes* e *bursts*, então o aumento

da PSNE em registros de culturas ativas deve estar associado com a presença de tais eventos fisiológicos.

Tabela 5.4: PSNE estimadas de segmentos MEA de várias durações de tempo para cada um dos cinco conjuntos de experimentos que não podem ser modelados como estacionários no sentido-amplo.

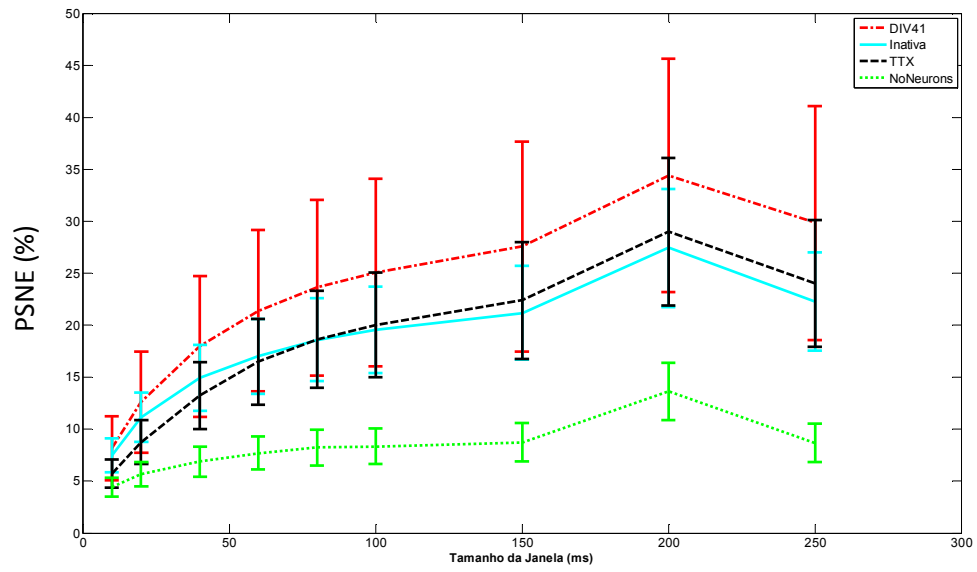
		PSNE - Rejeições em (%) depois da correção para o erro Tipo I										
		Tamanho da Janela (ms)										
		10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000	Média
DIV39	Média	11,40	17,17	23,19	26,89	29,44	31,45	34,73	42,51	38,75	52,92	30,85
	Desvio	3,12	4,34	5,33	5,95	6,46	6,91	7,69	9,00	8,83	13,05	7,07
DIV41	Média	8,19	12,62	17,96	21,39	23,62	25,07	27,58	34,41	29,85	35,32	23,60
	Desvio	3,06	4,88	6,76	7,75	8,45	9,00	10,08	11,24	11,25	13,82	8,63
Inativa	Média	7,50	11,14	14,95	17,00	18,61	19,56	21,19	27,44	22,27	27,61	18,73
	Desvio	1,61	2,37	3,16	3,59	3,97	4,16	4,51	5,66	4,73	5,91	3,97
TTX	Média	5,72	8,75	13,2	16,49	18,67	20,03	22,39	28,99	24,03	25,73	18,40
	Desvio	1,36	2,11	3,23	4,13	4,66	5,01	5,61	7,13	6,08	6,64	4,60
NoNeurons	Média	4,43	5,69	6,88	7,69	8,25	8,34	8,75	13,62	8,68	8,91	8,12
	Desvio	0,90	1,18	1,44	1,59	1,72	1,72	1,85	2,78	1,83	2,10	1,71

Já os registros TTX e de cultura Inativa apresentaram curvas de PSNE intermediárias entre aquelas de cultura ativa e de ruído de instrumentação. Observe que as curvas para os experimentos TTX e Inativa são semelhantes (repare os resultados na Tab. 5.4). Espera-se que a curva de PSNE do experimento TTX seja mais próxima daquela do experimento NoNeurons, enquanto que a curva de PSNE do experimento Inativa seja mais semelhante daquelas de culturas ativas. No entanto, tais curvas inverteram seus comportamentos a partir da janela de tempo de comprimento 80ms. Portanto, pode-se afirmar que a densidade espectral de potência avaliada pelo teste estatístico MRT não distinguiu corretamente entre esses experimentos para janelas maiores que 80ms.

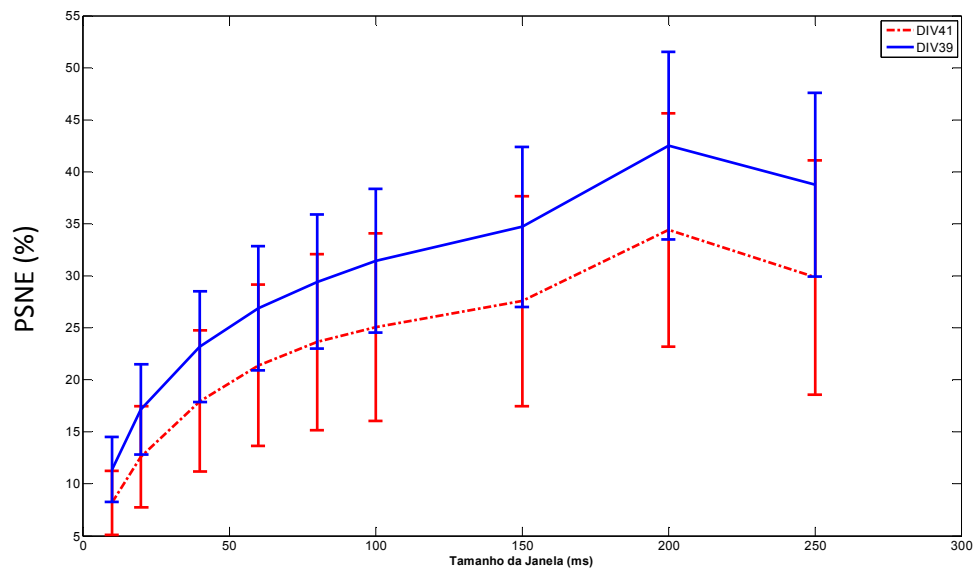
Assim, a melhor janela temporal para distinguir entre os cinco experimentos usando a densidade espectral de potência é de 40ms. Janelas de tamanho inferior não conseguem detectar mudanças estatisticamente significantes nos sinais de cultura ativa. A escolha de uma janela ótima para a análise de dados MEA é importante na aplicação de neuroimplantes para monitorar constantemente a atividade cerebral.

Outro aspecto importante da análise de não-estacionariedades em sinais MEA mostra que os experimentos NoNeurons e TTX possuem diferenças significativas nas PSNEs. A literatura trata esses registros como ruído de instrumentação e biológico respectivamente, ou seja, eles não possuem informação de *spikes* e *bursts*. A ausência da atividade de *spikes* e *bursts* nestes dois experimentos pode ser observada na Seção 5.2 que utilizou a detecção clássica de *spikes*. Por conseguinte, as diferenças entre as PSNEs desses conjuntos de dados devem estar associadas ao ruído de membrana discutido no Capítulo 3, tais como as oscilações sublimiáres do potencial de membrana dos neurônios que formam a rede neuronal devido ao fluxo iônico passivo através da membrana.

Na Fig. 5.10(b) foram comparados dois experimentos de culturas ativas de idades semelhantes. A cultura DIV39 revelou que sua PSNE é mais elevada do que a PSNE da cultura DIV41. Esse resultado deve ser devido a maior quantidade de atividade de *spikes* e *bursts* no experimento DIV39, uma vez que essa cultura é mais jovem que aquela em 2 dias. Este resultado também foi demonstrado na análise clássica de *spikes* na Tab. 5.1. Por outro lado, a atividade menos intensa do experimento DIV41 em relação ao experimento DIV39 pode ser devido ao equilíbrio entre a quantidade de sinapses inibitórias e excitatórias na cultura DIV41. É importante ressaltar que culturas mais jovens apresentam uma quantidade maior de sinapses excitatórias do que de sinapses inibitórias, gerando uma atividade de *spikes* e *bursts* mais intensa.



(a)



(b)

Figura 5.10: Porcentagem estimada dos segmentos MEA não-estacionários (PSNE) dos cinco conjuntos de experimentos, teste MRT com critério baseado na densidade espectral de potência.

5.5 Teste JB para Gaussianidade

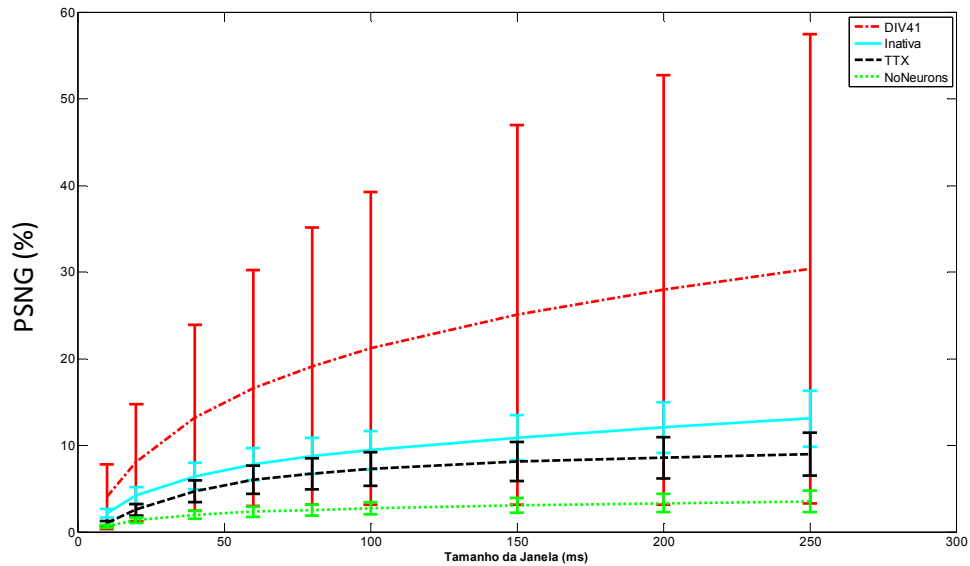
O teste de hipótese Jarque-Bera foi usado neste estudo para investigar o grau de Gaussianidade de cinco experimentos MEA. Os resultados estão sintetizados na Tab. 5.5 e representados graficamente na Fig 5.11. Os resultados estão apresentados como porcentagem de segmentos não-Gaussianos (PSNG) e foram corrigidos para o erro Tipo I devido a falsas rejeições da hipótese nula, mas o erro Tipo II devido a falsas aceitações da hipótese nula ainda podem existir. Conforme discutido anteriormente, resultados baseados em testes empíricos são necessários, mas não suficientes, para que os segmentos de amostras de sinais MEA possam ser modelados como a saída de um tipo particular de processo aleatório Gaussiano. Novamente, as porcentagens estimadas na Tab. 5.5 representam os limites empíricos inferiores das “verdadeiras” porcentagens correspondentes. O nível de significância adotado para este teste também foi $\alpha = 5\%$.

Tabela 5.5: PSNG estimadas através do teste JB para Gaussianidade das amostras.

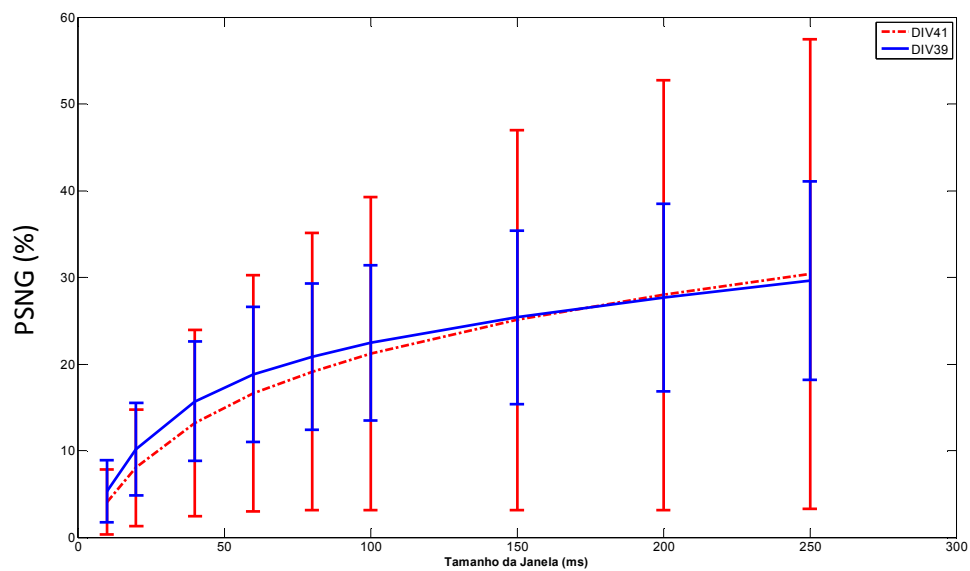
		PSNG – Rejeições em (%) depois da correção para o erro Tipo I										
		Tamanho da Janela (ms)										
		10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000	Média
DIV39	Média	5,32	10,16	15,69	18,81	20,83	22,46	25,38	27,67	29,59	49,76	22,57
	Desvio	3,56	5,33	6,89	7,77	8,44	8,96	10,01	10,82	11,45	18,50	9,17
DIV41	Média	4,09	8,03	13,18	16,62	19,12	21,21	25,08	27,96	30,38	44,21	20,99
	Desvio	3,76	6,71	10,74	13,63	15,98	18,03	21,91	24,79	27,06	36,80	17,94
Inativa	Média	2,16	4,22	6,45	7,81	8,76	9,42	10,89	12,08	13,08	23,82	9,87
	Desvio	0,51	0,97	1,51	1,85	2,07	2,25	2,57	2,94	3,21	6,94	2,48
TTX	Média	1,05	2,59	4,72	6,02	6,75	7,27	8,13	8,57	8,97	10,94	6,50
	Desvio	0,27	0,67	1,25	1,61	1,81	1,98	2,24	2,39	2,47	3,15	1,78
NoNeurons	Média	0,65	1,34	1,99	2,34	2,54	2,77	3,08	3,33	3,54	5,79	2,74
	Desvio	0,16	0,32	0,47	0,57	0,65	0,72	0,87	1,05	1,23	3,91	1,00

Os resultados da análise de Gaussianidade dos sinais MEA dependeram fortemente dos tamanhos das janelas de tempo apenas para os sinais provenientes de culturas ativas. Conforme o tamanho da janela aumenta, a porcentagem de segmentos não-Gaussianos (PSNG) também aumenta. Contudo, para os experimentos que contém essencialmente

ruído de medida, em especial, o experimento NoNeurons, a relação entre o tamanho da janela de dados e a PSNG manteve-se aproximadamente constante.



(a)



(b)

Figura 5.11: Porcentagem estimada dos segmentos MEA não-Gaussianos (PSNG) dos cinco conjuntos de experimentos.

O experimento NoNeurons, ruído de instrumentação, apresentou a menor PSNG, bem como o menor desvio-padrão para PSNG, dentre todos os conjuntos de dados. Conforme discutido anteriormente, esse experimento consiste essencialmente de ruído de instrumentação, ou seja, é um ruído branco, que é um processo estocástico estacionário e também Gaussiano.

Por outro lado, os experimentos que apresentaram maior contraste com o experimento NoNeurons foram aqueles de cultura ativa (DIV39 e DIV41). DIV39 foi não-Gaussiano por até 50% do tempo com desvio-padrão de 19% e DIV41 foi não-Gaussiano por até 44% do tempo com desvio-padrão de 37%. Observe que a porcentagem de não-Gaussianidades no experimento DIV41 varia bastante de um canal para o outro. Sabendo que a diferença entre os experimentos NoNeurons e Cultura Ativa são os *spikes* e *bursts*, o aumento da PSNG em registros de culturas ativas deve estar associado com a presença de tais eventos fisiológicos.

Já os registros TTX e de cultura Inativa apresentaram curvas de PSNG intermediárias entre aquelas de cultura ativa e de ruído de instrumentação. Espera-se que a curva de PSNG do experimento TTX seja mais próxima daquela do experimento NoNeurons, enquanto que a curva de PSNG do experimento Inativa seja mais semelhante daquelas de culturas ativas. Ao contrário dos resultados obtidos com a densidade espectral de potência e o teste estatístico MRT, as curvas de PSNG para os dados de TTX e cultura Inativa não se interceptaram para nenhum tamanho de janela de dados. Isso possibilita a escolha de qualquer tamanho de janela para que os experimentos sejam avaliados por meio da estatística JB. Considerando que a estatística JB se torna mais representativa dos dados quando a quantidade de amostras para seu cálculo é maior, então não há restrições para que se escolha uma janela de tempo de comprimento maior para esta análise.

Outro aspecto importante da análise de não-Gaussianidades em sinais MEA mostra que os experimentos NoNeurons e TTX possuem diferenças significativas nas PSNGs. Conforme discutido para a análise espectral, esses experimentos não possuem informação de *spikes* e *bursts*. Analogamente à análise obtida pelo teste MRT, as diferenças entre as PSNGs desses conjuntos de dados também devem estar associadas às oscilações sublimiares do potencial de membrana dos neurônios que formam a rede neuronal.

Na Fig. 5.11(b) foram comparados dois experimentos de cultura ativa de idades semelhantes. Em contraste à análise espectral, as culturas ativas não apresentaram diferenças significativas para o grau de não-Gaussianidade. Isso pode indicar que a

estatística JB não deve ser usada para distinguir entre experimentos de culturas ativas, embora possa ser um ótimo indicador para sinalizar a ausência ou a presença de atividade neuronal significativa.

5.6 Correlações

A fim de avaliar a relação existente entre os resultados obtidos por meio do *software Spike Manager* e aqueles obtidos através da nova abordagem proposta nesta dissertação, calculamos a correlação entre o intervalo entre *spikes* (ISI), intervalo entre *bursts* (IBI) e a taxa média de disparo (MFR) obtidos na análise de *spikes* com os seguintes resultados: PSNE e PSNG. Como o *Spike Manager* somente forneceu resultados não nulos para as culturas ativas e Inativa, não foi possível fazer a mesma comparação para os resultados obtidos com os experimentos de ruído biológico e de instrumentação.

A correlação foi calculada considerando o ISI, o IBI e a taxa MFR para cada canal da MEA, assim como as porcentagens obtidas para cada eletrodo em cada teste estatístico. Somente os valores significantes para a correlação ($p\text{-valor} < 0,05$) foram expressos nas Tabelas 5.6 a 5.12 .

Tabela 5.6: Correlação entre ISI e PSNE.

	10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	-0,4065	-0,3836	-0,3537	-0,3677	-0,3779	-0,3956	-0,3969	-0,4296	-0,4523	-0,5175
DIV41	-0,6077	-0,6086	-0,5721	-0,5326	-0,5201	-0,4924	-0,4830	-0,4911	-0,4820	-0,5657
Inativa	-0,6378	-0,5924	-0,5480	-0,5435	-0,5312	-0,5021	-0,4846	-0,5430	-0,5270	-0,6587

Tabela 5.7: Correlação entre ISI e PSNG.

	10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	-0,3219	-0,3324	-0,3448	-0,3511	-0,3570	-0,3716	-0,3890	-0,4032	-0,4161	-0,5859
DIV41	-0,5664	-0,5673	-0,5579	-0,5542	-0,5511	-0,5537	-0,5576	-0,5621	-0,5677	-0,6395
Inativa	-0,2565	0,6710	0,7232	0,7070	0,6773	0,6441	0,5806	0,5429	0,5211	0,4023

Tabela 5.8: Correlação entre IBI e PSNE.

	10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	-0,5964	-0,5023	-0,4146	-0,4041	-0,3974	-0,4211	-0,4549	-0,4224	-0,4849	-0,5691
DIV41	-0,6927	-0,6793	-0,6335	-0,5967	-0,5890	-0,5706	-0,5738	-0,5735	-0,5847	-0,6484
Inativa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-0,3473

Tabela 5.9: Correlação entre IBI e PSNG.

	10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	-0,5977	-0,5758	-0,5452	-0,5363	-0,5206	-0,5235	-0,5251	-0,5276	-0,5206	-0,6278
DIV41	-0,6610	-0,6519	-0,6391	-0,6346	-0,6284	-0,6260	-0,6199	-0,6157	-0,6115	-0,6223
Inativa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabela 5.10: Correlação entre MFR e PSNE.

	10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	0,7780	0,6868	0,5954	0,5549	0,5359	0,5228	0,5375	0,4853	0,5457	0,6164
DIV41	0,6067	0,6112	0,6543	0,6826	0,6991	0,7138	0,7283	0,7222	0,7469	0,7179

Tabela 5.11: Correlação entre MFR e PSNG.

	10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	0,8670	0,8260	0,7790	0,7547	0,7428	0,7372	0,7247	0,7125	0,7027	0,6757
DIV41	0,6256	0,6187	0,6348	0,6446	0,6417	0,6376	0,6226	0,6071	0,5940	0,4863

Tabela 5.12: Correlação entre PSNE e PSNG.

	10	20	40	60	80	100	150	200	250	1000
DIV39	0,9334	0,9140	0,8666	0,8378	0,8247	0,8354	0,8256	0,8085	0,8346	0,8924
DIV41	0,9614	0,9606	0,9484	0,9133	0,9015	0,8767	0,8558	0,8230	0,8209	0,7740
Inativa	0,5827	-0,4757	-0,5090	-0,4458	-0,3469	—	—	—	—	—
TTX	0,8806	0,9625	0,9630	0,9611	0,9662	0,9653	0,9631	0,9225	0,9326	0,8596
NoNe	0,8368	0,9088	0,9092	0,8417	0,8326	0,7443	0,6794	0,6282	0,5484	—

As distribuições ISI e IBI podem ser aproximadas por uma distribuição de Poisson (CHIAPPALONE et al, 2006). No entanto, para o cálculo da correlação de Pearson exige-se que as variáveis envolvidas sejam Gaussianas. Neste caso, os resultados encontrados do cálculo da correlação podem ser tendenciosos. Apesar disso, alguns resultados foram considerados relevantes e estão destacados em negrito nas Tabs. 5.6 a 5.12.

Pode ser observado das Tabs. 5.6 a 5.12 que as correlações entre ISI e IBI em relação às variáveis PSNE e PSNG foram maiores (em módulo) para janelas temporais maiores. Além disso, essas correlações foram em geral negativas, indicando uma relação inversamente proporcional entre as variáveis correlacionadas. Por exemplo, um valor relevante encontrado para a correlação entre ISI e PSNE pode ser visto para a janela de tempo de 1s para a cultura Inativa que é de -0,66. Em geral, as correlações entre IBI e as variáveis propostas nesta dissertação foram mais elevadas do que as correlações que envolvem a variável ISI. Isso pode ser um indicativo de que a nova abordagem proposta contém mais informação de *bursts* do que *spikes*. Além disso, não foram encontrados valores significantes para várias correlações efetuadas para a cultura Inativa.

Dos resultados expressos nas Tabs. 5.10 a 5.12 conclui-se que os resultados obtidos com a nova abordagem deste projeto agregam alguma informação de MFR da detecção clássica de *spikes*. Os melhores resultados foram obtidos para a estatística PSNG para janelas de tempo menores, por exemplo 10ms. Dessa forma, conclui-se que a estatística porcentagem de segmentos não Gaussianos (PSNG) pode ser considerada um ótimo indicador da atividade neuronal visto que também contém informações provenientes da detecção de *spikes*.

5.7 Considerações finais

Este capítulo sintetiza os resultados obtidos com o processamento do sinal bruto MEA e confronta-os com aqueles obtidos pela detecção clássica de *spikes*. As técnicas matemáticas geralmente exigem que os dados a serem investigados sejam estacionários e Gaussianos. Devido a essa exigência, surgiu a necessidade de fazer tal análise. Em geral, testes estatísticos não-paramétricos, como o teste qui-quadrado ou o teste de Kolmogorov-Smirnov, são frequentemente empregados para modelar as distribuições de amplitude e de frequência dos dados. Para sinais MEA, esses testes não são satisfatórios. Daí surgiu a necessidade de buscar outros testes estatísticos para estacionariedade e Gaussianidade como o teste da Razão Média e o teste Jarque-Bera respectivamente.

Investigando-se as medidas do histograma de amplitude de terceira e quarta ordem, pode ser observado que os experimentos de cultura ativa desviam seus valores de obliquidade e curtose de zero e 3 respectivamente, indicando que suas pdf's tendem a ser assimétricas em relação a média e mais pontiagudas que a função distribuição Gaussiana. Já os experimentos de ruído (TTX e NoNeurons) tem um comportamento oposto daquele das culturas ativas e o experimento Inativa teve um comportamento intermediário entre aqueles de cultura ativa e aqueles de ruído.

Os resultados da investigação de estacionariedade e Gaussianidade estão sintetizados graficamente nas Figs 5.10 e 5.11. Os mesmos resultados são apresentados na Tabs. 5.4 e 5.5 respectivamente. Embora todos os resultados tenham sido corrigidos para o erro Tipo I devido a falsas rejeições da hipótese sendo testada, erros do Tipo II devido a falsas aceitações dessa hipótese ainda podem existir. Além disso, estes resultados baseados em testes empíricos são necessários, mas não suficientes, para que os segmentos de amostras do sinal MEA possam ser modelados como a saída de um tipo particular de processo estocástico estacionário e Gaussiano. Por estas razões, as porcentagens estimadas mostradas nas Figs. 5.10 e 5.11 representam os limites empíricos inferiores das “verdadeiras” porcentagens correspondentes.

Os testes estatísticos MR e JB mostraram que o experimento NoNeurons é um processo estacionário e Gaussiano. Esse resultado era esperado uma vez que este experimento é somente ruído devido aos amplificadores MEA. Para as culturas ativas DIV39 e DIV41, observa-se que a análise espectral consegue distingui-las. Em contraste, as culturas ativas não apresentaram diferenças significativas para o grau de não-Gaussianidade. Já os registros TTX e Inativa apresentaram curvas de PSNE e PSNG intermediárias entre aquelas de cultura ativa e de ruído de instrumentação. No entanto, a análise espectral não conseguiu distinguir corretamente entre esses dois experimentos.

Para avaliar se há alguma relação entre a abordagem proposta nesta dissertação e a análise clássica de *spikes*, foi calculada a correlação entre os índices PSNE e PSNG com os quantificadores clássicos ISI, IBI e MRT. Os valores encontrados foram satisfatórios para uma análise inicial, indicando que as variáveis propostas agregam informação de *spikes* e de *bursts*, sendo que a segunda informação parece ser mais acentuada nesta nova abordagem.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

6.1 Conclusões

A neurociência – disciplina multidisciplinar que se dedica ao estudo do sistema nervoso – somente se tornou reconhecida nas últimas décadas e atualmente é cada vez maior a contribuição de engenheiros eletrônicos em prover suporte às pesquisas dessa área com tecnologias avançadas.

Métodos de instrumentação convencionais (como o *voltage* ou *patch-clamp*) permitem registrar (ou estimular) sinais neuronais somente de poucas células de forma invasiva. As Matrizes Multi-Eletrodo, pelo contrário, permitem registrar sinais neuronais extracelulares simultaneamente de centenas de eletrodos não invasivos. A MEA é uma nova ferramenta que vem sendo largamente difundida nos laboratórios de eletrofisiologia para o estudo dos processos neuronais associados ao comportamento coletivo de neurônios. A MEA permitirá o estudo de diversos mecanismos biológicos associados à dinâmica neuronal, tais como plasticidade, conectividade, dentre outros.

A análise clássica de sinais MEA é realizada através de algoritmos detectores de *spikes* e *bursts*, e então, estatísticas básicas são utilizadas para quantificar o padrão da atividade registrada. Todavia, há na literatura uma carência de técnicas matemáticas para o processamento desses sinais, uma vez que a quantidade de dados gerados em medidas MEA é cada vez maior devido ao aumento do número de eletrodos nesses dispositivos, bem como o aumento da frequência de amostragem usada durante o registro.

O ruído – perturbações aleatórias de sinais – representa um problema fundamental para o processamento de informações e afeta todos os aspectos do funcionamento do sistema nervoso. No entanto, a natureza, o significado e o impacto do ruído biológico no sistema nervoso só foram tratados de forma quantitativa recentemente.

Uma das maiores fontes de ruído dentro das redes neuronais são os canais iônicos voltagem-dependentes que ficam embebidos na membrana neuronal. Estes canais são macromoléculas que estão sujeitos a mudanças aleatórias de seus estados conformacionais

devido a agitação térmica, e quando estas mudanças ocorrem entre um estado de condutância e outro de não condutância, o canal age com uma fonte microscópica de corrente de ruído que é injetada dentro da célula (HILLE, 1992; DeFELICE, 1981).

A corrente de ruído pode mudar o comportamento da atividade de *spikes* do neurônio, afetando a distribuição das respostas de latência, a propagação de *spikes* nas estruturas dendríticas ramificadas, a geração de potenciais de ação espontâneos, e a confiabilidade e precisão do sincronismo dos *spikes*. Além dos efeitos sobre os potenciais de ação, o ruído de canal também causa flutuações sublimiâres no potencial de membrana (STEINMETZ et al, 2000).

Os ruídos dominantes no *set-up* experimental são: ruído de amplificação, ruído devido ao eletrodo, ruído de selo, fontes externas de ruído, ruído de digitalização, *aliasing* e filtragem. As formas mais comuns de interferência externa em registros extracelulares são a frequência da rede elétrica (50 ou 60 Hz e harmônicos) de fontes de alimentação, luzes fluorescentes, motores que estão próximos aos locais de medidas, elevadores, estações de rádio e televisão e vídeos monitores de computadores. Na maioria dos casos, tais fontes de ruído podem ser controladas através de aterramento, blindagem e filtragem.

Nesta dissertação, o banco de dados investigados constitui-se de cinco experimentos MEA, sendo dois deles de cultura ativa (DIV39 e DIV41), um de cultura Inativa, um de ruído biológico TTX e por último, um experimento de ruído de instrumentação NoNeurons. Inicialmente, o conjunto de registros MEA foi analisado pelas estatísticas básicas de primeira a quarta ordem. Os índices estatísticos média, variância, obliquidade e curtose foram usados como ferramentas para inferir sobre a função densidade de probabilidade desses sinais. Além disso, dois testes estatísticos foram investigados para analisar o grau de estacionariedade e Gaussianidade dos dados MEA. Em geral, testes estatísticos não-paramétricos, como o teste qui-quadrado ou o teste de Kolmogorov-Smirnov, são frequentemente empregados para modelar as distribuições de amplitude e de frequência dos dados. Para sinais MEA, esses testes não são satisfatórios. Daí surgiu a necessidade de buscar outros testes estatísticos para estacionariedade e Gaussianidade como o teste da Razão Média e o teste Jarque-Bera respectivamente.

Em síntese, o teste da Razão Média compara a densidade espectral de potência estimada de trechos adjacentes de um sinal. Quando não é possível afirmar que as PSD's são iguais, então, diz-se que o sinal é não-estacionário. O teste *MR* testa a hipótese nula de que a razão média entre as PSD's é 1. O teste usa periodogramas para estimar as

densidades espectrais e devido a remoção das componentes DCs desses periodogramas, o teste fica limitado em detectar mudanças na média do sinal.

Enquanto isso, o teste *JB* testa a hipótese nula de que os dados possuem uma distribuição Gaussiana com média e variância desconhecida. Esse teste assume que as amostras são independentes e identicamente distribuídas. No entanto, essa condição não é muito restritiva porque este teste funciona bem para séries de dados financeiros, onde não se pode assegurar a independência dos dados. Alguns trabalhos da literatura relatam uma limitação do teste *JB* que é sua sensibilidade à presença de *outliers* na distribuição de probabilidade. No contexto da MEA, tais *outliers* podem estar associados com a presença de *spikes* no sinal.

A análise de *spikes* mostra que os experimentos TTX e NoNeurons apresentam pouquíssimos *spikes* e *bursts*, já que o TTX inibe os potenciais de ação, o que caracteriza os dois experimentos como tendo comportamentos semelhantes. Enquanto isso, a cultura ativa DIV41 apresenta atividade desorganizada e reduzida caracterizando uma possível morte celular e a cultura DIV39 apresenta elevado sincronismo da atividade neuronal. Já a cultura Inativa apresenta padrões de atividade desorganizada em quase todos os eletrodos da MEA, caracterizando uma cultura cujos neurônios iniciam sua atividade espontânea isoladamente na rede, não evidenciando nenhum tipo de sincronismo (BLANKENSHIP; FELLER, 2010).

Da investigação das estatísticas média, variância, obliquidade e curtose, pode ser observado que a média e a variância não revelam um padrão entre os diferentes experimentos MEA. Já os índices obliquidade e curtose revelaram uma padronização entre os diferentes registros, sendo que o experimento NoNeurons é usado como controle nas análises efetuadas. Os experimentos de cultura ativa desviam seus valores de obliquidade e curtose de zero e 3 respectivamente, indicando que suas pdf's tendem a ser assimétricas em relação a média e mais pontiagudas que a função distribuição Gaussiana. Já os experimentos de ruído (TTX e NoNeurons) tem um comportamento oposto daquele das culturas ativas e o experimento Inativa teve um comportamento intermediário entre aqueles de cultura ativa e aqueles de ruído.

Os resultados da investigação de estacionariedade e Gaussianidade estão sintetizados graficamente nas Figs 5.10 e 5.11. Os mesmos resultados são apresentados na Tabs. 5.4 e 5.5 respectivamente. Embora todos os resultados tenham sido corrigidos para o erro Tipo I devido a falsas rejeições da hipótese sendo testada, erros do Tipo II devido a

falsas aceitações dessa hipótese ainda podem existir. Além disso, estes resultados baseados em testes empíricos são necessários, mas não suficientes, para que os segmentos de amostras do sinal MEA possam ser modelados como a saída de um tipo particular de processo estocástico estacionário e Gaussiano. Por estas razões, as porcentagens estimadas mostradas nas Figs. 5.10 e 5.11 representam os limites empíricos inferiores das “verdadeiras” porcentagens correspondentes.

Os testes estatísticos *MR* e *JB* mostraram que o experimento NoNeurons é um processo estacionário e Gaussiano. Esse resultado era esperado uma vez que este experimento é somente ruído devido aos amplificadores MEA. Dessa forma, esse registro constitui o controle da análise de estacionariedade e Gaussianidade. DIV39 e DIV41 apresentaram maior contraste com o experimento NoNeurons. DIV39 foi não-estacionário por até 53% do tempo com um desvio-padrão de 13% e também foi não-Gaussiano por até 50% do tempo com desvio-padrão de 19%. Sabendo que a diferença entre os experimentos NoNeurons e aqueles de cultura ativa são os *spikes* e *bursts*, o aumento da PSNE, bem como o aumento da PSNG em registros de cultura ativa, deve estar associado com a presença de tais eventos fisiológicos.

Quando se compara somente as culturas DIV39 e DIV41, observa-se que a análise espectral revela que a primeira cultura tem uma curva de PSNE mais elevada do que a segunda cultura, indicando que a PSD separa culturas ativas diferentes. Em contraste, as culturas ativas não apresentaram diferenças significativas para o grau de não-Gaussianidade. Isso pode indicar que a estatística *JB* não deve ser usada para distinguir entre experimentos de culturas ativas, embora possa ser um ótimo indicador para sinalizar a ausência ou a presença de atividade neuronal significativa.

Já os registros TTX e Inativa apresentaram curvas de PSNE e PSNG intermediárias entre aquelas de cultura ativa e de ruído de instrumentação. No entanto, a análise espectral não conseguiu distinguir corretamente entre esses dois experimentos, uma vez que as curvas de PSNE inverteram seus comportamentos a partir da janela de comprimento 80 ms. Assim, para a avaliação da densidade espectral dos dados MEA, deve-se usar janelas temporais de até 40 ms, sendo que esta pode ser empregada para detectar mudanças estatisticamente significantes nesses sinais.

Outro aspecto importante da análise de não-estacionariedades e não-Gaussianidades em sinais MEA mostra que os experimentos NoNeurons e TTX apresentam diferenças significativas nas PSNEs e nas PSNGs. A análise clássica de detecção de *spikes* trata esses

registros como ruído de instrumentação e ruído biológico respectivamente, uma vez que não possuem informação de *spikes* e *bursts*. Todavia, os testes *MR* e *JB* revelam que há diferenças entre esses dois tipos de experimentos, que devem estar associadas ao ruído de canal iônico, as oscilações sublimiáres do potencial de membrana dos neurônios e a interferência da atividade sináptica.

Para finalizar a análise de sinais MEA, foi calculada a correlação entre os índices quantificadores PSNE e PSNG propostos nesta dissertação e os quantificadores clássicos da análise de *spikes* e *bursts*: ISI, IBI e MRT. Esses resultados estão expressos nas Tabs. 5.6 a 5.12, e apenas os valores de correlação significativos, ou seja, com $p\text{-valor} < 0,05$, são apresentados. Um problema enfrentado neste procedimento reside no fato que as distribuições ISI e IBI tendem para uma distribuição de Poisson, o que torna os resultados encontrados tendenciosos, uma vez que para o cálculo da correlação de Pearson, exige-se que as variáveis envolvidas sejam Gaussianas. Apesar disso, alguns resultados podem ser considerados relevantes.

As correlações que envolvem ISI e IBI foram maiores para janelas temporais maiores. Além disso, essas correlações foram em geral negativas, indicando uma relação inversamente proporcional entre as variáveis correlacionadas. Por exemplo, um valor relevante encontrado para a correlação entre ISI e PSNE pode ser visto para a janela de tempo de 1s para a cultura Inativa que é de -0,66. Em geral, as correlações entre IBI e as variáveis propostas nesta dissertação foram mais elevadas do que as correlações que envolvem a variável ISI. Além disso, não foram encontrados valores significantes para várias correlações efetuadas para a cultura Inativa.

Já as correlações que envolvem MRT foram maiores para janelas temporais menores. Os melhores resultados envolvendo MRT foram obtidos quando essa variável foi correlacionada com PSNE e com PSNG. Por exemplo, para o experimento DIV39, a correlação entre MRT e PSNE foi de até 0,77 para uma janela de 10ms, e também foi de até 0,86 para a correlação entre MRT e PSNG para a mesma janela temporal.

Com os resultados encontrados para as correlações avaliadas, pode ser verificado que existe uma correspondência entre as informações extraídas pelos quantificadores propostos nesta dissertação com os quantificadores clássicos de sinais MEA encontrados na literatura. Além disso, com nova abordagem proposta é possível quantificar o ruído biológico e experimental inerente ao registro MEA que, no entanto, é ignorado na detecção clássica de *spikes*.

6.2 Trabalhos Futuros

A partir dos resultados encontrados nessa dissertação, algumas propostas podem ser sugeridas como trabalhos futuros:

- Avaliar um banco de dados maior, especialmente com experimentos TTX, Inativa e NoNeurons;
- Avaliar a estacionariedade e Gaussianidade de experimentos ligados ao estudo do crescimento/maturação da cultura;
- Aprofundar o estudo estatístico correlacionando parâmetros JB, MRT, PSNE, PSNG com os quantificadores clássicos IBI e ISI;
- Desenvolver quantificadores confiáveis para, dado um trecho de sinal MEA desconhecido, classificá-lo em ruído instrumental, ruído biológico ou *spike/burst*.

REFERÊNCIAS

- AKAY, M. **Handbook Of Neural Engineering**. New York: IEEE Press, 2007, 662 pgs, 2007.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre/RS: Editora Artes Médicas, 1997.
- BERGER, T. W.; *et al.* Brain-Implantable biomimetic electronics as the next era in neural prosthetics. **Proceedings of the IEEE, Special Issue on Neuroengineering**, v.89, n. 7, 2001.
- BESDOK, E.; YÜKSEL, M.E. Impulsive noise suppression from images with Jarque-Bera test based median filter. **International Journal of Electronics and Communications**, Vol 59, pp. 105-110, 2005.
- BLANKENSHIP, A. G.; FELLER, M. B. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. **Nature Reviews**. Macmillan Publishers Limited. vol. 11, pP. 18-29, 2010.
- BOPPART, S. A.; WHEELER, B. C.; WALLACE, C. S. A flexible perforated microelectrode array for extended neural recordings, **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 39, pp. 37-42, 1992.
- BORKHOLDER, D. A.; BAO, J.; MALUF, N. I.; PERL, E. R.; KOVACS, G. T. Microelectrode arrays for stimulation of neural slice preparations, **Journal of Neuroscience Methods**, v. 77, pp. 61-66, 1997.
- BORRONI, A.; CHEN, F. M.; LeCURSI, N.; GROVER, L. M.; TEYLER, T. J. An integrated multielectrode electrophysiology system, **Jounal of Neuroscience Methods**, v. 36, pp. 177-184, 1991.

- BOVE, M.; GRATTAROLA, M.; VERRESCHI, G. In vitro 2D networks of neurons characterized by processing the signals recorded with a planar microtransducer array, **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 44, pp. 964-977, 1997.
- BOWMAN, K. O.; SHENTON, L. R. Omnibus contours for departures from normality based on c. **Biometrika**, v.62, pp.243-250, 1975.
- BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. The lagrange multiplier test and its applications to model specification in econometrics. **Rev. Econ. Studies**, v. 97, pp. 239-253, 1980.
- BRONZINO, J.D.; KELLY, M.L.; CORDOVA, C.T.; OLEY, N.H.; MORGANE, P.J. Utilization of Amplitude Histograms to Quantify the EEG Effects of Systemic Administration of Morphine in the Chronically Implanted Rat. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, Vol. BME-28, n° 10, pp. 673-678, 1981.
- BYRON, R. P. The restricted Aitken estimation of sets of demand relations. **Econometrica**, v.38, pp.816-830, 1970.
- CHAPIN, J. K. Using multi-neuron population recordings for neural prosthetics. **Nat. Neuroscience**, v. 7, pp. 452-455, 2004.
- CHEN, L.; LUO, W.; DENG, Y.; WANG, Z.; ZENG, S. Characterizing the Complexity of Spontaneous Electrical Signals in Cultured Neuronal Networks Using Approximate Entropy, **IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine**, Vol. 13, N° 3, pp. 405-410, 2009.
- CHIAPPALONE, M. **Acquisition and processing of electrophysiological signals: a new perspective towards brain-machine interface**, 2003, 258 p., Thesis (PhD). University of Genova, Genova, 2003.
- CHIAPPALONE, M.; BOVE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development, **Brain Research**, v.1093, pp. 41-53, 2006.

- CHIAPPALONE, M.; NOVELLINO, A.; VAJDA, I.; VATO, A.; MARTINOIA, S.; VAN PELT, J. Burst detection algorithms for the analysis of spatio-temporal patterns in cortical networks of neurons, **Neurocomputing**, v. 65-66, pp 653 – 662, 2005.
- CHOW, C.; WHITE, J. Spontaneous action potentials due to channel fluctuations, **Biophysics Journal**, v. 71, pp. 3013-3021, 1996.
- CLAY, J. R.; DeFELICE, L. J. Relationship between membrane excitability and single channel open-close kinetics. **Biophysics Journal**, v. 42, pp. 151-157, 1983.
- CORNER, M.A. Spontaneous neuronal burst discharges as dependent and independent variables in the maturation of cerebral cortex tissue cultured in vitro: A review of activity-dependent studies in live ‘model’ systems for the development of intrinsically generated bioelectric slow-wave sleep patterns. **Brain Research Reviews**, vol. 59, n. 1, p. 221-244, 2008.
- COX, D. R.; HINKLEY, D. V. **Theoretical Statistics**, New York: Wiley, 1974.
- D’AGOSTINO, R. B.; PEARSON, E. S. Tests for departure from normality: Empirical results for the distributions of b_2 and $\sqrt{b_1}$. **Biometrika**, v.60, pp. 613-622, 1973.
- DeFELICE, L. J. **Introduction to Membrane Noise**. Plenum Press, New York, 1981.
- DeMARSE, T. B.; WAGENAAR, D. A.; BLAU, A. W.; POTTER, S. M. The neurally controlled animat: biological brains acting with simulated bodies, **Autonomous Robots**, v. 11, pp 305 – 310, 2001.
- DERKSEN & VERVEEN apud STEVENS, C. Inferences about Membrane Properties from Electrical Noise Measurements, **Biophysical Journal**, v.12, pp. 1028-1047, 1972.
- DURAND, D.M.; BIKSON, M. Supression and control of epileptiform activity by electrical stimulation: a review, **Proc. of the IEEE**, vol. 89, n. 7, pp. 1065-1082, 2001.

REFERÊNCIAS

- ELSHABINI-RIAD, A.; BARLOW, F. D. **Thin Film Technology Handbook**, New York: McGraw-Hill, 1998.
- ELUL, R. Gaussian Behavior of the Electroencephalogram: Changes during Performance of Mental Task. **Science**, Vol 164, pp. 328-331, 1969.
- EGERT, U.; SCHLOSSHAUER, B.; FENNRICH, B; NISCH, S. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated microelectrode arrays, **Brain Res. Protoc.**, v. 2, pp. 229-242, 1998.
- EYTAN, D.; MAROM, S. Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons, **The Journal of Neuroscience**, vol.26, n.33, pp. 8465-8476, 2006.
- FAISAL, A. A.; SELEN, L. P. J.; WOLPERT, D. M. Noise in the nervous system. **Nature**, v. 9, pp. 292-303, 2008.
- FREEMAN, W. J. **Neurodynamics: An Exploration In Mesoscopic Brain Dynamics**. Springer-Verlag: Oxford, London, UK, 2000.
- GAUTAM, V., NARAYAN, K.S., Signal and Noise Analysis of Low S/N Data Recorded from MEA. **7th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays**, Reutlingen, Germany, pp. 181-182, 2010.
- GEARY, R. C. Testing for normality. **Biometrika**, v. 34, pp. 209-242, 1947.
- GLASER, E. M.; RUCHKIN, D.S. **Principles Of Neurobiological Signal Analysis**, Academic Press: N York, USA, 471 pp., 1976.
- GODFREY, L. G. Testing for higher order serial correlation in regression equations when the regressors include lagged dependent variables. **Econometrica**, v. 46, pp. 1303-1310, 1978.

REFERÊNCIAS

- GROSS, G. W. Internal dynamics of randomized mammalian network in culture, in **Enabling Technologies for Cultured Neural Networks**, STENGER, D. A. & McKENNA, T. M., Eds. New York: Academic Press, 1994, pp. 277-317.
- GROSS, G. W.; RHOADES, B. K.; JORDAN, R. J. Neuronal networks for biochemical sensing, **Sens. Actuator B-Chem.**, v. 6, pp. 1-8, 1992.
- GROSS, G. W.; WEN, W. Y.; LIN, J. W. Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures, **Journal of Neuroscience Methods**, v. 15, pp. 243-252, 1985.
- GROSS, G. W.; WILLIAMS, A. N.; LUCAS, J. H. Recording of spontaneous activity with photoetched microelectrode surfaces from mouse spinal neurons in culture, **Journal of Neuroscience Methods**, v. 5, pp. 13-22, 1982.
- HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**, Sinauer, Sunderland, MA, 1992.
- HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its applications to conduction and excitation in nerve. **Journal of Physiology**, 117, pp. 500 – 544, 1952.
- HOOGE apud STEVENS, C. Inferences about Membrane Properties from Electrical Noise Measurements, **Biophysical Journal**, v.12, pp. 1028-1047, 1972.
- HOOGE & GAAL apud STEVENS, C. Inferences about Membrane Properties from Electrical Noise Measurements, **Biophysical Journal**, v.12, pp. 1028-1047, 1972.
- HORIKAWA, Y. Noise effects on spike propagation in the stochastic Hodgkin-Huxley models, **Biol. Cybern.**, v. 66, pp. 19-25, 1991.
- HORIKAWA, Y. Simulation study on effects of channel noise on differential conduction at an axon branch. **Biophysics Journal**, v. 65, pp. 680-686, 1993.

- HUAI-YUAN, C.; TZU-YING, K.; BAOWEN, C.; SHAO-WEI, L.; CHUAN-CHIN, C.; WEILEUN, F. Development of the three dimensional multi-electrode array for neural recording. **The 13th International conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems**, Korea, June 2005.
- JARQUE, C.M.; BERA, A.K. A test for Normality of Observations and Regression Residuals. **International Statistical Review**, Vol 55, no 2, pp. 163-172, 1987.
- JIMBO, Y; ROBINSON, H. P. C; KAWANA, A. Strengthening of synchronized activity by tetanic stimulation in cortical cultures: application of planar electrode arrays. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 45, pp 1297-1304, 1998.
- JIMBO, Y.; TATENO, Y.; ROBINSON, H. P. C. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation on depression in networks of cortical neurons, **Biophysics Journal**, v. 76, pp. 670-678, 1999.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**, 4th ed.: McGraw-Hill, 2000.
- KATZ & MILEDI apud STEVENS, C. Inferences about Membrane Properties from Electrical Noise Measurements, **Biophysical Journal**, v.12, pp. 1028-1047, 1972.
- KAWANA, Y.; IINO, M.; HORIUTI, K.; MATSUMURA, N.; OHIA, T.; MATSUI, K.; ENDO, M. Acceleration in calcium-induced calcium release in the biopsied muscle fibers from patients with malignant hyperthermia, **Biomed. Res.**, v.13, pp. 287–297, 1992.
- KAY, S. M. **Fundamentals of Statistical Signal Processing: Detection Theory**, v. I, Prentice Hall, 1993.
- KENDALL, M. G.; STUART, A. **The Advanced Theory of Statistic**, v. 1, London: Griffin, 1969.

- KIM, K. H.; KIM, S. J. Neural spike sorting under nearly 0-dB signal-to-noise ratio using nonlinear energy operator and artificial neural-network classifier. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 47, n° 10, pp. 1406-1411, 2000.
- KIM, S.; MCNAMES, J. Automatic spike detection based on adaptive template matching for extracellular neural recordings, **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 165, pp. 165-174, 2007.
- KRAUSE, M.; WHITSON, J.; *et al.* Accelerating Electrophysiology using higher-throughput multielectrode array. **Recent Advances in Network electrophysiology using multi-electrode arrays**. Convention Center, New Orleans, LA, Nov. 2003.
- KUBO apud STEVENS, C. Inferences about Membrane Properties from Electrical Noise Measurements, **Biophysical Journal**, v.12, pp. 1028-1047, 1972.
- LATHI, B. P. **Modern Digital and Analog Communication Systems**, 3^a ed., Oxford University Press, 1998.
- LECAR, H.; NOSSAL, R. Theory of threshold fluctuations in nerves. I. Relationships between electrical noise and fluctuations in axon firing, **Biophysics Journal**, v.11, pp. 1048-1067, 1971a.
- LECAR, H.; NOSSAL, R. Theory of threshold fluctuations in nerves. II. Analysis of various sources of membrane noise. **Biophysics Journal**, v. 11, pp. 1068-1084, 1971b.
- LEON-GARCIA, A. **Probability and Random Processes for Electrical Engineering**, 2^a edição, Editora: Addison-Wesley Publishing Company, Inc.; 1994.
- LIANG, Z.; WEI, J.; ZHAO, J.; LIU, H.; LI, B.; SHEN, J.; ZHENG, C. The Statistical Meaning of Kurtosis and Its New Application to Identification of Persons Based on Seismic Signal. **Sensors**. Vol. 8, pp. 5106-5119, 2008.

- LITT, B.; D'ALESSANDRO, M. Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy, **Proc. 1st Int. IEEE EMBS Conf. on Neural Engineering**, Capri Island, Italy, p. 485-492, 2003.
- MACCIONE, A.; GANDOLFO, M.; MASSOBRIO, P.; NOVELLINO, A.; MARTINOIA, S.; CHIAPPALONE, M. A Novel Algorithm for precise identification of spikes in extracellularly recorded neuronal signals, **Journal of Neuroscience Methods**, Vol 177, pp. 241-249, 2009.
- MARTINOIA, S.; MASSOBRIO, P.; BOVE, M.; MASSOBRIO, G. Cultured Neurons Coupled to Microelectrode Arrays: Circuit Models, Simulations and Experimental Data, **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, Vol 51, N° 5, pp. 859-864, 2004.
- MAROM, S.; SHAHAF, G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. **Quart. Rev. Biophys.**, v. 35, pp. 63 – 87, 2002.
- MARQUES, S. M.; GUZO, M. G.; LOPES, R. C.; OLIVEIRA, A. A. B.; MURTA-JÚNIOR, L. O.; DESTRO-FILHO, J. B. Análise de sinais de culturas neuronais envolvendo os estágios iniciais até a fase de morte celular, In: V SIIM 2011, 4 páginas.
- MASSOBRIO, P. **In Vitro Neuronal Networks – Computational Models and Synaptic Plasticity Studies**, PhD Thesis, Gênova, 2008, 203 páginas.
- MASSOBRIO, P.; MASSOBRIO, G.; MARTINOIA, S. Multi-program Approach for Simulating Recorded Extracellular Signals Generated by Neurons Coupled to Microelectrode Arrays, **Neurocomputing**, vol 70, pp. 2467-2476, 2007.
- McEWEN, J.A.; ANDERSON, G.B. Modeling the Stationarity and Gaussianity of Spontaneous Electroencephalographic Activity. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, vol. 28, no 5, pp 361-369, 1975.

- MURTHY, V. N.; SCHIKORSKI, T.; STEVENS, C. F. AND ZHUINACTIVITY, Y. Produces Increases in Neurotransmitter Release and Synapse Size, **Neuron**, Vol. 32, pp. 673–682, 2001.
- NENADIC, Z.; BURDICK, J.W. Spike detection using the continuous wavelet transform, **IEEE Transactions Biomedical Engineering**, vol. 52, no 1, pp. 74-87, 2005.
- OJA, E.; HYVÄRINEN, A.; KARHUNEN, J. **Independent Component Analysis**, Ed. John Wiley & Sons, 2001.
- OLSEN, L.R.; CHAUDHURI, P.; GODTLIEBSEN, F. Multiscale spectral analysis for detecting short and long range change points in times series. **Computational Statistics & Data Analysis**, Vol 52, pp. 3310-3330, 2008.
- PEARSON, E. S.; D'AGOSTINO, R. B.; BOWMAN, K. O. Tests for departure from normality: comparison of powers. **Biometrika**, v. 64, pp. 231-246, 1977.
- PEYMAN, G.; *et al.* Subretinal semiconductor microphotodiode array. **Ophthalmic Surg. Lasers**, 29, p. 234-241, 1998
- PERKEL, D. H.; GERSTEIN, G. L.; MOORE, G. P. Neuronal spike train and stochastic point processes I. The single spike train. **Biophysics Journal**, v. 7, pp. 391-418, 1967.
- PINE, J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes, **Journal of Neuroscience Methods**, v. 2, pp. 19-31, 1980.
- POTTER, S.M.; DeMARSE, T. B. A new approach to neural cell culture for long-term studies, **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 110, pp. 17-24, 2001.
- RIBEIRO, J.A. **Modelos Estatísticos Simples para a Análise de Sinais Biológicos**. 2006. 173f. Tese (Mestrado). Universidade de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

- ROUSCHE, P.; *et al.* “Neurabotics”: an integration of neurons, rats and robots for advanced studies of brain-computer interfaces systems. **Proceedings of the 1st International IEEE EMBS, Conference on Neural Engineering**, Italy, March 2003.
- ROXIN, A.; RIECKE, H.; SOLLA, S. A. Self-sustained activity in a small-world network of excitable neurons. **Physical Review Letters**, v. 19, n. 19, pp. 198101-1 a 198101-4, 2004.
- RUBINSTEIN, J. T. Threshold fluctuations in an N sodium channel model of the node of Ranvier, **Biophysics Journal**, v.68, pp.779-785, 1995.
- SCHNEIDMAN, E.; FREEDMAN, B.; SEGEV, I. Ion-channel stochasticity may be critical in determining the reliability and precision of spike timing, **Neural Computation**, v.10, pp. 1679-1703, 1998.
- SCHWARTZ, A. B. Cortical neural prosthetics, **Annual. Rev. Neurosci.**, v. 27, pp. 487 – 507, 2004.
- SHAHAF, G.; MAROM, S. Learning in networks of cortical neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 21, pp. 8782 – 8788, 2001.
- SHAHID, S.; WALKER, J.; SMITH, L. S. A new spike detection algorithm for extracellular neural recordings. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 57, n^o 4, pp. 853-866, 2010.
- SHERMAN-GOLD, R., Editor. **The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques**, Axon Instruments Inc, pp. 235-263, 1993.
- SKAUGEN, E.; WALLOE, L. Firing behavior in a stochastic nerve membrane model based upon the Hodgkin-Huxley equations. **Acta Physiol. Scand.**, v.107, pp. 343-363, 1979.

REFERÊNCIAS

- SPENCE, A.P. **Anatomia Humana Básica**, Segunda Edição, São Paulo: Editora Manole Ltda, 1991.
- STEINMETZ, P.N.; MANWANI, A.; KOCH, C.; LONDON, M.; SEGEV, I. Subthreshold Voltage Noise Due to Channel Fluctuations in Active Neuronal Membranes. **Journal of Computational Neuroscience**, vol. 9, 133-148, 2000.
- STEVENS, C. Inferences about Membrane Properties from Electrical Noise Measurements, **Biophysical Journal**, v.12, pp. 1028-1047, 1972.
- STRASSBERG, A. F.; DeFELICE, L. J. Limitations of the Hodgkin-Huxley formalism: Effect os single channel kinetics on transmembrane voltage dynamics, **Neural Computation**, v.5, pp.843-855, 1993.
- TAKETANI, M.; BAUDRY, M. **Advances in network electrophysiology: using Multi-Electrode Array**, Springer, pp.841-866, 2006.
- THOMAS, C. A.; SPRINGER, G. E.; LOEB, G. E.; BERWALD-NETTER, Y.; OKUN, L. M. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cell, **Exp. Cell Res.**, v. 74, pp. 61-66, 1972.
- VOLGUSHEV, M; CHAUVETTE, S; MUKOVSKI, M AND TIMOFEEV, I. Precise Long-Range Synchronization of Activity and Silence in Neocortical Neurons during Slow-Wave Sleep, **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n° 21, pp. 5665–5672, 2006.
- WELCH, P.D. The use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power Spectra: A Method Based on Time Averaging Over Short, Modified Periodograms, **IEEE Transactions Audio and Electroacoust**, Vol AU-15, pp. 70-73, 1967.
- WHEELER, B. C.; NOVAK, J. L. Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice separation, **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 33, pp. 1204-1212, 1986.

REFERÊNCIAS

- WUERTZ, D.; KATZGRABER, H. Precise finite-sample quantiles of the Jarque-Bera adjusted Lagrange multiplier test, **Munich Personal RePEc Archive**, 7pgs, 2009. Disponível em: <http://mpira.ub.uni-muenchen.de/19155>.
- ZRENNER, E.; *et al.* Can subretinal microphotodiodes successfully replace degenerated photoreceptors? **Vision Research**, v. 39, p. 2555-2567, 1999.
- URL 1: Página oficial do “Society of Neuroscience”. Disponível em: <http://www.sfn.org>. Acessado em 24 de fevereiro de 2011.
- URL 2: Disponível em : <http://www.notapositiva.com/superior/enfermagem/anatomia/sistemanervoso02.jpg>. Acessado em: 10 nov. 2008
- URL 3: Disponível em : <http://static.hsw.com.br/gif/brain-neuron-types.gif>. Acessado em: 10 nov. 2008.
- URL 4: Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Potencial_de_acao.png. Acessado em 25 de agosto de 2010.
- URL 5: Disponível em: <http://neuronphysics.com/science/neuro/hh-neuron/>. Acessado em 16 de maio de 2011.
- URL 6: Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Voltage_clamp. Acessado em 20 de maio de 2011.
- URL 7: Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Patch_clamp. Acessado em 20 de maio de 2011.
- URL 8: Disponível em: <http://www.med64.com/> >. Acessado em 08 de junho de 2011.
- URL 9: Disponível em: <http://www.multichannelsystems.com/> >. Acessado em 08 de junho de 2011.

REFERÊNCIAS

URL 10: Disponível em: < <http://www.ayanda-biosys.com/> >. Acessado em 08 de junho de 2011.

URL 11: Disponível em: < <http://www.plexon.com/index.html> >. Acessado em 08 de junho de 2011.

ANEXOS

PUBLICAÇÕES

Characterization of Spontaneous Electrical Activity Arising from Inactive Neuronal Cultures

A. Rocha-Assis^{*1}, M. Taha-Toitio^{*1}, J.B. Destro-Filho^{*1}, R.R. Cardoso^{*1}, E. Rodrigues-Pinto^{*2}

(1) Biomedical Engineering Laboratory (BioLab)
School of Electrical Engineering (FEELT); (2) Faculty
of Mathematics (FAMAT)
Federal University of Uberlândia (UFU)
Uberlândia-MG, Brazil
aline_eletrica@yahoo.com.br; mitoitio@gmail.com;
jbdestrof@yahoo.com;
rodrigophysicsufu@yahoo.com.br;
edmilson@famat.ufu.br

Sergio Martinoia^{*3}

Neuroengineering and Bio-nano Technology Group
Department of Biophysical and Electronic Engineering
(DIBE)
University of Genova (UniGe)
Genova, Italy
sergio.martinoia@unige.it

Abstract — This article analyses electrical signals of neuronal cultures from which measurements taken by multielectrode arrays (MEAs) present very low amplitudes and spike rates, so that no connections among neurons and microelectrodes seem to be established. Such information may be useful to characterize MEA instrumentation noise, which influences subsequent signal processing associated with spike and burst detection. A simple estimator of the probability density function of the signal amplitude is calculated, pointing out that this random variable is Gaussian. This conclusion is also attested by normality tests, as well as by high-order moment analysis. Average values for the mean and variance of the noise amplitude are provided.

Keywords – *probability function estimation; multielectrode array; gaussianity.*

I. INTRODUCTION

One of the most relevant frontiers of the research on Brain-Machine Interfaces aims at the development of neural prosthesis for clinical applications, regarding pathologies of the central nervous system [1,2]. For example, one could point out epilepsy, which involves the anomalous and synchronized activity of large groups of neurons within the human cortex [3]. In consequence of previous discussions, several efforts are currently deployed in order to develop implantable neural prosthesis that are capable of communicating in a bidirectional way with the cortex [4,5]. Although several problems still remain unsolved, the literature presents interesting results in terms of some prototypes applied to *in-vivo* experiments. For example, in [6], the authors describe basic principles of implantable prosthesis, reporting fruitful preliminary results of electrostimulation on animal models, by means of nanotechnological devices such as Microelectrode Arrays (MEAs).

Signals from neuronal cultures are composed of basic unities called “spikes” [7]. Since the classical analysis of spikes [7] does not take into account the biological noise segments [5], then it leads to a loss of biological information. In fact, although current neurophysiological knowledge focus on spikes as the source of the most important biological information [5], one should not forget that biological noise plays a very important role, as pointed out by several works devoted to its analysis within the nervous system [8]. In addition, it should be pointed out that the first operation of any signal processing applied to MEA data correspond to spike detection, which is subsequently used to generate the Interspike-Interval Time Series (ISI), to perform burst analysis and to estimate associated histograms. Such detection is mainly influenced by instrumentation noise, which is a quite complex issue in the context of extracellular recordings, due to its several possible sources [9].

Classical spike signal processing [7] always supposes the gaussianity of this noise, particularly for intracellular data, in order to enable simple mathematical treatment. However, very few works in the literature [9,10] are focused on the background noise disturbing extracellular recordings. In [10], authors provide a simple illustration of the noise gaussianity based on real signals, supposing this hypothesis for deriving a new spike detection technique, as well as its variance within the range (0.06 – 0.08) (μV)². Article [9] considered the noise variance within the range (0.286 – 0.091) (μV)² for testing a new proposition, without formal justification for this choice.

This article is devoted to analyze background noise, which is experimentally studied by means of the concept of “inactive neuronal culture”, to be discussed below.

The underlying process leading to functional connections between cultured neurons and microelectrodes is not completely clear [11]. Just after the tissue deposition on the planar MEA surface, the ensemble is stored in an incubator. In general, eight or

ten days after the deposition, which are labeled as 8thDIV (“Day-In-Vitro”) and 10thDIV respectively, the culture is connected to the acquisition system, in order to check if functional or anatomical connections between the cells and the microelectrodes have taken place. In this case, signal amplitudes may attain at least 100 μV during spike activity, firing rates are at least greater than 0.1 spikes/second [12], and the culture is called “active”. Otherwise, it is called “inactive”.

To the best of authors' knowledge, few works in the literature are devoted to culture inactivation, with the exception of [12], which presents some remarks and discussions, without experiments. In general, signals from these cultures are not considered as “useful information”, being not processed by researchers in the field.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Signal Acquisition

Extracellular electrophysiological signals were recorded by means of a planar sixty-electrode MEA system (*MultichannelSystems, Reutlingen, Germany*). Dissociated primary cultures of cortical neurons were prepared after tissue extraction from eighteen-day rat embryos, which were previously anesthetized. All procedures required by Genova University Animal Ethics Commission were employed to ensure the necessary care towards the rats. Further details regarding culture preparation are presented in [13]. MEA microelectrodes are distributed in an 8x8 array, each of them presenting a diameter of 30 μm and separated by 200 μm from each other. Microelectrodes located in all four external edges of the device were not active. Sampling frequency was 10 kHz.

Two neuronal cultures were monitored, and they are identified by C358 and C359. As long as it was possible, one complete experiment of each culture was performed during a twenty-minute recording time. In brief, our database is composed of fifteen data files or sessions, each of them lasting five minutes. Culture inactivation was “spontaneous” in the sense that no special biological or external procedure was performed to assure such condition.

B. Probability Density Function Estimation

The “naïf estimator” [14] supposes that a random process $X(n)$ is divided up into Q amplitude intervals $\Delta x(n)$, which will be called “amplitude resolution”; n denoting the discrete time. $X(n)$ represents the signal recorded at one microelectrode (or channel) of the MEA. The random process is stationary during a short time slot of $L \cdot T$ seconds, where L is the total amount of signal samples within this slot, and T is the sampling period. Then, the probability of the amplitude taking values within the interval $\Delta x(n)$ may be estimated by its relative frequency throughout the time slot under analysis as:

$$P(x(n) \leq X(n) \leq x(n) + \Delta x(n)) \cong q_X(n) / L \quad (1)$$

Wherein $P(x(n) \leq X(n) \leq x(n) + \Delta x(n))$ is the probability of the random variable $X(n)$ lay within the interval of $(x(n) + \Delta x(n))$ and $q_{X(n)}$ is the number of times that the signal amplitude $X(n)$ takes values within the range $(x(n) + \Delta x(n))$ μV , during the analogue time interval $(0, L \cdot T)$ seconds.

Consider vector \mathbf{x}_k containing samples of the extracellular electrical activity amplitudes [μV] of one single channel or microelectrode k ($k = 1, 2, \dots, 60$), during five minutes. In order to cope with nonstationary issues, each vector \mathbf{x}_k was then divided into 300 segments, each of them lasting one second. In fact, previous results achieved by classical spike-detection techniques [4,7] suggest that these segments should not be longer than 1-2 seconds. For each segment, a simple estimation of its histogram was performed according to (1). The average statistical behaviour of one channel was assessed, by means of averaging all its 300 histograms, which leads to the “Single-Channel Single-Session Histogram” (SCSSH). This same procedure was repeated for all 60 channels of the session, thus generating 60 SCSSHs.

The previous paragraph described a procedure applied to data associated with one single session (five-minute recording). Since the database is composed of fifteen sessions, all steps were repeated for each digital file. Finally, by averaging all these results, it was possible to generate one single histogram for each MEA channel, which will be called “Single-Channel All-Session Histogram” (SCASH). The last one finally characterizes the average statistical behaviour of one single channel, considering all the fifteen sessions. Another possible feature is the “All-Channel All-Session Histogram” (ACASH), which is obtained by averaging the sixty SCASHs, thus providing an overall statistical behaviour of the signal, considering the whole set of microelectrodes throughout all the fifteen recording sessions.

C. High-Order Moments of Particular Channels (SCASHs)

High-order moments associated with the SCASH of one single channel were calculated according to the definitions presented below [14].

$$\hat{M}_{1X} \cong \sum_{i=1}^Q x_i p(x_i); Q = 30 \quad (2)$$

$$\hat{\sigma}^2 = \hat{M}_{2X} \cong \sum_{i=1}^Q (x_i - \hat{M}_{1X})^2 p(x_i); Q = 30 \quad (3)$$

$$\hat{M}_{jX} \cong \sum_{i=1}^Q (x_i - \hat{M}_{1X})^j p(x_i); Q = 30; j = 3, 4 \quad (4)$$

Wherein $p(x_i)$ represents the probability of the signal amplitude attains the value x_i .

In addition, the following statistical quantities were also estimated.

$$S_k = \hat{M}_{3X} / \hat{\sigma}^3 ; K = (\hat{M}_{4X} / \hat{\sigma}^4) - 3 \quad (5)$$

Where S_k is the “skewness” of the SCASH [14], which characterizes the symmetry of the estimated probability density with respect to its mean value; and K is the “kurtosis” of the SCASH, providing information on the general aspect of the density plot, as it is compared to the normal distribution. If $S_k = 0$, then the random variable may be considered completely symmetric. If $K = 0$, the probability density is indeed Gaussian. For $K < 0$, the histogram is called “platykurtic”, otherwise, for $K > 0$, the histogram is called “leptokurtic”.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Probability Density of all Channels

The “All-Channel All-Session Histograms” (ACASHs) of cultures C358 and C359 were estimated. Fig. 1 presents the average histogram obtained from these two ones, depicting the overall statistical behavior of the whole set of signals from sixty microelectrodes, throughout all the fifteen recording sessions. Clearly, the plot resembles a Gaussian distribution.

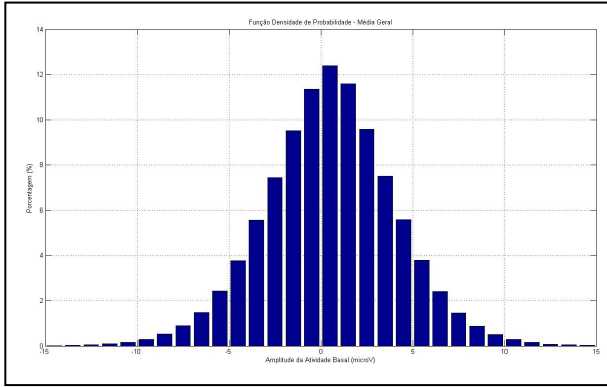


Figure 1. Histogram obtained after averaging the ACASH of C358 and the ACASH of C359. Vertical axis is expressed in percentage [%], whereas horizontal axis is associated to the instrumentation noise amplitude.

Table I presents estimated values for the mean and variance of the final histogram in Fig. 1.

TABLE I. GAUSSIAN-DISTRIBUTION PARAMETER ESTIMATION, CONSIDERING HISTOGRAM OF FIG. 1

Parameter	Estimate	95%-Confidence Interval
Mean value \hat{M}_{1X} [μV]	0,497	(0,497; 0,567)
Variance $\hat{\sigma}^2[(\mu V)^2]$	12,711	(12,366; 13,070)

Since values in Table 1 approach the zero-mean Gaussian, Shapiro-Wilk statistical test was also

performed for both the mean value and for the variance, supposing the following hypothesis: $H_0 : \hat{M}_{1X} = 0$ and

$H_1 : \hat{\sigma}^2 = 1(\mu V)^2$. Both hypotheses were rejected with 5% of significance, thus pointing out that the general density of Fig 1 is not associated with a zero-mean and unitary-variance Gaussian distribution.

B. High-Order Moment Analysis and Particular Channel Behaviour

Analysis of the sixty SCASHs by means of equations (2)-(5) was performed, and results are presented in Fig. 2 and Table II.

Fig. 2 depicts the overall variance of each MEA channel respectively, considering the average performed on all fifteen sessions. The upper part of Fig. 2 represents the bottom view of the planar MEA device, wherein little square subdivisions are associated with the spatial location of particular microelectrodes. Variance amplitudes are depicted in color scales. The second part (lower one) introduces the color scales used for amplitude representation, and the scale ranges are written in the figure title.

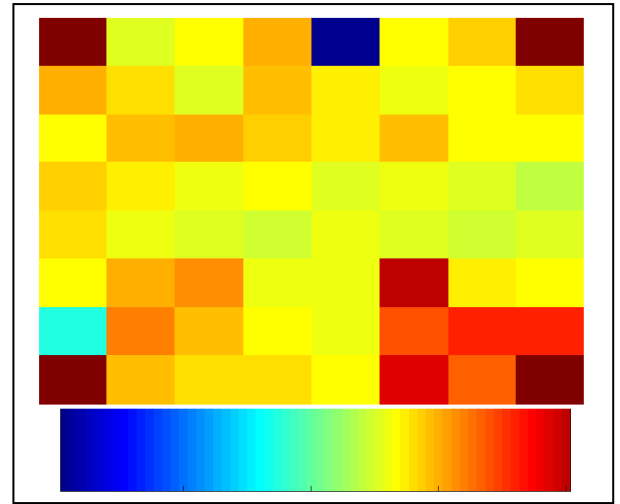


Figure 2. Variance amplitudes $\hat{\sigma}^2$ for all channels. Scale ranges $1.94 (\mu V)^2$ for dark blue ; $17.74 (\mu V)^2$ for dark red.

Fig. 2 provides information on the particular statistical behaviour of each channel. In fact, it points out that the variance attains quite different amplitudes as one moves little distances within the device surface. Such amplitudes are high, specially for those microelectrodes located at the right lower part.

TABLE II. ESTIMATION OF THE MEAN-VALUE AND THE VARIANCE FOR EACH HIGH-ORDER MOMENT ASSOCIATED WITH SCASHs, CALCULATED CONSIDERING THE AVERAGE PERFORMED ON ALL SIXTY MEA CHANNELS

	Mean-value \hat{M}_{1X}	Variance $\hat{\sigma}^2$	Skewness S_k	Kurtosis K
Mean value	0,4981	12,6993	-0,0213	0.3903
Variance	$9,4300 \times 10^{-5}$	3,9151	$5,152 \times 10^{-4}$	0,0374

Conclusions of the previous paragraph may be clearly attested by the third column of Table II, that presents the mean-value and the variance of the several moments, after averaging all the characteristic parameters over the sixty channels. Notice that the mean-value, the skewness and the kurtosis present a quite low variance, which means that they do not vary too much throughout all the channels. In addition, notice also that amplitudes of the mean-value, the skewness and the kurtosis are very low.

In consequence, major differences between the statistical behaviors of the MEA data are due to different signal powers (variances) at the microelectrodes. In addition, skewness and kurtosis present very low average amplitudes, which clearly characterizes the gaussianity of the random variable under analysis. This conclusion also attests the previous results of Table 1.

IV. CONCLUSION AND FUTURE WORK

This article analyzed two topics very few studied in the literature: inactive cultures and MEA instrumentation noise. Signals arising from these cultures were considered as a possible experimental framework in order to develop a statistical analysis of instrumentation noise. It should be pointed out that only absolute-amplitude signals have been processed, since it is not possible to derive the interspike-interval time series, due to very low signal amplitudes and spiking frequency. In this context, the random character of this stochastic process was supposed to be tied to the signal amplitudes. Particular attention was devoted to the nonstationary issues that are intrinsic to biological signals. For this purpose, data segmentation was performed based on a fixed-length strategy, followed by the application of simple theoretical tools, such as the “naïf estimator” and high-order moments for analyzing the probability density function.

From the point of view established in the previous paragraph, it was possible to conclude that the MEA instrumentation noise follows indeed a Gaussian distribution, which was attested by visual inspection, and from high-order moment analysis. This distribution, as an overall trend for all the sixty channels and recording sessions, presents an average mean of $0.497 \mu V$ and an

average power of $\hat{\sigma}^2 = 12.711(\mu V)^2$. When these experimental results are compared to those generally used in the literature devoted to spike-detection techniques and MEA signal simulation [9,10,15], discussed in Section 1, one could ask whether the last ones are realistic, since our results point out that noise is neither zero-mean, nor uncorrelated. In addition, its variance is much higher than values currently used in the literature. Regarding the statistical behavior of the several MEA channels, they present almost no differences in terms of mean values, kurtosis and skewness. In consequence, variance is the major statistical characteristic of MEA instrumentation noise at different microelectrodes, which is specially high for channels at the right lower part of the device.

This article presents an experimental confirmation of a hypothesis that is used in papers related to extracellular

recording simulation [9,10,15], which devotes very few attention to the noise and to the nonstationary issues associated with biological signals under analysis. The results are useful for deriving more accurate statistical models for MEA instrumentation noise, so that to contribute for the development of more efficient spike-detection methods, as well as for the synthetic generation of MEA data. However, care should be taken regarding the statistical analysis performed in this paper. Histogram averaging, although necessary due to the signal nonstationarity, may lead itself to gaussianity, in view of the Central Limit theorem. In addition, as future work, more significant statistical tools such as adherence tests should be applied to single segments of the signals under analysis, in order to provide a more rigorous assesment of the signal gaussianity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been funded by means of grants and fellowships of FAPEMIG, CNPq and CAPES.

REFERENCES

- [1] A.B. Schwartz, “Cortical neural prosthetics”, *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 27, pp. 487 – 507, 2004.
- [2] J.R. Wolpaw, N. Birbaumer et alli, “Brain-computer interfaces for communication and control”, *Clinical Neurophysiology*, vol. 113, pp. 767 – 791, 2002.
- [3] D.M. Durand, M. Bikson, “Supression and control of epileptiform activity by electrical stimulation: a review”, *Proc. of the IEEE*, vol. 89, n. 7, 2001, pp. 1065-1082.
- [4] M. Akay, Editor, *Handbook Of Neural Engineering*. New York: IEEE Press, 2007, 662 pg.
- [5] E.C. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessel, *Principles of neural sciences*. New York: Mc-Graw Hill Inc., 2000, 1413 p.
- [6] B. Litt, M. D’alessandro et al., “Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy”, *Proc. 1st Int. IEEE EMBS Conf. on Neural Engineering*, Capri Island, Italy, 2003, p. 485-492.
- [7] E.M. Glaser, D.S. Ruchkin. *Principles Of Neurobiological Signal Analysis*. Academic Press: N York, USA, 471 pp., 1976.
- [8] W. J. Freeman. *Neurodynamics: An Exploration In Mesoscopic Brain Dynamics*. Springer-Verlag: Oxford, London, UK. 2000.
- [9] S. Kim, J.Mcnames, “Automatic spike detection based on adaptive template matching for extracellular neural recordings”, *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 165, pp. 165-174, 2007.
- [10] Z. Nenadic, J.W. Burdick, “Spike detection using continuous wavelet transform”, *IEEE Trans Biomed Engin*, vol 52, no 1, pp 74-87, Jan 2005.
- [11] Sporns, O.; Chialvo, D. R.; *et al.*, “Organization, development and function of complex brain network”, *Trends in Cognitive Sciences*, vol.8, n.9, pp.418-425. Sep. 2004.
- [12] D. Eytan, S. Marom, “Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons”, *The Journal of Neuroscience*, vol.26, n.33, pp.8465-8476. Aug. 2006.
- [13] M Chiappalone, A. Vato, M.B. Tedesco, M. Marcoli, F. Davide, S. Martionia, “Networks of neural coupled to microelectrode arrays: a neural sensory system for pharmacological applications”, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, pp. 627-634, May 2003
- [14] M. Kendall, A. Stuart, K. Ord. *Kendall’S Advanced Theory Of Statistics, Vol 1: Distribution Theory*. London: Hodder Arnold, 6th edition, 1994. 704 pg.
- [15] R. Escola, C. Pouzat, A. Chaffiol et alli, “SIMONE: a realistic neural network simulator to reproduce MEA-based recordings”, *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.*, vol. 16, no. 2, pp 149 – 160, April 2008.

ESTIMAÇÃO DO GRAU DE GAUSSIANIDADE DE BIOPOTENCIAIS PROVENIENTES DE CULTURAS NEURONAIS DISSOCIADAS

Rocha-Assis, Aline*, Destro-Filho, J.B.* e Rodrigues-Pinto, E.**

*Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

**Faculdade de Matemática, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil

e-mail: aline_eletrica@yahoo.com.br

Abstract: Extracellular electrical potential recordings from rat hippocampus neurons in culture were investigated using multielectrode array (MEA) technology. These MEA signals are composed of instrumentation noise, biological noise, spikes and bursts. A simple estimator of the probability density function of the signal amplitude was calculated, as well as high-order moment analysis to compare such components of recorded signals. The results showed that neuronal electrical activity of spikes and bursts present a remarkable non-gaussian character when compared to biological noise and instrumentation noise that are very close to gaussianity.

Palavras-chave: cultura de neurônios, matriz multieletrodo, gaussianidade.

Introdução

Uma das fronteiras na ciência biomédica é o desenvolvimento de próteses para o sistema nervoso central (SNC), com o objetivo de modificar terapeuticamente processos fisiológicos que foram perdidos devido a danificações ou doenças [1]. Como exemplo destas patologias, pode-se destacar a epilepsia, que envolve a atividade anômala e sincronizada de grandes grupos de neurônios no córtex humano [2]. Assim, são realizados muitos esforços para desenvolver próteses neurais que podem coexistir e comunicar bidirecionalmente com o tecido cerebral vivo [3,4]. Em [5], os autores descrevem estratégias para a construção de neuroimplantes para minimizar as crises epiléticas, incluindo experimentos preliminares de eletroestimulação em animais, baseando-se em dispositivos nanotecnológicos denominados "Matrizes Multieletrodo" (MEAs).

Sinais registrados de culturas neuronais são compostos de unidades básicas chamadas *spikes* [6], *bursts*, ruído biológico e ruído de instrumentação. O foco do conhecimento neurofisiológico atual é baseado no fato de que a atividade de *spikes* constitui a informação biológica mais importante [4], denominando os instantes de tempo em que essa atividade não ocorre como ruído biológico [7]. A análise clássica de *spikes* [6] não leva em conta os segmentos de ruído biológico [4], consequentemente há uma perda de informação

biológica. No entanto, não se deve esquecer que o ruído biológico desempenha um papel muito importante, como apontado por diversos trabalhos dedicados a sua análise no contexto do sistema nervoso [8]. Também, deve salientar-se que a primeira análise de qualquer processamento de sinais aplicado aos dados MEA corresponde a detecção de *spikes*, que é posteriormente utilizado para gerar a série temporal de intervalos entre *spikes* (*InterSpike Interval* - ISI), análise de *bursts* e estimativa de histogramas. Essa detecção é influenciada principalmente pelo ruído de instrumentação, que é uma questão bastante complexa no contexto de registros extracelulares, devido às suas diversas fontes [9].

O processamento clássico de *spikes* [6] pressupõe que o ruído presente seja gaussiano, especialmente para os dados intracelulares, a fim de permitir um tratamento matemático simples. No entanto, poucos trabalhos na literatura [9,10] analisam o ruído que perturba registros extracelulares. Em [10], os autores fornecem uma ilustração simples da gaussianidade do ruído com base em sinais reais, supondo essa hipótese para definir uma nova técnica de detecção de *spikes*, bem como sua variância no intervalo $[0,06 - 0,08] (\mu V)^2$. O artigo [9] considera a variância de ruído no intervalo $[0,286 - 0,091] (\mu V)^2$ para testar uma nova proposta de detecção de *spikes*, sem justificativa formal para esta escolha.

Quando as amplitudes dos sinais mensurados atingem pelo menos $100 \mu V$ durante a atividade de *spikes* e as taxas de disparo são, pelo menos, superior a $0,1 \text{ spikes/segundo}$ [11], então a cultura é chamada de "ativa". Caso contrário, ela é chamada "inativa". Este artigo visa estabelecer diferenças entre as componentes de sinais MEA (ruído de instrumentação, ruído biológico e a atividade de *spikes* e *bursts*) no âmbito de culturas ativas e inativas

Materiais e Métodos

A. Aquisição dos dados

Os sinais eletrofisiológicos foram adquiridos usando o sistema MEA60 (*Multichannel Systems, Reutigen, Germany*). Culturas primárias de neurônios corticais do hipocampo de rato foram realizadas, extraindo-se o tecido de embriões com 18 dias de desenvolvimento, após anestesia e tomados todos os

cuidados necessários, estipulados pelo Comitê de Ética da Universidade de Gênova. As culturas foram crescidas sobre MEA's planares contendo 60 microeletrodos, cujas dimensões principais correspondem a 30 μm de diâmetro e 200 μm de espaçamento entre si, distribuídos em uma matriz 8 x 8, com os cantos excluídos.

O aparato experimental consistiu de uma MEA propriamente dita, um banco de 60 amplificadores integrados (cada qual associado a um microeletrodo), com ganho total absoluto de 1200, um controlador de temperatura, um computador pessoal equipado com uma placa PCI de aquisição de dados para monitoramento em tempo real, um microscópio invertido, uma mesa antivibratória e uma gaiola de Faraday. Os dados foram monitorados e gravados usando o software comercial *MCRack (MultichannelSystems, Reutlingen, Germany)*.

Três culturas de atividade elétrica neuronal espontânea foram monitoradas, sendo estas identificadas por C1, C2 e C3. Cada MEA foi retirada da estufa de CO_2 e colocada sobre o respectivo banco de amplificadores. As medidas foram iniciadas após 20 minutos da deposição da cultura sobre os eletrodos, com o objetivo de permitir às células de se adaptarem ao novo ambiente. Em seguida, para cada cultura, foram coletados quatro registros consecutivos de amostra do sinal de atividade neural espontânea, sendo que cada um desses registros teve duração de 5 minutos. A frequência de amostragem utilizada foi de 10 kHz. Justificativas práticas do ponto de vista de instrumentação e da fisiologia, para tal procedimento, podem ser encontradas em [7].

Entre a 3ª e 4ª SIV (semana *in vitro*) a cultura neuronal completa a maturação das conexões excitatórias, observando-se o pico da taxa média de bursts, e a partir da 5ª SIV o padrão de conectividade sináptica atinge a maturidade, estabilização, ou seja, a cultura estaria mais propícia a apresentar formas rudimentares de “aprendizado ou de memória”, ou ainda ser influenciada por estímulos externos “sensoriais” [7]. Por isso, a cultura C1 foi observada no 21º dia de incubação ou dia *in vitro* (DIV), a cultura C2 foi observada no 39º DIV e a cultura C3 foi monitorada no 41º DIV. Assim, a atividade elétrica espontânea registrada durante 20 minutos das culturas C1, C2 e C3 foram denominadas experimentos E1, E2 e E3 respectivamente. O experimento E4 consistiu em um registro realizado na cultura C3 após serem adicionados 20 μM olares da droga tetrodotoxina (TTX) sobre a cultura. Essa droga bloqueia os canais de sódio dos neurônios, e consequentemente minimiza a atividade de *spikes* e *bursts* [8]. Assim, o experimento E4 consiste somente em ruído biológico e ruído de instrumentação. Já no registro do experimento E5, não havia cultura neuronal sobre a MEA, tratando-se apenas de ruído de instrumentação devido aos amplificadores.

O experimento E1 foi analisado usando o software detector de *spikes Spike Manager* [7] e foi constatado ausência de atividade elétrica significativa, além da frequência de disparo inferior a 1 kHz. Assim, a cultura C1 pode ser considerada inativa. No entanto, a

inatividade desta cultura deve estar associada com a dificuldade de conexão da cultura com os microeletrodos da MEA [12], uma vez que culturas em DIV21 podem normalmente atingir uma taxa média de disparo de até 2,2 *spike/s* [7]. Cabe observar que a inatividade dessa cultura foi natural, ou seja, o experimento não foi dimensionado para gerar ou induzir tal fenômeno. Já nos experimentos realizados com C2 e C3 não foi constatada inatividade da cultura. Assim, tais culturas são denominadas ativas.

B. Estimação da Função Densidade de Probabilidade

O “estimador naïf” [13] supõe que o processo aleatório $X(t)$ é dividido em um número arbitrário de classes de amplitude Δx , que será chamado de “resolução de amplitude”. $X(t)$ representa a amplitude, mensurada em μV , do sinal registrado em um único microeletrodo (ou canal) da MEA. O processo aleatório é estacionário durante um pequeno intervalo de tempo de NT segundos, onde N é a quantidade de amostras em um segmento de sinal MEA e T é o período de amostragem. Então, a probabilidade da amplitude assumir valores dentro da classe Δx pode se estimada através da frequência relativa da amplitude do sinal dentro da classe sob análise:

$$P(x \leq X(t_i) \leq x + \Delta x) \cong q_x / N \quad (1)$$

Onde $P(x \leq X(t_i) \leq x + \Delta x)$ é a probabilidade da variável aleatória $X(t_i)$ encontrar-se dentro do intervalo $[x, x + \Delta x]$ e q_x é o número de vezes que a amplitude do sinal $X(t)$ assume valores dentro desse intervalo, durante a faixa de tempo $(0, NT)$ segundos.

Considere o vetor x_k contendo amostras da amplitude da atividade elétrica extracelular em $[\mu\text{V}]$ de um único canal ou microeletrodo k ($k = 1, 2, \dots, 60$), durante cinco minutos. Para a adequada estimação dos histogramas, x_k foi dividido em 300 segmentos de duração um segundo cada, pois, conforme a literatura [3,6,7], tais segmentos são estacionários, no contexto de técnicas de detecção de *spikes*. Deve-se destacar que a estacionariedade é hipótese fundamental para permitir a estimação do histograma, que foi realizada de acordo com (1). O comportamento estatístico médio de cada canal foi calculado, por meio da média de todos os seus 300 histogramas, que conduz ao “histograma médio para uma única sessão de um único canal” (HUSUC). O mesmo procedimento foi repetido para todos os 60 canais da sessão, gerando então 60 HUSUC.

Desde que a base de dados é composta de 4 sessões de cinco minutos, os passos descritos no parágrafo anterior foram repetidos para as demais sessões. Finalmente, fazendo a média de todos estes resultados, foi possível gerar um único histograma para cada canal MEA, denominado “histograma médio de todas as sessões para um único canal” (HTSUC). Esse último caracteriza o comportamento estatístico médio de um único canal, considerando todas as quatro sessões de um único experimento. Outra possível característica é a “histograma médio de todas as sessões de todos os

canais” (HTSTC), que é obtido fazendo a média dos sessenta (HTSUC), fornecendo um comportamento estatístico global do sinal, considerando o conjunto de sessenta microeletrodos por todas as quatro sessões.

Uma vez que a superposição dos 60 HTSUCs gera um único HTSTC, assumido como característico do experimento, tal procedimento certamente não leva em consideração detalhes específicos de determinados canais. Todavia, o objetivo deste artigo é permitir uma visão geral das estatísticas do experimento, sendo que tal promediação consiste em procedimento padrão tanto do ponto de vista de processamento de sinais clássico de *spikes* [3,6,9,10], no contexto dos histogramas ISI e de intervalo inter-*burst*; quanto da técnica de periodograma [6,13].

C. Momentos de ordem elevada de um HTSUC

Os momentos de j -ésima ordem M_{jX} associados ao HTSUC de um único canal foram calculados de acordo com as equações apresentadas abaixo [13].

$$\hat{\mu} = \hat{M}_{1X} \cong \sum_{i=1}^Q x_i p(x_i); \quad Q = 30 \quad (2)$$

$$\hat{\sigma}^2 = \hat{M}_{2X} \cong \sum_{i=1}^Q (x_i - \hat{M}_{1X})^2 p(x_i); \quad Q = 30 \quad (3)$$

$$\hat{M}_{jX} \cong \sum_{i=1}^Q (x_i - \hat{M}_{1X})^j p(x_i); \quad Q = 30; \quad j = 3; 4. \quad (4)$$

onde $p(x_i)$ representa a probabilidade da amplitude do sinal ser igual ao valor x_i . Também foram estimados:

$$\hat{S}_k = \frac{\hat{M}_{3X}}{\hat{\sigma}^3} \quad (5) \quad \hat{K} = \frac{\hat{M}_{4X}}{\hat{\sigma}^4} - 3 \quad (6)$$

Onde S_k é a obliquidade do HTSUC [13], que caracteriza a simetria da função densidade de probabilidade estimada em relação à média e K é a curtose do HTSUC, que mede o grau de achatamento da função densidade de probabilidade quando comparada com uma distribuição normal. Se $S_k = 0$, então a variável aleatória pode ser considerada simétrica em relação à média. Se $K = 0$, a densidade de probabilidade possui o mesmo grau de achatamento que uma distribuição Gaussiana de mesma média e variância. Para $K < 0$, o histograma é chamado platicúrtico, caso contrário, para $K > 0$, o histograma é chamado leptocúrtico.

Resultados

Foram obtidos os HTSTCs para os experimentos E1, E2, E3, E4 e E5. A Figura 1 ilustra o HTSTC para o experimento E3 ($\hat{\mu} = -0,2282\mu V$ e $\hat{\sigma} = 28,096 \mu V$). Para cada um dos experimentos foram estimados os parâmetros estatísticos média, ou momento de primeira ordem; variância, ou momento de segunda ordem; obliquidade e curtose. Os resultados estão sintetizados

na Tabela 1. As variâncias ao longo dos sessenta canais de cada um desses parâmetros também foram calculadas e são apresentados na Tabela 2.

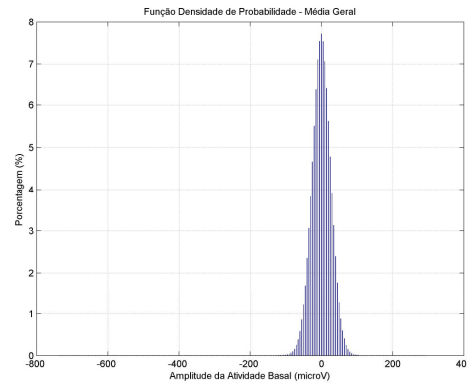


Figura 1: HTSTC do experimento E3. Resolução do histograma $5\mu V$. O eixo horizontal representa o potencial elétrico extracelular em (μV) enquanto que o eixo vertical representa a frequência relativa em (%).

Tabela 1: Estimação do valor médio dos parâmetros estatísticos média ($\hat{\mu}$), variância ($\hat{\sigma}^2$), obliquidade (\hat{S}_k) e curtose (\hat{K}) associado aos 60 HTSUC calculados de cada experimento.

	$\hat{\mu} [\mu V]$	$\hat{\sigma}^2 [(\mu V)^2]$	\hat{S}_k	\hat{K}
E1	-0,0019	12,6993	-0,0213	0,3903
E2	-0,0012	12,9372	-0,6214	9,0738
E3	-0,2282	789,4038	-0,4448	3,1406
E4	-0,0119	650,6379	-0,0270	0,0563
E5	-0,0050	5,6573	0,0015	-0,0159

Tabela 2: Estimação da variância dos parâmetros estatísticos média, variância, obliquidade e curtose associado aos 60 HTSUC calculados de cada experimento.

	$\hat{\mu} [(\mu V)^2]$	$\hat{\sigma}^2 [(\mu V)^4]$	\hat{S}_k	\hat{K}
E1	$9,4300 \times 10^{-5}$	3,9151	$5,152 \times 10^{-4}$	0,0374
E2	0,0014	13,8658	1,6241	444,2877
E3	$0,3337$	$7,9406 \times 10^4$	0,6854	49,3101
E4	0,0175	$9,3907 \times 10^3$	$3,3044 \times 10^{-5}$	$2,0858 \times 10^{-4}$
E5	$8,9081 \times 10^{-4}$	0,7576	$9,1091 \times 10^{-6}$	$7,7257 \times 10^{-6}$

Tabela 3: Resultados do teste de hipótese Jarque-Beta.

	Rejeições (%)	Rejeições depois da correção (%)
E1	15,91	$\cong 11,71$
E2	25,77	$\cong 22,06$
E3	24,22	$\cong 20,43$
E4	11,46	$\cong 7,033$
E5	7,32	$\cong 2,686$

Para avaliar quão próximos os resultados obtidos na Tabela 1 estão de uma distribuição gaussiana foi usado o teste estatístico Jarque-Bera que se baseia em curtose e obliquidade [14]. Os resultados obtidos para cada

experimento foram corrigidos para o erro Tipo I e são apresentados na Tabela 3. Considerações: H_0 : os dados são provenientes de uma distribuição normal; $\alpha = 5\%$.

Discussão

Pode ser observado das Tabelas 1 e 2 que os sinais eletrofisiológicos de todos os experimentos apresentaram valores para obliquidade próximos a zero, indicando simetria das funções densidades de probabilidade em torno dos respectivos valores médios. Já os experimentos E1, E4 e E5 apresentam valores de curtose próximos a zero indicando que as densidades de probabilidade de tais experimentos apresentam comportamentos semelhantes a uma curva gaussiana, o que pode ser também confirmado na Tabela 3. Já para os experimentos E2 e E3 foram calculados valores de curtose maiores que zero, indicando que suas respectivas densidades de probabilidades são mesocúrticas, ou seja, são mais afuniladas do que a função densidade de probabilidade normal de mesma média e variância. A Tabela 3 revela que tais experimentos são gaussianos apenas para 78% e 80% do tempo respectivamente. Não é de conhecimento dos autores outros trabalhos na literatura que tratam explicitamente desse assunto, com a mesma metodologia.

Conclusões

Os sinais obtidos nos experimentos E1, E4 e E5 se assemelham a ruído branco, uma vez que suas densidades de probabilidade são gaussianas. No experimento E1 é observada pouca atividade de *spikes* e *bursts*, comportamento que foi denominado cultura inativa, ou seja, os neurônios estão tendendo para a morte celular. No experimento E4 a atividade de *spikes* e *bursts* é praticamente nula devido à presença da droga TTX, o que o torna apenas uma combinação de ruído biológico e ruído de instrumentação, semelhante ao sinal registrado no experimento E1. O experimento E5 consiste apenas de ruído de instrumentação devido à ausência de cultura na MEA mensurada. Por outro lado, os experimentos E2 e E3, denominados culturas ativas, apresentaram um comportamento não gaussiano. Assim, a não gaussianidade desses sinais deve estar associada à presença da atividade eletrofisiológica de *spikes* e *bursts*. Trabalhos futuros envolvem o uso de ferramentas estatísticas mais precisas, tais como teoria de cumulantes e multiespectro, para estabelecer diferenças entre os sinais analisados.

Agradecimentos

À FAPEMIG pelo apoio financeiro, em particular o Projeto TEC-APQ 01788/2008. À Universidade de Gênova, Itália, pela disponibilidade do aparato biológico e experimental que possibilitou a aquisição dos dados.

Referências

- [1] Berger, T.W. (2001) "Brain-Implantable biomimetic electronics as the next era in neural prosthetics." In: *Proceedings of the IEEE, Special Issue on Neural Engineering*, v.89, n.7, p.991-1012.
- [2] Durand, D.M., Bikson, M. (2001) "Suppression and control of epileptiform activity by electrical stimulation: a review", In: *Proc. of the IEEE*, vol. 89, n. 7, pp. 1065-1082.
- [3] Akay, M. (2007) *Handbook Of Neural Engineering*. New York: IEEE Press, 2007, 662 pg.
- [4] Kandel, E.C., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2000) *Principles of neural sciences*. New York: Mc-Graw Hill Inc., 1413 p.
- [5] Litt, B., D'alessandro, M. (2003) "Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy", *Proc. 1st Int. IEEE EMBS Conf. on Neural Engineering*, Capri Island, Italy, p. 485-492.
- [6] Glaser, E. M., Ruchkin, D.S. (1976) *Principles Of Neurobiological Signal Analysis*. Academic Press: N York, USA, 471 pp., 1976.
- [7] Chiappalone, M., Bove, M. Vato, A., Tedesco, M., Martinoia, S. (2006) "Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development", *Brain Research*, 1093, pp. 41-53.
- [8] Freeman, W. J. (2000) *Neurodynamics: An Exploration In Mesoscopic Brain Dynamics*. Springer-Verlag: Oxford, London, UK.
- [9] Kim, S., Mcnames, J. (2007) "Automatic spike detection based on adaptive template matching for extracellular neural recordings", *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 165, pp. 165-174.
- [10] Nenadic, Z., Burdick, J.W. (2005) "Spike detection using continuous wavelet transform", In: *IEEE Transactions Biomedical Engineering*, vol 52, no 1, pp 74-87, Jan.
- [11] Eytan, D., Marom, S. (2006) "Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons", *The Journal of Neuroscience*, vol.26, n.33, pp.8465-8476.
- [12] Schwartz, A. B. (2004) "Cortical neural prosthetics", *Annual. Rev. Neurosci.*, vol. 27, pp. 487 – 507.
- [13] Kendall, M., Stuart, A., Ord, K. (1994) *Kendall's Advanced Theory Of Statistics, Vol. 1: Distribution Theory*. London: Hodder Arnold, 6th edition, 1994. 704 pg.
- [14] Jarque, C. M., and A. K. Bera. "A test for normality of observations and regression residuals.", *International Statistical Review*. Vol. 55, No. 2, 1987, pp. 163-172.