

VINÍCIUS NAVES REZENDE FARIA

**ANÁLISE DE SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS
OBTIDOS POR MATRIZES MICROELETRODO,
CALIBRADAS POR TESTES ESTOCÁSTIVOS
DESCRITIVOS DA ESTRUTURA DE DENSIDADE
DE PROBABILIDADE**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA

2021

VINÍCIUS NAVES REZENDE FARIA

**ANÁLISE DE SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS OBTIDOS POR
MATRIZES MICROELETRODO, CALIBRADAS POR TESTES
ESTOCÁSTIVOS DESCRIPTIVOS DA ESTRUTURA DE
DENSIDADE DE PROBABILIDADE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Engenharia Elétrica da
Universidade Federal de Uberlândia, como parte
dos requisitos para obtenção do título de **DOUTOR**
EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Orientador: João Batista Destro Filho

UBERLÂNDIA-MG
2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F224	Faria, Vinícius Naves Rezende, 1991-
2021	Análise de sinais eletrofisiológicos obtidos por matrizes de multieletrodo, calibradas por testes estocásticos descritivos da estrutura de densidade de probabilidade [recurso eletrônico] / Vinícius Naves Rezende Faria. - 2021.
<p>Orientador: João Batista Destro Filho. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Elétrica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.404 Inclui bibliografia.</p>	
<p>1. Engenharia elétrica. I. Destro Filho, João Batista ,1970-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.</p>	
CDU: 621.3	

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 3N - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3239-4707 - www.posgrad.feelt.ufu.br - copel@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia Elétrica			
Defesa de:	Tese de Doutorado, 288, PPGEELT			
Data:	Vinte e nove de julho de dois mil e vinte e um	Hora de início:	13:00	Hora de encerramento:
Matrícula do Discente:	11623EEL007			
Nome do Discente:	Vinícius Naves Rezende Faria			
Título do Trabalho:	Análise de sinais eletrofisiológicos obtidos por matrizes microeletrodo, calibradas por testes estocásticos descriptivos da estrutura de densidade de probabilidade.			
Área de concentração:	Processamento da informação			
Linha de pesquisa:	Engenharia biomédica			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Título: Aplicações clínicas do EEG para o estudo de indivíduos normais e pacientes em estado de coma Agência Financiadora: Sem financiamento Início 01/08/2014 Término 31/07/2017 No. do Projeto na agência: xxx. Professor Coordenador: João Batista Destro Filho.			

Reuniu-se por meio de videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica, assim composta: Professores Doutores: José Hiroki Saito - UFSCAR; Danilo Roman Campos - UNIFESP; Milena Bueno Pereira Carneiro - FEELT/UFU; Murilo Guimarães Carneiro - FACOM/UFU; João Batista Destro Filho - FEELT/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). João Batista Destro Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **João Batista Destro Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Hiroki Saito, Usuário Externo**, em 29/07/2021, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Milena Bueno Pereira Carneiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Murillo Guimarães Carneiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Roman Campos, Usuário Externo**, em 29/07/2021, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2882643** e o código CRC **1708D730**.

Resumo

O presente trabalho objetiva apresentar, discutir e caracterizar quantitativamente o sinal de culturas neuronais, captados por sistema MEA60 calibrado, levando-se em conta a evolução temporal da atividade elétrica ao longo das regiões geométricas deste dispositivo; além de aplicar a mesma análise ao componente de ruído deste sinal, composto por ruído de instrumentação e ruído biológico. Para tanto, a metodologia proposta comprehende a captação destes sinais por equipamento de captação MEA devidamente calibrado sob conceitos de metrologia e incerteza de medição aplicados, análise clássica baseada em *spikes* e *bursts* e, por fim, a descrição da estrutura de densidade de probabilidade por meio da quantificação da gaussianidade (porcentagem de segmentos não gaussianos – PSNG) e estacionariedade (porcentagem de segmentos não estacionários – PSNE). Os quantificadores ligados à densidade espectral de potência, de primeira ordem, mostram-se estatisticamente fracos em caracterizar as componentes do sinal MEA. No entanto, PSNG e PSNE foram capazes de caracterizar as etapas de crescimento da cultura celular neuronal, assim como, indicar potencial diferenciação entre os trechos de ruído biológico intrínsecos a este sinal. Isto é reforçado pelo resultado da análise de conglomerados. Na análise da componente do ruído biológico, ocorreu aumento de PSNE nas fases de início e morte celular em que as características estatísticas variaram ao longo do tempo e carregaram informações importantes não aleatórias no sentido estacionário ou gaussiano. Por fim, a fase de morte celular, uma fase biologicamente importante no que se refere a reações bioquímicas e celulares, naturais do processo de morte celular biológica, foi a fase que apresentou mais correlações entre as variáveis estudadas, mostrando certa organização biológica.

Palavras Chave: Matiz Microeletrodos MEA, Cultura Neuronal, Ruído Biológico, Gaussianidade e Estacionariedade.

Abstract

The present work aims to present, discuss, and quantitatively characterize the neuronal cultures signal, captured by a calibrated MEA60 system, taking into account the temporal evolution of electrical activity along the geometric regions of this device; in addition to applying the same analysis to the noise component of this signal, composed of instrumentation noise and biological noise. Therefore, the proposed methodology comprises the capture of these signals by MEA equipment properly calibrated under concepts of metrology and uncertainty of determination, classical analysis based on *spikes* and *bursts* and, finally, a description of the probability density structure through the quantification of Gaussianity (percentage of non-Gaussian segments - PSNG) and stationarity (percentage of non-stationary segments - PSNE). The quantifiers linked to the power spectral density, first order, prove to be statistically weak in characterizing as components of the MEA signal. However, PSNG and PSNE were able to characterize as growth stages of neuronal cell culture, as well as to indicate potential differentiation between the stretches of biological noise intrinsic to this signal. This is reinforced by the result of the cluster analysis. In the analysis of the biological noise component, there is an increase in PSNE in the phases of cell onset and death in which the statistical characteristics vary over time and carried important non-random information in the stationary or Gaussian sense. Finally, a cell death phase, a biologically important phase regarding biochemical and cellular reactions, natural to the biological cell death process, was a phase that showed more correlations between the variables studied, presenting a certain biological organization.

Keywords: *MEA Microelectrodes Array, Neuronal Culture, Biological Noise, Gaussianity and Stationarity.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Configuração do sistema MEA (Rodríguez 2015).....	8
Figura 2.2	Atividade elétrica padrão de uma cultura neuronal em MEA. Amplitude em μ V e o eixo horizontal, tempo, em segundos.....	13
Figura 2.3	Principais ruídos encontrados no sinal de culturas neuronais em MEA..	16
Figura 3.1	Diagrama causa-efeito para a medição de uma força peso (INMETRO, 2008).....	21
Figura 3.2	Distribuição Retangular (Adaptado BIPM et al., 2008).....	23
Figura 3.3	Distribuição Triangular (BIPM, et al., 2008).....	24
Figura 3.4	Resumo das etapas para aplicação do método Monte Carlo (BIPM, et al., 2008).....	28
Figura 3.5	Modelo de distribuição Normal (URL 4, 2016).....	29
Figura 3.6	Sistema de medição para aplicação dos conceitos de metrologia em potência.....	32
Figura 3.7	Erros máximos associados aos valores de potência de corte para todas as condições investigadas.....	33
Figura 4.1	Posicionamento e identificação dos canais MEA 60.....	36
Figura 4.2	Detecção de <i>spikes</i>	38
Figura 4.3	Detecção de <i>bursts</i>	38
Figura 4.4	Separação de trechos com preservação de tempo.....	39
Figura 4.5	Separação de trechos sem preservação de tempo.....	39
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.....	42
Figura 5.1	(A) Trecho do sinal bruto da MEA do canal 44 da DIV29 (B) Trecho do sinal bruto da MEA do canal 65 da DIV29.....	51

Figura 5.2	PSNE (%) no eixo vertical e janelamentos em ms de processamento no eixo horizontal para os diversos canais avaliados.....	52
Figura 5.3	PSNG (%) no eixo vertical e janelamentos de processamento em ms no eixo horizontal para os diversos canais avaliados.....	53
Figura 5.4	PSNE no eixo vertical e janelamentos de processamento no eixo horizontal para os diversos segmentos de ruído avaliados.....	54
Figura 5.5	PSNG no eixo vertical e janelamentos de processamento no eixo horizontal para os diversos segmentos de ruído avaliados.....	55
Figura 5.6	Resultados da Análise Clássica.....	57
Figura 5.7	Resultados do expoente alfa médio (A) para as DIV consideradas.....	58
Figura 5.8	Resultados do expoente de Hurst (H) para as DIV consideradas.....	58
Figura 5.9	ANOVA da variável <i>Nburst</i> para as três fases do crescimento celular <i>in vitro</i> , evidenciando diferença significativa entre a média de todas as fases.....	64
Figura 5.10	Box Plot da variável <i>Nburst</i> (número de <i>bursts</i>) para as três fases do crescimento celular <i>in vitro</i>	64
Figura 5.11	Box Plot da variável <i>Spike</i> Randômico para as três fases do crescimento celular <i>in vitro</i>	65
Figura 5.12	Resultados médios de PSNG para as DIV 8 a DIV 88 de um dos experimentos. Evidencia-se a variabilidade dos resultados pela janela de processamento (de 400 a 10.000 amostras, ou seja, de 40 a 1000 ms).....	66
Figura 5.13	Resultados médios de PSNE para as DIV 8 a DIV 88 de um dos experimentos. Evidencia-se a variabilidade dos resultados pela janela de processamento (de 400 a 10.000 amostras, ou seja, de 40 a 1000 ms).....	67
Figura 5.14	Resultado do cálculo da mediana dos PSNG de cada canal das DIV consideradas.....	68

Figura 5.15	Resultado do cálculo da mediana dos PSNG de cada canal das DIV consideradas.....	69
Figura 5.16	Distribuição geométrica da mediana do parâmetro PSNG.....	70
Figura 5.17	Distribuição geométrica da mediana do parâmetro PSNE.....	71
Figura 5.18	Resultado da análise de conglomerados para os resultados médios de PSNE.....	75
Figura 5.19	Resultado da análise de conglomerados para os resultados médios de PSNG.....	75
Figura 5.20	Resultados médios de PSNG e PSNE para os DIV registrados dos experimentos MEA considerados neste trabalho. Nesta figura foram identificadas as fases de crescimento celular.....	77
Figura 5.21	Box Plot da variável PSNE para as três fases do crescimento celular <i>in vitro</i> . PSNE B refere-se ao PSNE para o sinal bruto.....	79
Figura 5.22	Box Plot da variável PSNG para as três fases do crescimento celular <i>in vitro</i> . PSNE B refere-se ao PSNE para o sinal bruto.....	79
Figura 6.1	Comparativo espaço-temporal da média de PSNE do dia <i>in vitro</i> 8 ao 25 para: A. sinal de ruído instrumentação mais ruído biológico; B. Sinal bruto MEA (com atividade neuronal espontânea – <i>spikes e bursts</i>).....	84
Figura 6.2	Comparativo espaço-temporal da média de PSNE do dia <i>in vitro</i> 32 ao 64 para: A. sinal de ruído instrumentação mais ruído biológico; B. Sinal bruto MEA (com atividade neuronal espontânea – <i>spikes e bursts</i>).....	85
Figura 6.3	Comparativo espaço-temporal da média de PSNG do dia <i>in vitro</i> 8 ao 25 para: A. sinal de ruído instrumentação mais ruído biológico; B. Sinal bruto MEA (com atividade neuronal espontânea – <i>spikes e bursts</i>).....	86
Figura 6.4	Comparativo espaço-temporal da média de PSNG do dia <i>in vitro</i> 32 ao 64 para: A. sinal de ruído instrumentação mais ruído biológico; B. Sinal bruto MEA (com atividade neuronal espontânea – <i>spikes e bursts</i>).....	87
Figura 6.5	Box Plot da variável PSNE para as três fases do crescimento celular <i>in vitro</i> . PSNE R refere-se ao PSNE para o sinal de ruído biológico.....	89

Figura 6.6	Box Plot da variável PSNG para as três fases do crescimento celular <i>in vitro</i> . PSNG R refere-se ao PSNG para o sinal de ruído biológico.....	90
Figura 6.7	Valores médios de PSNG e PSNE comparativamente entre o sinal de ruído biológico e o sinal bruto da MEA.....	91
Figura 6.8	Histograma de densidade de frequência para a variável PSNE para o sinal bruto da MEA. A curva azul refere-se à fase de início do desenvolvimento; a curva verde representa a maturidade celular; e a curva vermelha, a fase de morte celular.....	93
Figura 6.9	Histograma de densidade de frequência para a variável PSNE para o sinal de ruído biológico da MEA. A curva azul refere-se à fase de início do desenvolvimento; a curva verde representa a maturidade celular; e a curva vermelha, a fase de morte celular.	94
Figura 6.10	Histograma de densidade de frequência para a variável PSNG para o sinal bruto da MEA. A curva azul refere-se à fase de início do desenvolvimento; a curva verde representa a maturidade celular; e a curva vermelha, a fase de morte celular.....	94
Figura 6.11	Histograma de densidade de frequência para a variável PSNG para o sinal de ruído biológico da MEA. A curva azul refere-se à fase de início do desenvolvimento; a curva verde representa a maturidade celular; e a curva vermelha, a fase de morte celular.....	95
Figura 6.12	Correlação entre as variáveis da fase de início do desenvolvimento celular.....	96
Figura 6.13	Correlação entre as variáveis da fase de maturidade celular.....	97
Figura 6.14	Correlação entre as variáveis da fase de morte celular.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Dias <i>in vitro</i> com registro pelo sistema MEA60 das culturas (experimentos) avaliados.....	49
Tabela 5.2	Resultados dos quantificadores de primeira ordem.....	51
Tabela 5.3	Análise Clássica aplicada ao sinal bruto (contendo ruído e atividade espontânea) captado pelos experimentos com MEA.....	60
Tabela 5.4	Resultados do teste Kolmogorov-Smirnov para normalidade das variáveis de análise clássica, DFA e HURST.....	61
Tabela 5.5	Resultados da aplicação da ANOVA de único critério com teste F-teste e Tukey para análise das diferenças entre as médias amostrais para análise clássica, expoente alfa e expoente Hurst...	62
Tabela 5.6	PSNE e PSNG médio de todos os dias <i>in vitro</i> de todos os experimentos de atividade neural espontânea analisados.....	73
Tabela 5.7	Teste Kolmogorov-Smirnov aplicado à média de PSNE e PSNG das DIV dos experimentos analisados.....	74
Tabela 5.8	Descritores da estrutura de densidade de probabilidade PSNG e PSNE aplicados ao sinal bruto (contendo ruído e atividade espontânea) captado pelos experimentos com MEA.....	76
Tabela 5.9	Resultados da aplicação da ANOVA de único critério com teste F-teste e Tukey para análise das diferenças entre as médias amostrais considerando PSNG e PSNE.....	78
Tabela 6.1	Descritores da estrutura de densidade de probabilidade PSNG e PSNE aplicados ao sinal de ruído biológico (retirando-se os <i>spikes</i> e <i>bursts</i>) captado pelos experimentos com MEA.....	83
Tabela 6.2	Resultados da aplicação da ANOVA de único critério com teste F-teste e Tukey para análise das diferenças entre as médias amostrais considerando PSNG e PSNE no sinal de ruído biológico.....	88

ÍNDICE DE SIGLAS

MEA	Microelectrode array
ISI	Inter <i>Spike</i> Interval
ADC	Analog Digital Converter
GFP	Green fluorescent protein
SI	Sistema Internacional de Unidades
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
OIML	Organisation Internationale de Métrologie Légale
RTM	Regulamentos Técnicos Mercosul
MMC	Método de Monte Carlo
FDP	Função Densidade de Probabilidade
PDL	Poli-D-Lisina
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hank
Ara-C	Citosina Arabinosídeo Trifosfato
IBI	Inter <i>Burst</i> Interval
DFA	Análise de Flutuações Destendenciadas
H	Expoente de Hurst
MRT	Mean Ratio Test
JB	Jarque-Bera
LM	Teste do multiplicador de Lagrange

PSNE	Porcentagem dos Segmentos não Estacionários
PSNG	Porcentagem dos Segmentos não Gaussianos
DIV	Dia <i>in vitro</i>
Nburst	Número de <i>Bursts</i>
ANOVA	Análise de Variância
CV	Coeficiente de Variação

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
<i>Objetivo Principal.....</i>	3
<i>Objetivos Secundários.....</i>	3
1.2 Principais Contribuições.....	4
1.3 Capítulos.....	5
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Matriz Microeletrodos (MEA).....	6
2.2 Cultura de Células Neurais.....	10
<i>Etapa 1: Dia In vitro (DIV 1 – DIV7) (1^a Semana In vitro – SIV).....</i>	10
<i>Etapa 2: DIV8 – DIV14 (2^a SIV).....</i>	11
<i>Etapa 3: DIV15 – DIV28 (3^a e 4^a SIV).....</i>	11
<i>Etapa 4: DIV29 – DIV35 (5^a SIV).....</i>	11
2.3 Atividade Espontânea e Ruído Biológico.....	12
CAPÍTULO III – CALIBRAÇÃO E INCERTEZA DE MEDAÇÃO.....	19
3.1 Incerteza de Medição.....	20
<i>Método proposto no GUM.....</i>	20
<i>Método de Monte Carlo.....</i>	26
<i>Teste de Normalidade.....</i>	29
3.2 Aplicação dos conceitos de metrologia no cálculo de Potência.....	31

CAPÍTULO IV – METODOLOGIA.....	34
4.1 Preparação da cultura de células neurais.....	34
<i>Fase 1: Preparação da pré-cultura.....</i>	34
<i>Fase 2: Dissecção.....</i>	35
<i>Fase 3: Dissociação das células.....</i>	35
<i>Fase 4: Manutenção da cultura.....</i>	36
4.2 Aquisição dos sinais MEA.....	36
4.3 Análise Clássica.....	37
4.4 Extração dos Trechos de Ruído.....	38
4.5 Quantificadores Não-Lineares.....	39
<i>Expoente α.....</i>	40
<i>Expoente Hurst.....</i>	41
<i>Mean Ratio Test – MRT.....</i>	41
<i>Jarque-Bera – JB.....</i>	43
<i>Análise de Conglomerados.....</i>	46
CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÕES ANÁLISE CLÁSSICA E DESCRIPTORES DA ESTRUTURA DE DENSIDADE DE PROBABILIDADE DO SINAL BRUTO	48
5.1 Incerteza de Calibração aplicada à Potência.....	50
5.2 Quantificadores de Primeira Ordem.....	50
5.3 Resultados exploratórios da Análise Clássica, Expoente Alfa e Expoente Hurst	55
5.4 Análise Clássica, Expoente Alfa e Expoente Hurst por fases do crescimento celular	59

5.5 Descritores da Estrutura de Densidade de Probabilidade no Sinal Bruto: PSNE e PSNG	65
<i>Resultados de PSNE e PSNG pela janela de processamento.....</i>	66
<i>Resultados de PSNE e PSNG na caracterização do crescimento da cultura neuronal</i>	67
<i>Análises estatísticas dos resultados médios de PSNE e PSNG</i>	72
CAPÍTULO VI - RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS DESCRIPTORES DA ESTRUTURA DE DENSIDADE DE PROBABILIDADE APLICADOS AO RUÍDO BIOLÓGICO	80
<i>Análises estatísticas dos resultados médios de PSNE e PSNG no sinal de ruído biológico sob espectro geométrico da cultura de células</i>	80
<i>Análises estatísticas dos resultados médios de PSNE e PSNG no sinal de ruído biológico</i>	82
<i>Comparação dos resultados médios de PSNE e PSNG no sinal de ruído biológico e sinal bruto</i>	89
<i>Correlação das variáveis descritoras do sinal de atividade espontânea e ruído biológico da MEA</i>	95
CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES.....	99
<i>Quantificadores baseados em densidade espectral de potência.....</i>	99
<i>Análise Clássica.....</i>	99
<i>PSNE e PSNG.....</i>	100
<i>Ruído biológico no sinal MEA.....</i>	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Desde o desenvolvimento da matriz microeletrodo (*microelectrode array - MEA*), na década de 70, ela é considerada como uma tecnologia potencialmente útil para estudos de processamento de informações em redes do sistema nervoso (COLOMBI, TINARELLI, *et al.*, 2016, MERCER, WHITE, 1978). Estes dispositivos são matrizes de eletrodos extracelulares integradas ao substrato, mantidas permanentemente em contato com neurônios em cultura e capazes de registrar os sinais bioelétricos destas culturas celulares de maneira não destrutiva (NAPOLI, OBEID, 2016, OBIEN, DELIGKARIS, *et al.*, 2015, POTTER, DEMARSE, 2001). Em contraposição aos métodos invasivos, o uso de MEA para gravações *in vitro* e *in vivo* afeta apenas temporariamente os sinais bioelétricos, permitindo o registro e estimulação simultâneos de grandes populações de células excitáveis sem causar danos à membrana plasmática do neurônio (CLAVEROL-TINTURÉ, GHIRARDI, *et al.*, 2005, OBIEN, DELIGKARIS, *et al.*, 2015, VASSALLO, CHIAPPALONE, *et al.*, 2017).

As interfaces neuronal-eletrônica baseadas em MEA, dentre suas várias aplicações, como na farmacologia e nos neuroimplantes (CHIAPPALONE, 2003), também proporcionam o estudo da rede neuronal. Isto inclui a dinâmica da rede, a plasticidade neuronal a curto prazo e a longo prazo, a excitotoxicidade, efeitos de tratamentos farmacológicos, mecanismos subjacentes às condições patológicas e o crescimento da cultura de células neurais (OBIEN, DELIGKARIS, *et al.*, 2015, SPIRA, HAI, 2013).

Em condições adequadas, a maioria das células pode viver, reproduzir-se e até mesmo expressar suas propriedades em uma placa de cultura, ou seja, *in vitro* (ALBERTS, BRAY, *et al.*, 2011). Diversos artigos da literatura se dedicam ao estudo do processo de

conexão funcional entre as células e os microeletrodos, o que possibilita a compreensão acerca da formação das redes neurais biológicas e de suas características (CHIAPPALONE, BOVE, *et al.*, 2006, COTTERILL, HALL, *et al.*, 2016, VAN PEEL, VAJDA, *et al.*, 2005).

O papel da atividade neuronal espontânea no processo de crescimento celular está relacionado às características de estabilidade e plasticidade dos padrões de atividade. Por outro lado, a apoptose (morte celular fisiológica) é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas observadas em condições de estresse. Já o processo de morte celular por necrose é induzido por uma abrupta perturbação ambiental das condições fisiológicas (SIMONIAN, COYLE, 1996). Todos estes fenômenos são passíveis de registro sob a forma de sinal da MEA que, por sua vez, se constitui do sinal bioelétrico da atividade neuronal espontânea, ruído de instrumentação e ainda, um componente muito importante, denominado ruído biológico.

O ruído transpassa a biologia em todos os seus níveis, afetando inevitavelmente da mais básica molécula à dinâmica dos processos celulares (GONZE, GÉRARD, *et al.*, 2018), tecidos, órgãos, organismos e populações (TSIMRING, 2014). Os sistemas biológicos desenvolveram mecanismos reguladores para garantir robustez em relação ao ruído ou para tirar proveito da estocasticidade (GONZE, GÉRARD, *et al.*, 2018). Portanto, a função do ruído biológico varia bastante, mas está presente no aumento de entropia da produção de mutações aleatórias, melhoria do transporte intracelular de biomoléculas e aumento da capacidade de informação das vias de sinalização (TSIMRING, 2014). Esta última envolve mensagens de codificação e decodificação, e uma comunicação confiável entre as células e entre as células e o ambiente (KHOLODENKO, 2006).

Os sinais de MEA e ruído tem amplitudes muito baixas, na faixa de mV, portanto o uso e manutenção inadequada deste equipamento de captação, efeitos de sobrecarga, choques, quedas, falta de manutenção e calibração podem levar a erros de indicação que excedem os erros máximos. Isto reforça a necessidade da aplicação dos conceitos de metrologia, calibração e ajustes neste estudo e condução dos experimentos.

Através de experimentos desenvolvidos neste trabalho, as etapas de evolução celular serão apresentadas, discutidas e caracterizadas quantitativamente, levando-se em conta a evolução temporal da atividade elétrica ao longo das regiões geométricas da MEA, e, portanto, da cultura de células, como também as etapas finais de morte celular. Além disso, será avaliado e caracterizado os componentes de ruído do sinal MEA. A compreensão dos fundamentos do processamento natural do ruído biológico fornecerá

princípios para o aperfeiçoamento sintético e a modulação do ruído em sistemas vivos, permitindo avanços na biologia sintética, engenharia de tecidos, terapêutica, nanobiotecnologia (DAR, WEISS, 2018) e outras áreas da neurociência.

1.1 Objetivos

Objetivo Principal

Analizar o sinal MEA e seus componentes através de testes estocásticos a fim de descrever a estrutura de densidade de probabilidade deste sinal captado por sistema MEA60 calibrado.

Objetivos Secundários

- Aprimoramento de método de análise quantitativa não linear para análise da gaussianidade e estacionariedade do sinal MEA e seus componentes;
- Análise quantitativa, geométrica e temporal do sinal bruto da MEA, composto pela atividade neuronal espontânea e ruído, a fim de caracterizar as fases de crescimento da cultura celular neural.
- Aplicação dos conceitos de metrologia e incerteza de medição sobre o cálculo de potência dos sinais MEA.
- Análise quantitativa, geométrica e temporal do componente ruído do sinal MEA, composto pelo ruído biológico e ruído de instrumentação;
- Avaliação dos parâmetros estatísticos sensíveis a sinais de MEA que possam ser utilizados para distinguir e quantificar alterações;
- Comparação de resultados obtidos pelo sinal bruto MEA e pelo sinal de ruído MEA por meio da abordagem proposta neste trabalho;

1.2 Principais Contribuições

Este trabalho contribui com as pesquisas de sinais elétricos espontâneos advindos de cultura de células neuronais *in vitro* à medida que desenvolve novos quantificadores para o processamento deste sinal, assim como considera e analisa a componente de ruído biológico deste sinal. Com este trabalho foi possível verificar que a diferenciação entre estes trechos de sinal bruto MEA é estatisticamente fraca para quantificadores ligados à densidade espectral de potência. Desta forma, foram propostos quantificadores de ordem elevada (PSNG e PSNE) para representar as características deste sinal biomédico.

Os resultados de processamento do sinal apresentados permitem depreender que os parâmetros PSNE e PSNG, que analisam estacionariedade e gaussianidade, respectivamente, foram capazes de diferenciar trechos de sinais constituídos por apenas ruídos biológicos ou mesmo do sinal bruto de MEA

Portanto, foi possível denotar que ao longo do tempo de vida da cultura, as características de estacionariedade e gaussianidade se modificam, sendo possível estabelecer um paralelo com o ciclo de vida clássico deste preparo biológico. Além disso, a componente do ruído biológico no crescimento de células neuronais *in vitro* não se assemelha a um sinal puramente gaussiano, ou ao ruído branco gaussiano formado por sinal aleatório, de densidade espectral constante em distribuição normal e média zero.

Sobre a fase de processo de morte celular, característica por desorganização biológica e explosão bioquímica, este trabalho indicou certa organização da rede, com alta densidade em 30% de PSNE e esparreamento relativo menor das caudas com classes de 20% a 40% no histograma de distribuição de frequências. Esta fase é a que apresenta mais correlações entre as variáveis estudadas, havendo inclusive alta correlação positiva entre a não gaussianidade do sinal bruto em relação ao sinal de ruído biológico; assim como entre a não estacionariedade do sinal bruto em relação à não gaussianidade do sinal de ruído biológico.

1.3 Capítulos

Este trabalho constitui-se por mais quatro capítulos organizados da seguinte forma:

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica e Estado da Arte referente à matriz de microeletrodos MEA e suas aplicações; cultura de neurônios e crescimento destas culturas em MEA; atividade neuronal espontânea, ruído de propriedades elétricas da instrumentação e ruído biológico.

Capítulo 3: Conceitos de calibração e incerteza de medição importantes para o guia das medições realizadas em dados biológicos *in vitro*

Capítulo 4: Apresenta a metodologia proposta para desenvolvimento do trabalho, a qual é composta das seguintes etapas: a) preparação da cultura de células neurais, b) aquisição dos sinais MEA e instrumentação, c) análise clássica dos sinais MEA, d) quantificadores não lineares para análise da estrutura de densidade de probabilidade.

Capítulo 5: Análise e discussão dos resultados obtidos por meio dos experimentos realizados e da plataforma de quantificadores não lineares desenvolvida aplicada ao sinal bruto da MEA.

Capítulo 6: Análise e discussão dos resultados obtidos por meio dos experimentos realizados e da plataforma de quantificadores não lineares desenvolvida aplicada ao sinal de ruído da MEA.

Capítulo 7: Conclusões e considerações finais, bem como, de sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta o estado da arte e os fundamentos teóricos necessários para desenvolvimento do trabalho, são eles: Matriz de microeletrodos MEA e suas aplicações; cultura de neurônios e crescimento destas culturas em MEA; atividade neuronal espontânea, ruído de propriedades elétricas da instrumentação e ruído biológico.

2.1 Matriz Microeletrodos (MEA)

Objetivando compreender, representar, manipular e ampliar o sistema nervoso, a neuroengenharia desenvolve mecanismos microtecnológicos que interpretam o impulso bioquímico de um neurônio, o convertendo em sinais elétricos, e o registrando sob a forma de sinal digital discreto (MARQUES, 2012). Um exemplo destes dispositivos é a matriz de microeletrodos (MEA), que permite o estudo das leis que fundamentam o comportamento da rede neuronal (FERGUSON, SHARMA, *et al.*, 2019, GROSS, WEN, *et al.*, 1985, JIMBO, Y., TATENO, *et al.*, 1999, MAROM, SHAHAF, 2002, POTTER, DEMARSE, 2001) .

A MEA basicamente se trata de um arranjo de microeletrodos planares que se tornou uma plataforma experimental popular para estudos eletrofisiológicos de redes neurais para modelos *in vitro* (KIM, Raeyoung, JOO, *et al.*, 2014). Este arranjo permite registrar sinais neuronais extracelulares simultaneamente por meio de centenas de eletrodos sob

uma plataforma de medição espaço-temporal, com uma interface célula-eletrodo não invasiva, o que possibilita um registro de longo prazo e a aplicação de estímulos externos a partir destes mesmos eletrodos (ASSIS, 2011, KIM, Raeyoung, JOO, *et al.*, 2014)

(THOMAS, SPRINGER, *et al.*, 1972) descreveu o primeiro Arranjo Multieletrodo que consistia em duas filas constituídas por 15 microeletrodos de ouro platinado, distanciados em 100 µm, embutidos em um substrato de vidro e passivados por fotorresistência, permitindo registrar potenciais de campo de concentrações espontâneas de cardiomiócitos em cultura. Desde então, surgiram os primeiros estudos bem-sucedidos como (GROSS, 1979, PINE, 1980) que relataram experiências com células ganglionares cervicais superiores cultivadas e células ganglionares do caracol *Helix pomatia*, respectivamente. Já o estudo de (GROSS, RHOADES, *et al.*, 1995) foi pioneiro na análise de padrões de atividade elétrica recorrente de potenciais de ação em culturas neuroniais obtidas da medula espinhal de rato. E por fim, o pioneirismo no campo farmacológico foi marcado pelo trabalho de (GROSS, RHOADES, *et al.*, 1992) que demonstrou alternância entre diferentes modelos de atividade de *burst* por meio de aplicação de agentes farmacológicos externos.

A Figura. 2.1 ilustra os principais componentes que formam o sistema MEA60. Observa-se a interface MEA, com ampliação do centro da placa contendo os microeletrodos. Quando os neurônios são cultivados nesta placa MEA, eles aderem à superfície e fazem contato direto com microeletrodos (KIM, Raeyoung, JOO, *et al.*, 2014). Estes são os componentes capazes de registrarem potenciais de ação extracelular das membranas ativas do neurônio e podem ser usados para fornecer cargas elétricas para estimular o material cultivado. De cada microeletrodo parte uma trilha isolada eletricamente que leva o sinal elétrico captado até o sistema de amplificação. Completam o sistema MEA60, um controlador de temperatura, para manutenção de condições de sobrevivência da cultura celular, um equipamento para aquisição de sinais (digitalização do sinal) e um computador para processamento e armazenamento do sinal (RODRÍGUEZ, 2015).

Para a fabricação da MEA, ouro, platina ou óxido de índio-estanho (ITO) são usados para a constituição dos microeletrodos, linhas condutoras e blocos de contato elétricos para dispositivos de instrumentação externos. O tamanho destes microeletrodos é aproximadamente igual ao das células (10 a 100 µm de diâmetro) colocados em um substrato de vidro. Ao utilizar-se de ouro ou platina, é necessária uma camada de metal adicional, como titânio ou cromo, para promover a adesão entre o substrato de vidro e

o metal (CHANG, BREWER, *et al.*, 2000, KIM, Raeyoung, JOO, *et al.*, 2014, XIE, LIN, *et al.*, 2012).

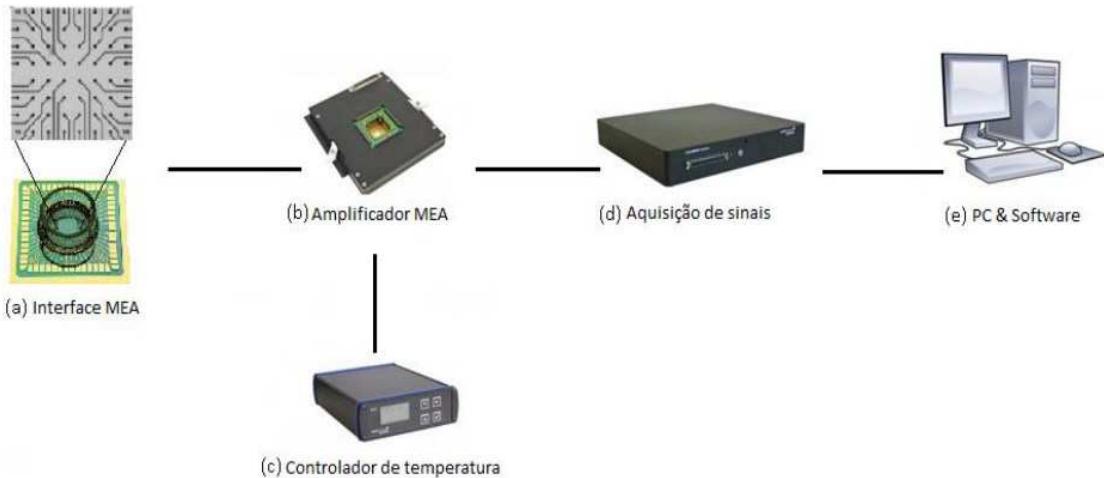


Figura 2.1 – Configuração do sistema MEA (RODRÍGUEZ, 2015).

Cada eletrodo é isolado eletricamente dos demais por nitrato de silicone e apenas a extremidade dos eletrodos é revestida de material condutor. Tipicamente, os eletrodos são alinhados em uma grade de 50 a 500 μm de separação entre os eixos dos eletrodos (JOHNSTONE, GROSS, *et al.*, 2010). Devido à baixa diferença de potencial elétrico e o posicionamento estático dos eletrodos, as etapas de redução de ruídos e amplificação dos registros é crucial para uma boa qualidade do registro.

Os eletrodos também devem ser biocompatíveis, com duração de longo prazo e de baixa impedância (500 $\text{k}\Omega$ a 1 kHz). Estas são características fundamentais para um baixo ruído térmico. A superfície da MEA e dos eletrodos é revestida com isolantes biocompatíveis (poliamida, óxido/nitreto de silício) que evitam curto-circuito. Estes isolantes, revestidos com moléculas de adesão (polilisina e laminina) permitem a adesão do neurônio à superfície do dispositivo (TAKETANI, BAUDRY, 2006).

Este sistema integra o aparato experimental de diversas pesquisas em neurociências. Na área da codificação neural, verifica-se a utilização de culturas que permitem a indução de padrões de aprendizado, de reconhecimento e de processamento. Também se utiliza MEAs planares para criar ou melhorar métodos que avaliam as combinações de cultura para o estudo de substâncias tóxicas. Na farmacologia, destaca-se o monitoramento da atividade elétrica dos neurônios por um longo período de tempo, pois

a MEA se mostra um biossensor ideal *in vitro* para monitorar efeitos crônicos e agudos de drogas e toxinas (CHIAPPALONE, 2003). O uso de redes neurais na MEA foi proposto como uma abordagem de rastreio para identificação de potenciais efeitos neuroativos ou neurotóxicos das substâncias de ensaio em diversos trabalhos (MCCONNELL, MCCLAIN, *et al.*, 2012, SCHULTZ, ZURICH, *et al.*, 2015). (VALDIVIA, MARTIN, *et al.*, 2014) também verificou que o uso de MEA para esta finalidade provê um aprimoramento nos resultados do ensaio.

O recente trabalho de (VASSALLO, CHIAPPALONE, *et al.*, 2017) conduziu um estudo em que as medições da atividade espontânea de culturas neuronais primárias tratadas com três neurotóxicos (*Deltamethrin*, *Domoic Acid* e *Chlorpyrifos oxon*) ou três compostos não neurotóxicos (*Dimethyl Phthalate*, *Glyphosate* e *Acetaminophen*) foram avaliadas através de quatro diferentes laboratórios. Demonstrou-se que a avaliação da rede neural usando células corticais roedores primários cultivados em MEA fornece informações sobre potencial neurotoxicidade aguda de compostos. Vale ressaltar que estes resultados foram obtidos apesar das diferenças substanciais em ambos os métodos empregados e modelo de sistemas utilizados, o que é um indicador da robustez do sistema MEA para identificar componentes causadores de alterações eletrofisiológicas.

Alguns esforços atuais relacionados à tecnologia de MEA estão atentos ao desenvolvimento de protocolos de análise de dados padronizados. Além disso, empresas como a *NeuroProff GmbH*, tem desenvolvido protocolos em que centenas de parâmetros são avaliados em uma rede neural funcional. Na prática, esta análise foca em diferentes parâmetros, em geral, atividade de *spikes* e *bursts*, duração e frequência (HARDINGHAM, BADING, 2010).

Recentemente, um importante trabalho com MEA foi conduzido por (SAKAI, SHIMBA, *et al.*, 2015) e colaboradores. Para estudar como a bainha de mielina anormal afeta as atividades neuronais a nível de rede, esta pesquisa desenvolveu um dispositivo para avaliação das relações entre mielinização e condução de múltiplos axônios. Neste trabalho, a cultura de neurônio-OL (oligodendrócito) foi desenvolvida e mantida por 42 dias *in vitro* em microtúneis, e foi possível detectar a condução axonal de axônios individuais, assim como, as alterações dependentes de OL na velocidade de condução. O dispositivo de cultura foi desenvolvido combinando um substrato MEA e uma câmara de cultura, constituída por dois grandes compartimentos de cultura interconectados por 10 microtúneis. O processo de fabricação deste substrato MEA e câmaras de cultura

também foi descrito em (JIMBO, Yasuhiko, KASAI, *et al.*, 2003) e (TAKEUCHI, NAKAFUTAMI, *et al.*, 2011).

2.2 Cultura de Células Neurais

A maioria das células possuem capacidade de reproduzir e expressar suas propriedades em uma placa de cultura *in vitro*, quando sob condições adequadas (ALBERTS, BRAY, *et al.*, 2011). As culturas estabelecidas diretamente de um tecido vivo são denominadas culturas primárias, quando esta cultura passa pelo processo de repique e é depositada sobre uma nova placa para a expansão celular, esta cultura derivada recebe o nome de cultura secundária (MARQUES, 2012).

O procedimento para obtenção de culturas primárias de neurônios passa pela obtenção de neurônios do córtex e do hipocampo cerebral a partir da dissecação seguida da dissociação. Nesta última etapa, o material coletado passa por diversas digestões enzimáticas e subsequente maceração, o que permite maior homogeneidade na amostra final. Por fim, a cultura é mantida em uma estufa umedecida a 37 °C, com atmosfera de 5% CO₂. O meio nutritivo é trocado a cada quatro dias por meio fresco e o cultivo é realizado em monocamada, com inibição do crescimento de células da glia. Os experimentos são conduzidos após duas semanas de manutenção nas condições citadas (NOVELLINO, CHIAPPALONE, *et al.*, 2003). Os principais fenômenos do crescimento da cultura e algumas interpretações fisiológicas podem ser subdivididas por 4 etapas.

Etapa I: Dia In vitro (DIV 1 – DIV7) (1^a Semana In vitro – SIV)

Há pequena quantidade de *spikes* aleatórios em todos os canais. Através de microscopia eletrônica é possível observar tipos imaturos de sinapses e densidade sináptica baixa, o que justifica a inexistência de *bursts*, predominando conexões próximas (tipo junção gap) (CHIAPPALONE, BOVE, *et al.*, 2006). Pode-se considerar os neurônios isolados (VAN PEELT, VAJDA, *et al.*, 2005).

Etapa 2: DIV8 – DIV14 (2^a SIV)

Pequena quantidade de *bursts* de longa duração (1 segundo) (VAN PELET, WOLTERS, *et al.*, 2004), inicialmente presentes em alguns canais, mas expandindo-se para os demais. O aumento da sinaptogênese química estabelece conexões distantes, processo mediado pelas vias glutamatérgicas e/ou receptores AMPA, tal que a taxa média de disparos atinge 1,4 *spikes/s* em DIV14 (CHIAPPALONE, BOVE, *et al.*, 2006). Em DIV14 ocorre um pico na quantidade de *spikes* em um *burst* e o tempo médio de duração dos *bursts* alcança seu máximo. Há baixo mecanismo de inibição sináptica e a rede de conexões pode ser considerada imatura (VAN PELET, WOLTERS, *et al.*, 2004).

Etapa 3: DIV15 – DIV28 (3^a e 4^a SIV)

Grande quantidade de *bursts* de curta duração (30 ms) (VAN PELET, VAJDA, *et al.*, 2005, VAN PELET, WOLTERS, *et al.*, 2004) com padrões repetitivos periódicos, presente em quase todos os canais, mostrando um sincronismo e grande variabilidade no processo de geração dos *bursts*. Aumenta-se as conexões sinápticas próximas e diminui-se as distantes. Entre DIV15 e DIV20 (TATENO, KAWANA, *et al.*, 2002) evidencia-se forte atuação de receptores antagonistas do tipo receptor GABA. (KAMIOKA, MAEDA, *et al.*, 1996) sugere que o influxo de íons de cálcio, associado aos intensos *bursts*, dispara mecanismos de sinalização celular responsáveis pelo desenvolvimento das sinapses. Há a completa maturação das conexões excitatórias, consequência da ação do receptor NMDA (observa-se taxa média de disparos de 2,2 *spikes/s* em DIV21 e pico na taxa média de *bursts* (CHIAPPALONE, BOVE, *et al.*, 2006, KAMIOKA, MAEDA, *et al.*, 1996). A partir de DIV22 reduz-se as sinapses nos dendritos, o que equilibra a excitação e inibição, diminuindo-se o tempo médio de *bursts* (VAN PELET, WOLTERS, *et al.*, 2004).

Etapa 4: DIV29 – DIV35 (5^a SIV)

Grande quantidade de *spikes* aleatórios, porém, sincronizados (KAMIOKA, MAEDA, *et al.*, 1996) em todos os canais. Isto ocorre pelo declínio transitório de sinapses. Taxas médias de disparo passam a 1,7 *spikes/s* para DIV28 e 1,3 *spikes/s* para DIV35. O padrão *bursts* mantém-se estável revelando que o padrão de conectividade sináptica

atingiu a maturidade ou estabilização. Neste momento a cultura é capaz de apresentar formas rudimentares de aprendizado ou memória, ou de ser influenciada por estímulos externos sensoriais (CHIAPPALONE, BOVE, *et al.*, 2006, VAN PELT, VAJDA, *et al.*, 2005).

No processo de crescimento celular, os neurônios têm características de estabilidade (mantém atividade espontânea constante) e plasticidade (executam bem a transição dos estados de atividade espontânea – etapas 1 e 2, com *spikes* e *bursts* aleatórios - para aquelas com disparos padronizados – etapas 3 e 4) nos seus padrões de atividades. Durante a etapa 3 há o desenvolvimento de canais iônicos voltagem-dependentes, os quais contribuem para o crescimento das células, em contraste às junções gap da etapa 1.

Os sinais registrados destas culturas são compostos de unidades básicas chamadas *spikes*, *bursts*, ruído biológico e ruído de instrumentação. Atualmente, sabe-se que a atividade de *spikes* constitui uma informação biológica importante, denominando os instantes de tempo em que essa atividade não ocorre como ruído biológico

2.3 Atividade Espontânea, Ruído Biológico

Sinais extracelulares registrados de culturas neuronais, por meio da MEA, são compostos de unidades básicas chamadas *spikes* (COLOMBI, TINARELLI, *et al.*, 2016), *bursts*, ruído biológico e ruído de instrumentação. O foco do conhecimento neurofisiológico atual é baseado no fato de que a atividade de *spikes* constitui uma das informações biológicas mais importantes, denominando os instantes de tempo em que essa atividade não ocorre como atividade basal, composta pelo ruído biológico e de instrumentação (CHIAPPALONE, BOVE, *et al.*, 2006, KANDEL, SCHWARTZ, *et al.*, 2000, SCARSI, TESSADORI, *et al.*, 2015), Fig 2.2. A análise clássica destes *spikes* (COTTERILL, HALL, *et al.*, 2016, GLASER, RUCHKIN, 1977) não leva em conta os segmentos de ruído biológico (KANDEL, SCHWARTZ, *et al.*, 2000), consequentemente há uma perda de informação biológica.

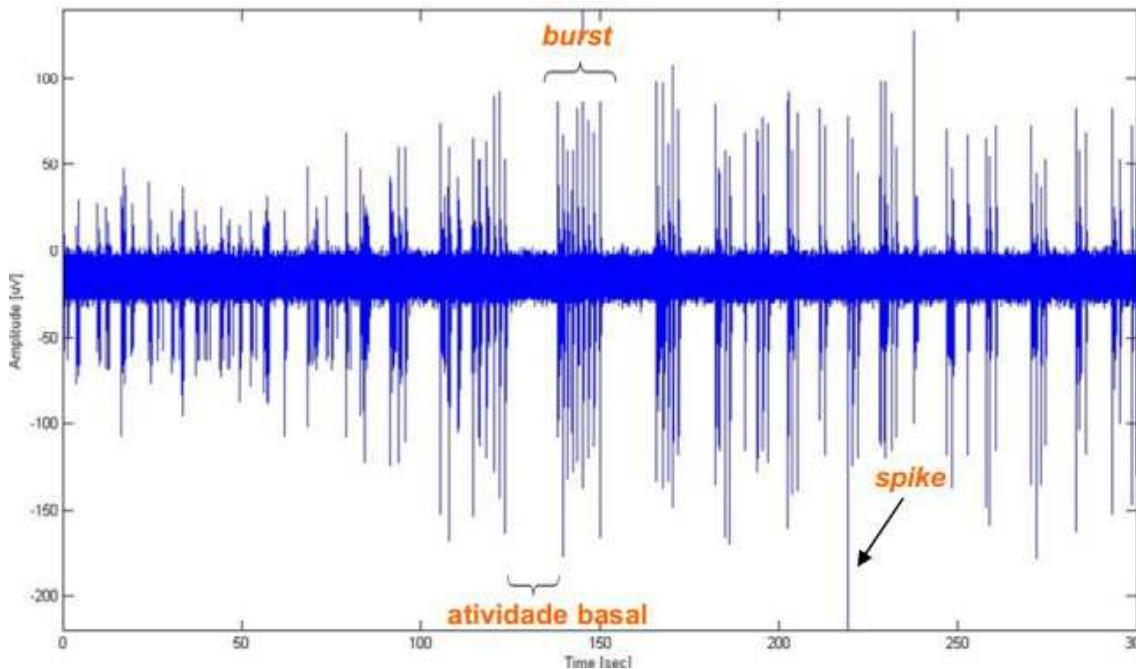


Figura 2.2 – Atividade elétrica padrão de uma cultura neuronal em MEA. Amplitude em μ V e o eixo horizontal, tempo, em segundos.

No entanto, o ruído biológico desempenha um papel muito importante, como apontado por diversos trabalhos dedicados à sua análise no contexto do sistema nervoso (DRAGAS, VISWAM, *et al.*, 2017, HENNINSON, ILLES, 2017, ROCHA, SCHLETT, *et al.*, 2016). 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 (VASSALLO, CHIAPPALONE, *et al.*, 2017). 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 (ARRIAGA, 2009, DRAGAS, VISWAM, *et al.*, 2017, FATT, KATZ, 1950, HENNINSON, ILLES, 2017, ROCHA, SCHLETT, *et al.*, 2016, SCARSI, TESSADORI, *et al.*, 2015).

O processamento clássico de *spikes* pressupõe que o ruído presente seja totalmente gaussiano, especialmente para os dados intracelulares, a fim de permitir um tratamento matemático simples. No entanto, poucos trabalhos na literatura (KIM, Sunghan, MCNAMES, 2007, NENADIC, BURDICK, 2005, SERLETIS, BARDAKJIAN, *et al.*, 2012, VASSALLO, CHIAPPALONE, *et al.*, 2017) analisam o ruído que perturba registros extracelulares.

A origem do ruído biológico pode ser atribuída a diversos fatores e é naturalmente associada à atividade elétrica espontânea. O ruído é classificado como ruído sensorial (transdução de sinais externos em sinais elétricos para o sistema nervoso); ruído celular (canais iônicos de membranas excitáveis); e ruído motor (associado a neurônios motores e músculos) (FAISAL, SELEN, *et al.*, 2008).

Em diversos trabalhos o ruído é manipulado como um problema fundamental para o processamento da informação, afetando nocivamente todos os aspectos funcionais do sistema nervoso. Todavia, deve-se pontuar os benefícios do ruído ao considerar a ressonância estocástica como a capacidade de sistemas em detectar e transmitir sinais fracos (FAISAL, SELEN, *et al.*, 2008). Observações de (FATT, KATZ, 1950), na década de 50, já apontavam que o ruído biológico elétrico poderia produzir importantes efeitos fisiológicos. Este estudo avaliou como a agitação termal dos íons altera o potencial resistor das células, gerando pequenas flutuações estatísticas na ordem de milivolts, e alterando, por consequência, o limiar visual das células receptoras.

A nível cerebral, já existem evidências de que há importante conteúdo dinâmico no componente denominado ruído biológico ou variabilidade (FAISAL, SELEN, *et al.*, 2008, SERLETIS, BARDAKJIAN, *et al.*, 2012), com contribuição significativa na dinâmica cerebral com um todo (CHIALVO, 2010). A nível celular, há indicações de que ele está presente através de fontes intrínsecas (combinação de variações moleculares estocásticas) e extrínsecas (processos extracelulares e microvariações ambientais) (ARRIAGA, 2009, HILL, ZHANG, 2004, SERLETIS, BARDAKJIAN, *et al.*, 2012).

Diversas fontes de ruído biológico estocástico foram elucidadas em outros recentes trabalhos, porém, é importante advertir o não esgotamento de todas as fontes. Dentre as principais origens de ruído biológico pode-se destacar o ruído térmico (relacionado à agitação térmica dos condutores elétricos); difusão estocástica molecular (interações moleculares durante a sinalização de cálcio nos dendritos espinhais); ruído de *crosstalk* (transbordamento de vesículas sinápticas em neurônios adjacentes); neurotransmissores sinápticos lançados (tanto o número de neurotransmissores quanto o número de receptores pós-sinápticos ativos são variáveis randômicas); plasticidade de curto-prazo; ruído de membrana e canais de íons; barragens sinápticas (ligado às conexões sinápticas com outros neurônios); expressão genética estocástica (propriedades biofísicas intrínsecas); conectividade da rede neural (conexão entre neurônios corticais para formar uma estrutura irregular); entradas sensoriais (distúrbios externos ou internos); e ruído motor (movimentos induzidos por fibras musculares) (DEFELICE, 1981, DESTEXHE, RUDOLPH, 2004, FAISAL, SELEN, *et al.*, 2008,

JACOBSON, DIBA, *et al.*, 2005, NAPOLI, OBEID, 2016, SERLETIS, BARDAKJIAN, *et al.*, 2012, VAN VREESWIJK, SOMPOLINSKY, 1996).

Algumas modelagens matemáticas das principais fontes de ruído relevantes à sinais extracelulares, já foram realizadas, algumas relacionadas ao sensor de captação: (1) ruídos térmicos; (2) variância adicional proporcional ao quadrado do sinal (flutuações de referências); (3) variância adicional proporcional ao sinal (ruído de tiro); (4) ruído constante produzido pelos neurônios (fluorescência de fundo); e outras fontes relacionadas à rede neural: (1) variância produzida pelo neurônio que depende quadraticamente da sua ativação (potenciais de ação que se propagam para diferentes partes da árvore dentrítica); (2) variação que depende linearmente da força do sinal produzido pelo neurônio (ativações de fluoróforos). Todas estas fontes de ruídos podem ser independentes ou correlacionadas (CYBULSKI, GLASER, *et al.*, 2015).

Todas essas fontes que contribuem para o ruído biológico são captadas por tecnologias de coleta de sinais extracelulares como a MEA. A Figura 2.3, ilustra os principais ruídos encontrados em MEA. Dentre elas, observa-se a fonte de ruído biológico, que o autor relacionou diretamente com a atividade elétrica de outras células em torno do eletrodo de gravação, por exemplo, potenciais de ação de células distantes, mas também, atividade iônica e ruído sináptico devido à natureza estocástica de transmissão sináptica (OBIEN, DELIGKARIS, *et al.*, 2015).

Vários modelos de ruído biológico foram desenvolvidos. Embora esses modelos reproduzam o ruído biológico médio em experimentos, é possível que o tipo, o tamanho e a morfologia da célula, juntamente com as taxas de disparo e a atividade correlacionada, possam afetar a forma do ruído biológico (OBIEN, DELIGKARIS, *et al.*, 2015).

A literatura datada dos anos 70 a 90 já consideravam os canais iônicos voltagem-dependentes como uma das maiores fontes de ruído. A sinalização elétrica nos neurônios é mediada pela abertura e fechamento de muitos canais iônicos individuais. As transições de estado dos canais de íons são estocásticas e introduzem flutuações na corrente macroscópica através de populações de canais de íons (NAPOLI, OBEID, 2016). São, portanto, uma importante fonte de corrente de ruído biológico, sujeitos a mudanças que ocorrem em estados de condutância e conformacionais sob agitação térmica. Esta corrente de ruído pode mudar o comportamento de atividade de *spikes* do neurônio, afetando a distribuição das respostas de latência, a propagação de *spikes* nas estruturas dendríticas, a geração de potenciais de ação espontâneos, flutuações no

potencial de membrana e a não sincronia dos *spikes* (DEFELICE, 1981, SULLIVAN, 1992).

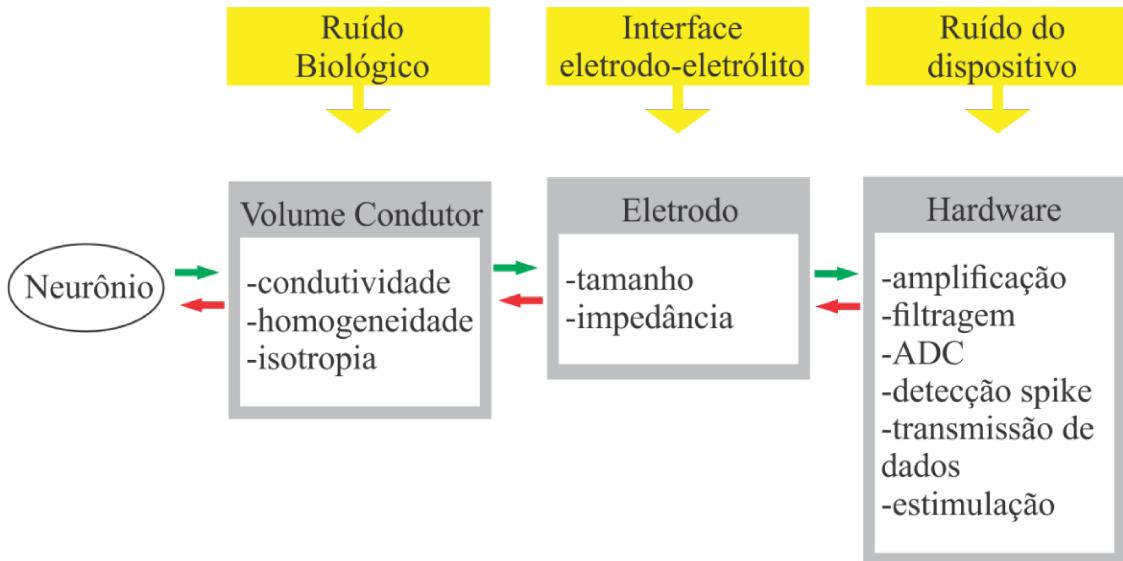


Figura 2.3 - Principais ruídos encontrados no sinal de culturas neurais em MEA

Poucos trabalhos experimentais foram realizados quanto ao ruído biológico (MENDONÇA, VARGAS-CABALLERO, *et al.*, 2016, STEIN, GOSSEN, *et al.*, 2005). O mais relevante estuda a irregularidade intrínseca dos disparos de *spikes* relacionando-a com as flutuações de entradas sinápticas e ainda às flutuações estocásticas na liberação de neurotransmissores. A fim de investigar isto apresentou-se um experimento usando córtex de rato marcado com proteína fluorescente verde (GFP) em neurônios com fenótipo predominante de disparos *spikes* irregulares. Observou-se grandes flutuações no potencial de membrana destes neurônios (MENDONÇA, VARGAS-CABALLERO, *et al.*, 2016). Neste mesmo trabalho, também foi analisado os mecanismos biofísicos subjacentes aos disparos irregulares. Os resultados mostraram que as flutuações eram dependentes dos canais de sódio controlados por tensão assim como de correntes de potássio que aumentam o ruído (MENDONÇA, VARGAS-CABALLERO, *et al.*, 2016).

Já o trabalho de (MAISEL, LINDENBERG, 2017) anuncia que a informação é codificada em neurônios por meio dos *spikes*, como vastamente discutido na literatura. No entanto, os autores relataram a baixa compreensão de quais características específicas dos *spikes* contêm informações codificadas. Dentre os resultados experimentais, este

trabalho concluiu que o tempo do primeiro *spike* pode ser um mecanismo de codificação eficiente.

Os procedimentos experimentais, apresentados em (MAISEL, LINDBERG, 2017), foram realizados utilizando-se o modelo computacional do neurônio de Hodgkin-Huxley. A principal característica deste modelo é a abertura e o fechamento estocástico dos canais iônicos e as flutuações na tensão da membrana. Observou-se que um maior número de canais aumenta a taxa de disparos e torna-se fator determinante na distribuição das primeiras latências de *spikes*. Concluíram que a fonte de ruído dos canais iônicos contribui para o aumento das flutuações dos tempos de *spike* e aumenta sua primeira latência.

Outros trabalhos também trazem uma abordagem experimental interessante, porém, no âmbito da neuroimagem. Os resultados trazem elucidações quanto ao tema ruído ao assumir que ele permite a descriminação sensorial e até mesmo a conectividade funcional da rede neural. Este estudo também levanta as medições comumente utilizadas para investigar o ruído, são elas: variância, desvio padrão, diferenças quadráticas sucessivas e entropia multiescala, que é uma derivação da entropia de Shannon (GARRETT, SAMANEZ-LARKIN, et al., 2013).

O artigo de (NEISHABOURI, FAISAL, 2014) considerara que o sistema nervoso exibe variabilidade estocástica em todos os níveis, mas que, geralmente assume-se pouca variabilidade aleatória afetando a forma dos *spikes*. No entanto, este estudo mostrou que como os *spikes* são mediados por canais de íons regulados por tensão, eles podem ser suscetíveis a flutuações termodinâmicas que geram correntes iônicas aleatórias.

É relevante destacar a informação obtida pelo artigo (REGALIA, BIFFI, et al., 2015) quanto à amplitude do sinal de ruído, considerada na casa de 800 nV. Foi realizado um procedimento experimental com sinais de ruído MEA obtidos de cultura de células neurais em atividade basal, se observou a amplitude do ruído na faixa de 300 nV. Este sinal abriga o ruído biológico e o de instrumentação.

A revisão (MCDONNELL, WARD, 2011) levanta as questões científicas ainda não elucidadas sobre a facilitação estocástica que são relativas à saber se, ou quando, o ruído biologicamente relevante é benéfico a sistemas neurais e como isso ocorre. A revisão ainda expõe as divergências experimentais e teóricas do tema ao criticar a utilização de adição de ruídos exógenos a sistemas neurais, uma vez que se deveria visar controlar ou reduzir o ruído endógeno. Isto é reforçado pelo fato de as melhorias

no desempenho observadas devido ao ruído exógeno não fornecem evidências de facilitação estocástica *in vivo*.

Os resultados obtidos do trabalho (MAISEL, LINDBERG, 2017) têm aplicação na facilitação estocástica, ou na melhoria do processamento da informação devido ao ruído. Isto porque, a presença de ruído de canal em neurônio faz com que os *spikes* ocorram mais rapidamente.

CAPÍTULO III

CALIBRAÇÃO E INCERTEZA DE MEDIÇÃO

A metrologia é disciplina clássica tanto na área científica quanto na industrial, entretanto, mesmo com uma clara relevância nos processos, sua aplicação é ainda rudimentar na área da saúde. A realização de medições de diversos parâmetros fisiológicos é essencial para o diagnóstico, caracterização de riscos, tratamento e registro da evolução clínica de pacientes. Assim como, importante para os ensaios clínicos e medições fisiológicas de experimentos *in vitro*. Desta forma, as medições realizadas pelos sistemas dedicados à saúde devem garantir, em primeiro lugar, a obtenção de resultados rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI), (INMETRO, 2012) e em segundo lugar a exatidão e precisão dos dados.

Os equipamentos eletromédicos fabricados no Brasil devem possuir registro da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a fim de que possam ser comercializados. Isto se dá mediante a sua classificação quanto ao potencial de risco à saúde de seus usuários, sendo estes, os pacientes e os profissionais da saúde, ABNT NBR IEC 60601-1 (ABNT, 2010). Assim que um equipamento eletromédico possui autorização e registro para ser comercializado, não há nenhuma normatização que torne compulsória a calibração destes equipamentos afim da garantia da confiabilidade metrológica, por exemplo.

A OIML (Organisation Internationale de Métrologie Légale) elabora recomendações metrológicas sobre as quais, em geral, se baseiam as RTM (Regulamentos Técnicos Mercosul) elaboradas pelo INMETRO. O Regulamento Técnico Mercosul tem por finalidade colocar sob o controle do Estado diferentes categorias de instrumentos de

medição, fixando requisitos técnicos e metrológicos para utilização e verificação (MENEZES, C. I. C.; SALLES, M. T.; SILVA, 2003). As exigências dos Regulamentos Técnicos Mercosul conduzem ao controle metrológico dos instrumentos de uma forma mais ampla, tanto antes da entrada do produto médico ou laboratorial no mercado, através da aprovação de modelo e verificação inicial, quanto durante o período da vida útil, através da verificação periódica e eventual. No Brasil ainda há poucos RTM dedicados especificamente aos equipamentos médicos e laboratoriais

3.1 Incerteza de Medição

Há dois principais métodos de cálculo da incerteza de medição, o método que se baseia na lei de propagação de incertezas (GUM) (INMETRO, 2012) e a simulação pelo método de Monte Carlo (INMETRO, 2008).

Método proposto no GUM

O objetivo de uma medição consiste em determinar o valor do mensurando, isto é, o valor da grandeza específica submetida à medição (INMETRO, 2012). Uma medição começa, portanto, com a especificação apropriada do mensurando (variável de saída), do método de medição e do procedimento de medição. Assim sendo, o mensurando deve ser definido com completeza suficiente, relativa à exatidão requerida, de modo que, para todos os fins práticos associados com a medição, seu valor seja único.

Seja qual for o mensurando e o sistema de medição utilizado todo processo de medição está sujeito a erros. Assim sendo o BIPM et al., (2008) (BIPM, 2008) indica que todas as grandezas que influenciam o resultado de medição devem ser identificadas na etapa inicial do cálculo da incerteza. Para tanto, deve-se realizar uma análise crítica a fim de identificar estas componentes de incerteza. A quantidade e o tipo de componentes variam de acordo com o sistema de medição, com o tipo de mensurando analisado e com o nível de exatidão requerido.

De forma geral tais componentes podem estar atreladas às condições ambientais, ao operador, aos equipamentos e aos padrões utilizados, ao método de medição, à amostragem, dentre outros fatores. Para a adequada identificação destes fatores é

recomendada a elaboração de um diagrama de causa-efeito. A Figura 3.1 representa um diagrama causa-efeito para a medição de uma força (F), considerando um valor de massa obtido (m), um certificado de calibração de uma balança e a aceleração da gravidade no local (g_l) das medições (INMETRO, 2008).

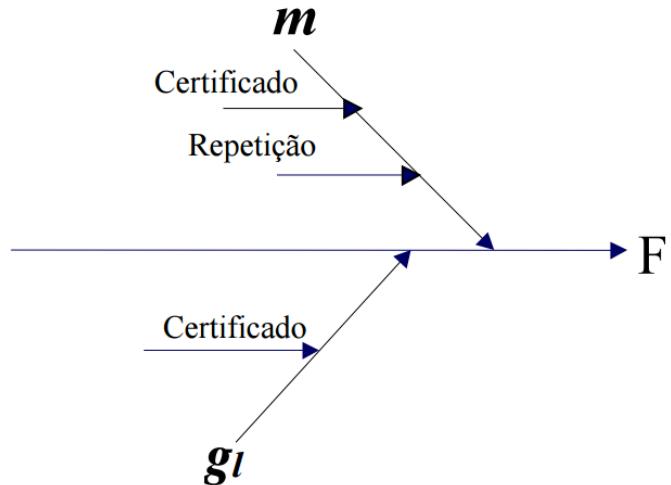


Figura 3.1 – Diagrama causa-efeito para a medição de uma força peso (INMETRO, 2008).

Uma vez identificados os fatores de influência ou variáveis de entrada um modelo matemático deve ser proposto, Eq. (3.1) (BIPM, 2008). Este modelo é a base para aplicação da lei de propagação de incertezas.

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N) \quad (3.1)$$

A partir da Eq. (3.1), obtém-se a estimativa do mensurando Y , designada como y , baseando-se em um conjunto de estimativas de entrada x_1, x_2, \dots, x_N para os valores das N grandezas X_1, X_2, \dots, X_N . Assim a expressão resultante pode ser observada na Eq. (3.2).

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_N) \quad (3.2)$$

A estimativa das incertezas padrão é realizada para cada fonte de entrada de acordo com uma avaliação do tipo A ou do tipo B. Quando se dispõe de um conjunto de valores da variável de entrada x_i , em condições de repetibilidade, pode ser efetuada uma avaliação do tipo A da incerteza padrão, Eq. (3.3).

$$u(\bar{x}_i) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} \quad (3.3)$$

Em que, $s(x_i)$ é o desvio-padrão dos valores do conjunto de repetições e n é o número de repetições.

Neste caso pode ser adotada a distribuição normal ou a distribuição T-student com $n-1$ graus de liberdade. Basicamente, na avaliação do tipo A a incerteza padrão é obtida a partir de uma função densidade de probabilidades, derivada da observação de uma distribuição de frequência, isto é, baseada em uma série de observações da grandeza.

A avaliação do tipo B para o cálculo da incerteza padrão é obtida por outros meios, que não a análise estatística de uma série de observações repetidas, tais como considerações de manuais, especificações de fabricantes, certificados de calibração ou a partir de experiências anteriores. Dependendo da quantidade de informação disponível e da forma como ela é apresentada, podem-se assumir diferentes distribuições de probabilidade para efetuar os cálculos.

A distribuição retangular, Fig. 3.2, é utilizada quando é possível estimar apenas os limites superior e inferior para X_i e estabelecer que a probabilidade de que o valor X_i pertença ao intervalo $(a, a+)$ é um e a probabilidade para que o valor X_i esteja fora desse intervalo é zero. Se não houver conhecimento específico de possíveis valores de X_i dentro do intervalo, pode-se assumir que é igualmente provável que X_i esteja em qualquer ponto do intervalo, e consequentemente o seu grau de liberdade é infinito. Neste caso a incerteza padrão é dada pela Eq. (3.4):

$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (3.4)$$

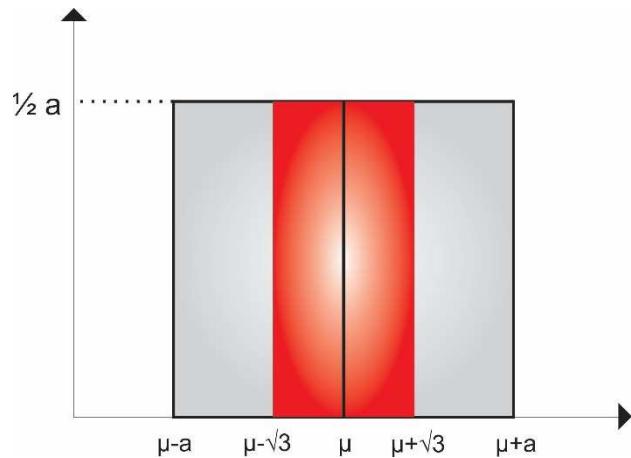


Figura 3.2 – Distribuição Retangular (BIPM, 2008).

A função densidade de probabilidade desta distribuição retangular é dada pelo sistema da Eq. (3.5).

$$f(x) = \begin{cases} \frac{1}{2a}, & (\mu - a) \leq x \leq (\mu + a) \\ 0, & \text{restantes } x \end{cases} \quad (3.5)$$

Caso haja mais conhecimentos sobre a distribuição dos valores possíveis da grandeza, a distribuição de probabilidade retangular passa para uma triangular (Fig. 3.3), com infinitos graus de liberdade. Entendendo que x_i segue uma distribuição triangular em um intervalo $\pm a$, a estimativa da incerteza-padrão é definida por meio da Eq. (3.6).

$$u(x_i) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (3.6)$$

A função densidade de probabilidade para a distribuição triangular pode ser representada pelo sistema da Eq. (3.7).

$$f(x) = \begin{cases} \frac{x+a}{a^2}, & -a \leq x \leq 0 \\ \frac{a-x}{a^2}, & 0 \leq x \leq a \\ 0, & \text{restantes } x \end{cases} \quad (3.7)$$

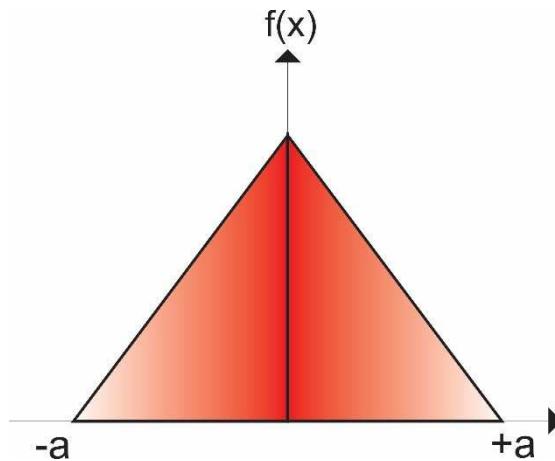


Figura 3.3 – Distribuição Triangular (BIPM, 2008).

Vale ressaltar que quando a incerteza de uma fonte de entrada provém de um certificado de calibração, a estimativa da incerteza-padrão $u(x_i)$ deve ser definida como mostra a Eq. (3.7). Onde, $U(x_i)$ é a incerteza expandida de x_i e k é o fator de abrangência declarados no certificado de calibração. Neste caso, tanto a distribuição de probabilidades quanto o número de graus de liberdade devem estar disponíveis no certificado de calibração.

$$u(x_i) = \frac{U(x_i)}{k} \quad (3.7)$$

Para determinação da incerteza padrão combinada as grandezas de entrada são divididas em dois grupos, não correlacionadas e correlacionadas. Para o caso em que as grandezas de entrada são independentes, ou não correlacionadas, tem-se que a incerteza padrão combinada de uma estimativa y é representada por $u_c(y)$, desta forma,

a raiz quadrada positiva da variância combinada $u_c^2(y)$ pode ser observada pela Eq. (3.8), (BIPM, 2008).

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 u^2(x_i) \quad (3.8)$$

Onde, f é a função que modela matematicamente o processo de medição, representado na Eq. (3.2). Como pode ser observado, a Eq. (3.8) é baseada em uma aproximação de primeira ordem da série de Taylor e expressa a lei de propagação das incertezas. Quando as variáveis de entrada são correlacionadas, a expressão apropriada para a variância combinada, associada com o resultado de uma medição pode ser representada pela Eq. (3.9).

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \frac{\partial f}{\partial x_i} \frac{\partial f}{\partial x_j} u(x_i, x_j) \quad (3.9)$$

Onde, x_i e x_j são as estimativas de X_i e X_j e $u(x_i, x_j) = u(x_j, x_i)$ é a covariância estimada. O grau de correlação entre x_i e x_j é caracterizado pelo coeficiente de correlação estimado pela Eq. (3.10).

$$r(x_i, x_j) = \frac{u(x_i, x_j)}{u(x_i)u(x_j)} \quad (3.10)$$

Por fim, a incerteza expandida, $U(y)$, associada à variável de saída y , é obtida, multiplicando-se a incerteza padrão combinada $u_c(y)$ por um fator de abrangência k , Eq. (3.11). Para determinar o valor de k deve-se calcular o número de graus de liberdade efetivos (v_{ef}), Eq. (3.12).

$$U(y) = k \cdot u_c(y) \quad (3.11)$$

$$v_{ef} = \frac{u_c(y)^4}{\left[\frac{u_{x1}^4}{v_1} + \frac{u_{x2}^4}{v_2} + \dots + \frac{u_{xN}^4}{v_N} \right]} \quad (3.12)$$

Método de Monte Carlo

O método de cálculo da incerteza de medição proposto pelo BIPM, et al. (2008) (BIPM, 2008) apresenta algumas limitações, como a necessidade de linearização do modelo, a suposição que o mensurando tem distribuição normal, a determinação dos graus de liberdade efetivos e o cálculo das derivadas parciais para a determinação da incerteza padrão combinada, que pode ser trabalhoso em função da complexidade do modelo matemático da medição. Desta forma, o método de simulação de Monte Carlo pode ser aplicado para a avaliação da incerteza de medição, como uma alternativa relativamente simples e mais abrangente quanto a sua aplicação.

O método de Monte Carlo (MMC) pode ser entendido como um método de simulação estatística que utiliza sequências numéricas aleatórias com o objetivo de desenvolver simulações. Ou seja, é um método numérico universal para resolver problemas por meio de amostragem aleatória combinando distribuições, propagando além de incertezas estatísticas (INMETRO, 2008). A avaliação da incerteza pelo método Monte Carlo pode ser compreendida nas seguintes etapas:

- Definição do mensurando;
- Elaboração do diagrama causa–efeito;
- Estimativas das incertezas das fontes de entrada;
- Identificação das funções densidade de probabilidade, correspondentes a cada fonte de entrada;
- Seleção do número de iterações de Monte Carlo;
- Escolha da função densidade de probabilidade $p(x_i)$;
- Estimativa da incerteza expandida.

As três primeiras etapas da técnica Monte Carlo são similares aquelas desenvolvidas e explicitadas na metodologia de cálculo do BIPM, et al., (2008), (BIPM, 2008) o método ISO GUM 95. A etapa 4 da metodologia de Monte Carlo trata da identificação das funções densidade de probabilidades referentes a cada fonte de entrada (gaussiana, retangular, triangular etc.). Cada função densidade de probabilidade (FDP) tem um intervalo no qual seu limite inferior é definido pelo valor mais provável da fonte subtraído da sua respectiva incerteza estimada, e o seu limite superior é calculado pelo valor mais provável da mesma fonte de entrada adicionado da sua estimativa da incerteza.

Propaga-se as FDP das variáveis de entrada X_i através do modelo de modo a obter a FDP de variável de saída Y. Para tanto, inicialmente, determina-se o número de simulações a ser efetuado para obter resultados consistentes, configurando a etapa 5. A cada número aleatório gerado que esteja compreendido no intervalo da FDP definida de cada fonte, imediatamente é realizado o cálculo do mensurando, através da sua equação de definição. Ao final do número de iterações desejado, são obtidos tantos valores do mensurando quanto à quantidade de números que estavam contidos nos intervalos das FDP de cada fonte. Desta forma, é possível efetuar o cálculo da média e do desvio-padrão de todos os valores obtidos para o mensurando (INMETRO, 2008). A Fig. 3.4 esquematiza, resumidamente, das etapas para aplicação do método de Monte Carlo.

O modelo matemático proposto é avaliado para cada um dos valores de M retirados das FDP das X_i variáveis de entrada. Especificamente, deve-se denotar os M valores por x_1, \dots, x_M , onde a posição de número r, dada por x_r , contém $x_{1,r}, \dots, x_{N,r}$, com $x_{i,r}$ retirado da FDP de X_i . Então, os valores do modelo são dados pela Eq. (3.13).

$$y_r = f(x_r), \quad r = 1, \dots, M. \quad (3.13)$$

A representação discreta da distribuição da função da variável de saída Y pode ser obtida através, primeiramente, da classificação os valores do modelo y_r , $r = 1, \dots, M$, fornecidos pelo método Monte Carlo em ordem crescente. Denotam-se os valores classificados do modelo por $y(r)$, $r = 1, \dots, M$. Pode-se realizar perturbações numéricas para qualquer valor replicado do modelo $y(r)$ de modo que o resultado do conjunto de $y(r)$, $r = 1, \dots, M$, forme uma sequência estritamente crescente.

Posteriormente, toma-se a FDP da variável de saída como o conjunto $y(r)$, $r = 1, \dots, M$. A função $y(r)$, quando na forma de um histograma e com largura de classes adequada, forma uma distribuição de frequências que, quando normalizada para ter área unitária, fornece uma aproximação da FDP de Y. Este histograma é útil auxiliando na compreensão da natureza da FDP, como na extensão da sua assimetria.

A média da variável de saída é dada pela Eq. (3.14), enquanto que o desvio padrão, $u(\hat{y})$ é determinado pela Eq.(3.15):

$$\tilde{y} = \frac{1}{M} \sum_{r=1}^M y_r \quad (3.14)$$

$$u(\tilde{y}) = \sqrt{\frac{1}{M-1} \sum_{r=1}^M (y_r - \tilde{y})^2} \quad (3.15)$$

A média é considerada como uma estimativa y de Y e o desvio padrão representa a incerteza padrão $u(y)$ associada a y . O intervalo de abrangência para Y pode ser determinado a partir da representação discreta da FDP. Por fim, deve-se determinar o valor de q pela Eq. (3.16), onde p representa a probabilidade e M o número de iterações.

$$q = pM \quad (3.16)$$

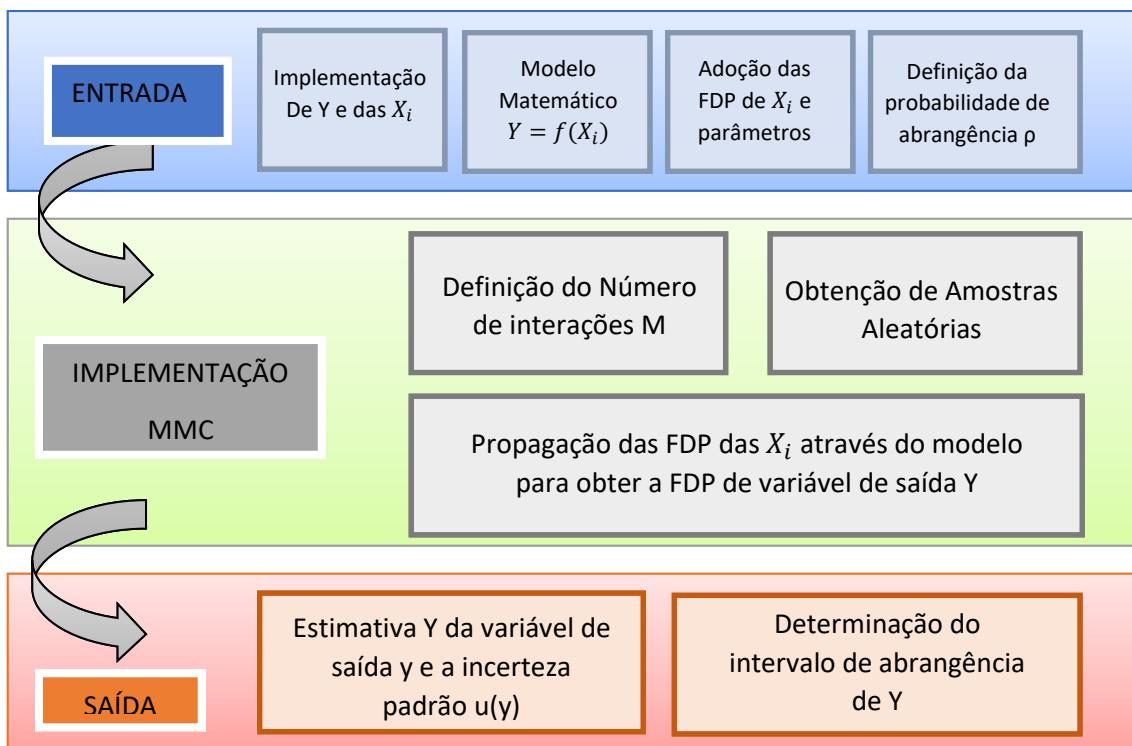


Figura 3.4 – Resumo das etapas para aplicação do método Monte Carlo (BIPM, 2008)

A Eq. (3.16) é válida apenas quando q for um número inteiro. Caso contrário, q é determinado pela Eq. (3.17).

$$q = pM + \frac{1}{2} \quad (3.17)$$

Assim, o intervalo definido por $[y_{inicial}, y_{final}]$ possui uma abrangência de 100%.

Teste de Normalidade

A Estatística é uma ciência que possui procedimentos para coleta, apresentação e interpretação adequada de um conjunto de dados (BUSSAB, MORRETTIN, 2002). A Estatística clássica está fortemente aliada à distribuição Normal dos dados e à ausência de valores extremos (outliers). Desta forma se aplicada à análise de um conjunto de dados não normais, obtém-se medidas de dispersão elevadas e com baixa confiabilidade, produzindo amplos intervalos de aceitação, o que reduz a qualidade das interpretações (BIASOLI, DOELLINGER, *et al.*, 2007).

A distribuição Normal é uma importante distribuição de probabilidade da estatística, muitas vezes denotada como Distribuição de Gauss ou Gaussiana. Esta distribuição é representada pelo gráfico da Fig. 3.5, e descrita pela equação Eq. (3.18), na qual, podem-se observar os parâmetros média populacional (μ) e desvio padrão populacional (σ). Quando a média está no centro da distribuição e representa o mesmo valor da mediana e da moda, observa-se uma distribuição Normal (LOPES, CASTELO BRANCO, *et al.*, 2013).

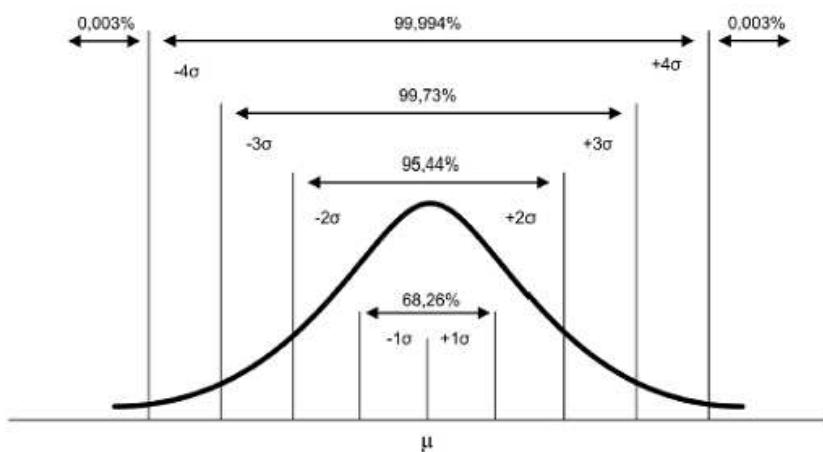


Figura 3.5 – Modelo de distribuição Normal

$$f(x) = \frac{e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}}{\sigma\sqrt{2\pi}}, x \in R \quad (3.18)$$

Para avaliar a incerteza de medição por meio do GUM, a variável de saída ou mensurando deve possuir uma distribuição normal. Desta forma, resulta conveniente avaliar a normalidade dos valores do mensurando (CANTELMO, FERREIRA, 2007). Para tanto, existem alguns testes de normalidade que podem ser utilizados e diversos estudos publicados compararam a eficiência entre eles. Leotti et al. (2005) (LEOTTI, BIRCK, *et al.*, 2005) comparou os testes Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises, Anderson-Darling e Shapiro-Wilk, onde observaram que há equivalência entre estes testes para dados Normais, mas que o teste de Kolmogorov-Smirnov é menos sensível à verificação da Normalidade, sendo considerado o menos eficiente deles. Estes autores consideraram que o teste de Shapiro-Wilk é, aparentemente, o melhor teste de aderência à Normalidade. Este fato também é confirmado pelos autores (CIRILLO, FERREIRA, 2003) e (ÖZTUNA, ELHAN, *et al.*, 2006). (SHAPIRO, WILK, 1965), desenvolveram o teste de Shapiro-Wilk mostrando que esse teste é eficiente para diferentes distribuições e tamanhos de amostras quando comparado aos resultados de outros testes.

(ROYSTON, 1999) generalizou o teste univariado de Shapiro-Wilk para o caso multivariado. Este teste fornece o parâmetro valor de prova (valor-p, p-value ou significância), que pode ser interpretado como a medida do grau de concordância entre os dados e a hipótese nula (H_0), sendo H_0 correspondente à distribuição Normal. Quanto menor for o valor-p, menor é a consistência entre os dados e a hipótese nula. Então, a regra de decisão adotada, para saber se a distribuição é Normal, é rejeitar H_0 , primeiramente, se $p\text{-value} \leq \alpha$, rejeita-se H_0 , ou seja, não se pode admitir que o conjunto de dados em questão tenha distribuição Normal. Em segundo lugar, se $p\text{-value} > \alpha$, não se rejeita H_0 , ou seja, a distribuição Normal é uma distribuição possível para o conjunto de dados em questão (LOPES, CASTELO BRANCO, *et al.*, 2013).

3.2 Aplicação dos conceitos de metrologia no cálculo de Potência

A fim de estudar a característica da incerteza de medição aplicada à potência utilizou-se do equipamento bisturi elétrico para aplicação deste experimento. No caso deste equipamento escolhido, a calibração deve ser realizada usando analisadores eletrocirúrgicos. Apesar dos esforços dedicados em estudar e aplicar os conceitos de metrologia no sujeito desta tese, estudos adicionais devem ser conduzidos considerando os seguintes aspectos: primeiro, a IEC 60601-2-2, que foi caracterizado como o particular padrão de segurança de equipamento eletromédico. Este padrão não especifica nenhum procedimento para a determinação de erros, repetibilidade e medição incerteza pelo equipamento. Um segundo ponto a ser considerado é o fato de não ter sido encontrado nenhum critério específico para a determinação do ciclo de vida destes equipamentos ou mesmo da MEA60.

Todas as medições foram realizadas em uma sala controlada temperatura de $T \pm 0,5^\circ C$, onde T é a temperatura desejada. Diferentes níveis de temperatura ambiente foram materializados por usando uma unidade de ar-condicionado fabricada pela Springer, modelo Silentia de 30 000 Btu. A temperatura foi monitorada por um termo-higrômetro digital com resolução de $0,1^\circ C$ e uma faixa nominal de $-20,0^\circ C$ a $60,0^\circ C$. De acordo com o certificado de calibração, este termo-higrômetro tem uma incerteza expandida de $0,3^\circ C$ para um fator de cobertura de 2,00 e uma probabilidade de cobertura de 95,45%. A umidade era também monitorada usando este termo-higrômetro, que foi mantido entre 45% e 55%.

Para estimar a incerteza de medição, os conceitos e recomendações apresentados no JCGM 100 [23] foram seguidos. O modelo matemático proposto para avaliar a incerteza de medição associada ao corte e os poderes de coagulação são dados na seguinte equação:

$$P = \bar{P} + \Delta R + \Delta C \quad (3.19)$$

Onde P é a potência medida; \bar{P} é a média para os valores indicados pelo analisador de potência; R é a correção associado à resolução do analisador de energia; e C é a correção associada ao analisador de energia calibração.

A incerteza padrão combinada foi determinada pela aplicação da lei de propagação da incerteza em (3.20), e calculando as derivadas parciais. Desta forma, a seguinte equação foi obtida:

$$\mu_C^2(P) = u^2(\bar{P}) + u^2(\Delta R) + u^2(\Delta C) \quad (3.20)$$

Para determinar a incerteza padrão associada com a variabilidade dos valores indicados pelo analisador de potência $\mu(\bar{P})$ e aquele associado à calibração do analisador de energia $\mu(C)$, as distribuições t-Student foram adotadas. A incerteza padrão associada ao analisador de energia resolução $\mu(R)$ foi calculada conforme uma distribuição retangular com infinitos graus de liberdade. A Figura 3.6 ilustra o sistema de medição deste experimento.

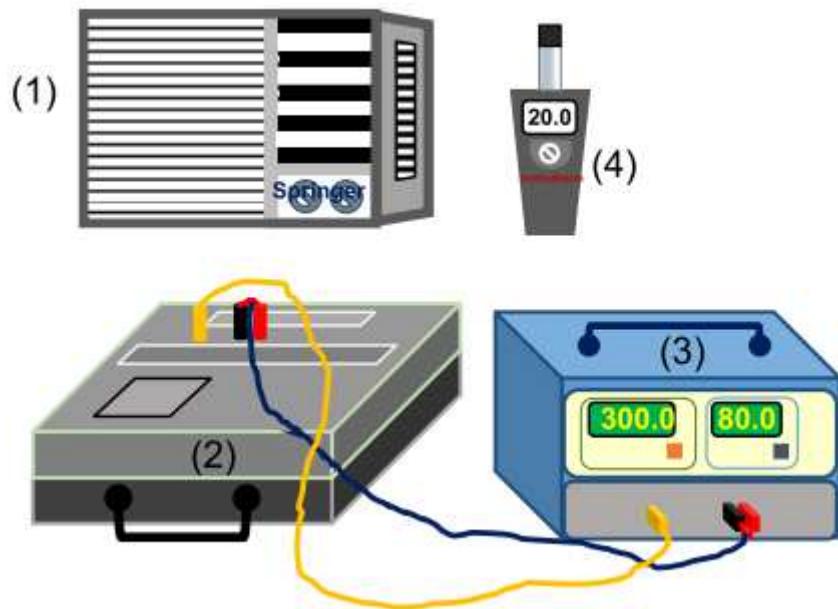


Figura 3.6 – Sistema de medição para aplicação dos conceitos de metrologia em potência.

O erro máximo associado aos valores de potência de corte e coagulação, estudados neste experimento para aplicação dos conceitos de metrologia, foi estimado conforme mostrado a seguir equação, onde E_{MAX} representa o erro máximo, E é o erro ou diferença

entre as potências selecionadas e aquela entregue pelo equipamento, e U é o associado à incerteza de medição:

$$E_{MAX} = E + U$$

A Figura 3.7 mostra os valores de erro máximo associados às potências de corte e coagulação para temperaturas de 20 ° C e 28 ° C. O valor máximo de erro especificado pelos fabricantes também é mostrado como uma linha preta. Digno de nota aqui foi que os valores de erro máximo, em geral, aumentaram à medida que os valores de potência aumentaram para todas as temperaturas, seguindo a tendência mostrada pela incerteza expandida associada. Valores menores de erros máximos foram observados para 20 ° C, os menores valores de erros máximos foram observados, indicando uma menor variabilidade dos valores de potência de corte e coagulação nesta condição e, portanto, uma melhor qualidade dos resultados. Esse fato destacou a importância de manter a temperatura ambiente de 18 ° C a 22 ° C nos processos de medições experimentais.

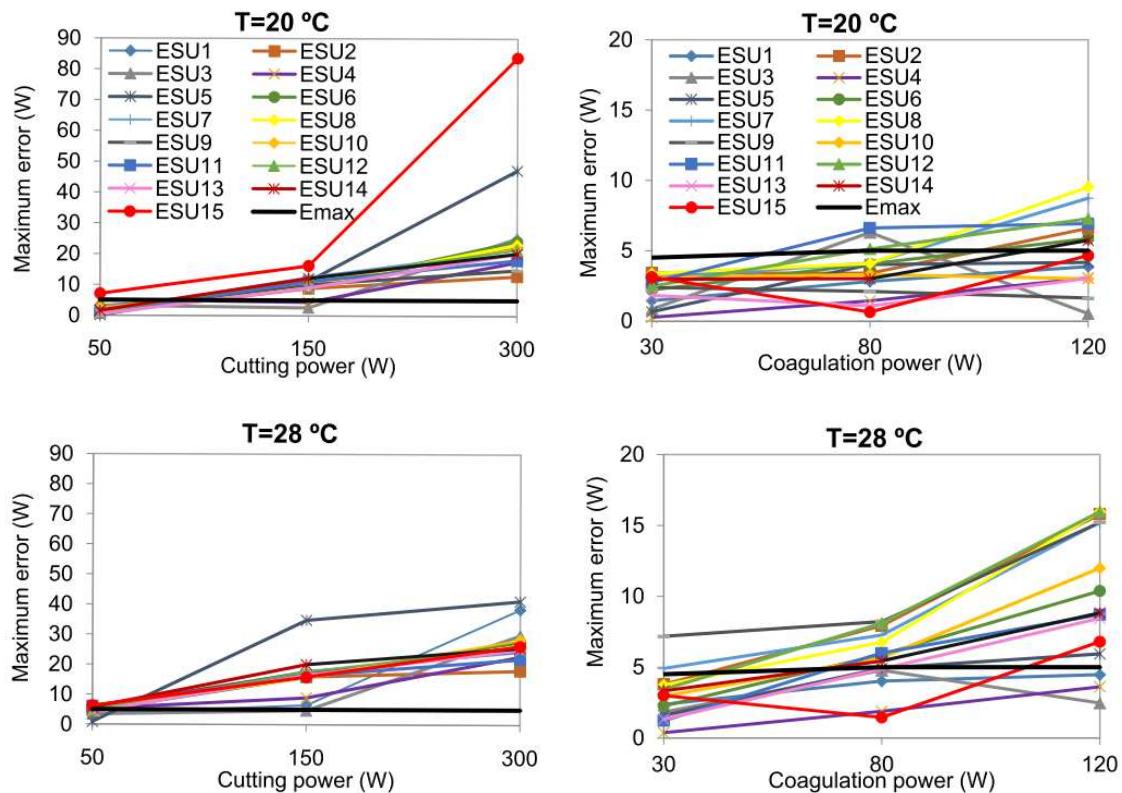


Figura 3.7 - Erros máximos associados aos valores de potência de corte para todas as condições investigadas

CAPÍTULO IV

METODOLOGIA

4.1 Preparação da cultura de células neurais

Neste trabalho foram utilizados neurônios do córtex e do hipocampo cerebral, obtidos de seis a oito embriões de ratos *Wistar* em seu 18º dia 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. Os embriões foram retirados de uma ou mais ratas grávidas. As partes do cérebro utilizadas foram removidas com a ajuda de um fórceps afiado e, em seguida, cortadas em pedaços menores. Todo o procedimento de dissecação ocorreu em ambiente esterilizado.

O procedimento geral para cultivar neurônios corticais foi dividido em quatro fases conforme proposta de Alberts et al. (2008) (ALBERTS, JOHNSON, *et al.*, 2008):

Fase 1: Preparação da pré-cultura.

Foi feita uma solução de *Poli-D-Lisina* (PDL) na concentração de 0,1 mg/ml de água destilada e acrescentado 80-100ml desta solução no arranjo de substratos, esta solução descansou por uma noite. No dia seguinte, retirou-se o PDL e o lavou com água destilada para limpar o excesso, uma vez que ele, em solução, é tóxico para as células. Depois disso, aplicou-se a solução de *Laminina* a 0,02mg/ml e a deixou descansar

durante 2 a 3 horas. Por fim, retirou-se a solução de *Laminina*, lavando duas vezes com água destilada e foi feita a secagem das 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 foram listados abaixo:

- Anestesia da rata prenha com O2/CO2.
- Remoção de todo o útero com os embriões e a disposição sobre uma placa de Petri com HBSS (Solução Salina Balanceada de Hank).
- Separação e isolação dos lobos corticais dos embriões e remoção completa das meninges antes de extrair o hipocampo.
- Localização do bulbo olfatório na borda rostral e o corte ao longo com o fórceps.

Fase 3: Dissociação das células

Foi feito o corte de cada córtex em partes pequenas e a transferência, com uma pipeta de Pasteur sinalizadora, para um tubo de centrífuga de 15 ml, contendo 2-3 ml de solução de tripsina a 0,125%, para cada córtex. Este tubo foi colocado em água aquecida à 37°C. Posteriormente, a tripsina foi retirada com auxílio da pipeta. A digestão proteolítica foi bloqueada adicionando ao tecido cerca de 5-8ml de meio neurobasal contendo 10% de soro FBS.

Posteriormente, cada suspensão de células foi centrifugada por 5 minutos a 900-1000 rpm e as células foram retidas em 10ml de meio neurobasal suplementado com 2% de B-27 e 1% de Glutamax-1. A suspensão das células corticais foi diluída 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

O preparo biológico foi colocado em uma incubadora umedecida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Usou-se Ara-C (Citosina Arabinosídeo Trifosfato), que atua como um inibidor de replicação e crescimento excessivo de células não neurais.

4.2 Aquisição dos sinais MEA

Para a aquisição dos sinais MEA foi utilizado a MEA60, devidamente ajustado e calibrado a fim de garantir medidas condizentes e minimizar os efeitos da incerteza de medição, que contém 60 microeletrodos de 30 micrômetros de diâmetro cada e 200 micrômetros de espaçamento entre eles. Esses eletrodos são distribuídos em uma matriz 8x8, com os cantos excluídos. A Figura 4.1 ilustra o posicionamento dos canais com a respectiva identificação. Cada registro de atividade elétrica seguiu o mesmo procedimento: as MEAs povoadas com as culturas eram retiradas da estufa de CO₂ na qual eram mantidas e colocadas sobre um amplificador cuja temperatura era controlada, podendo variar de 37,1 a 37,4 °C. As medidas eram iniciadas após 20 minutos, com o objetivo de permitir às células se adaptarem ao novo ambiente. Em cada experimento coletaram-se 20 minutos de amostra do sinal da MEA, divididos em quatro fases de 5 minutos cada, sendo as medidas subsequentes.

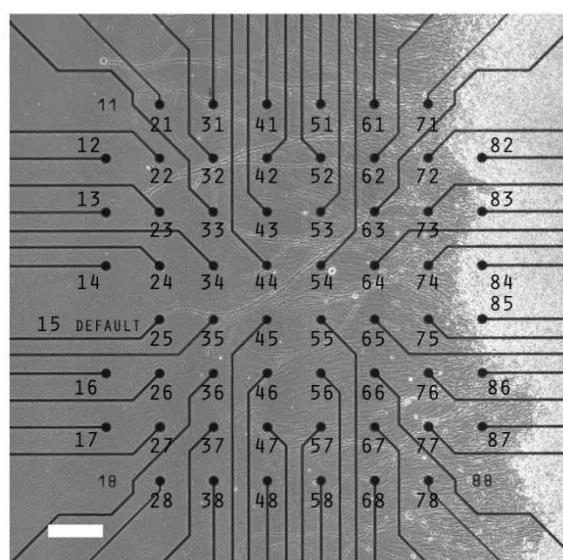


Figura 4.1 – Posicionamento e identificação dos canais MEA 60.

Em todas as MEAs que foram coletados sinais, o eletrodo 15 não possui registro de atividade neural, apenas o sinal de fundo, que corresponde aos ruídos que influenciam no sinal. A frequência de aquisição dos sinais para os experimentos desta dissertação foi de 10 kHz. Completam o aparato experimental um microscópio invertido, uma mesa antivibratória, um controlador de temperatura, uma gaiola de Faraday e um computador equipado com placa PCI de aquisição de dados com no máximo 128 canais de registro e 12 bits de resolução. Os dados foram monitorados e gravados usando o software comercial *MCRack*.

4.3 Análise Clássica

A análise clássica compreende a obtenção de parâmetros relevantes a respeito do sinal MEA da cultura neuronal. Para aplicação desta metodologia, que inclui a detecção de *spikes*, foi utilizado software em *Matlab®* desenvolvido pelo NBT-DIBE (*Neuroengineering and Bio-nanoTechnology Group – NBBT, Department of Biophysical and Electronic Engineering – DIBE*) da Universidade de Gênova, denominado *SpikeManager* (VATO, BONZANO, et al., 2004). Tal processamento experimental foi realizado junto ao experimento denominado 364 para fins comparativos aos resultados dos quantificadores não lineares propostos. Destacam-se neste trabalho os seguintes quantificadores da análise clássica: intervalos entre *spikes* (ISI – *Inter Spike Interval*), intervalos entre *bursts* (IBI – *Inter Burst Interval*) e o número total de *spikes* e *bursts* para cada DIV.

O *SpikeManager* utiliza, para a detecção de picos, a metodologia de limiar diferencial. Nesta proposta, uma janela com um simples *spike* percorre todo o sinal e faz uma comparação até que a diferença entre máximo e mínimo do intervalo seja maior do que uma valor de limiar pico a pico pré-definido, Fig. 4.2. Desta forma, a quantificação do intervalo entre *spikes* (ISI), que corresponde entre dois *spikes* consecutivos, gera o histograma ISI e provê estimativa estatística da probabilidade de *spikes* consecutivos a partir de um *spike* de referência.

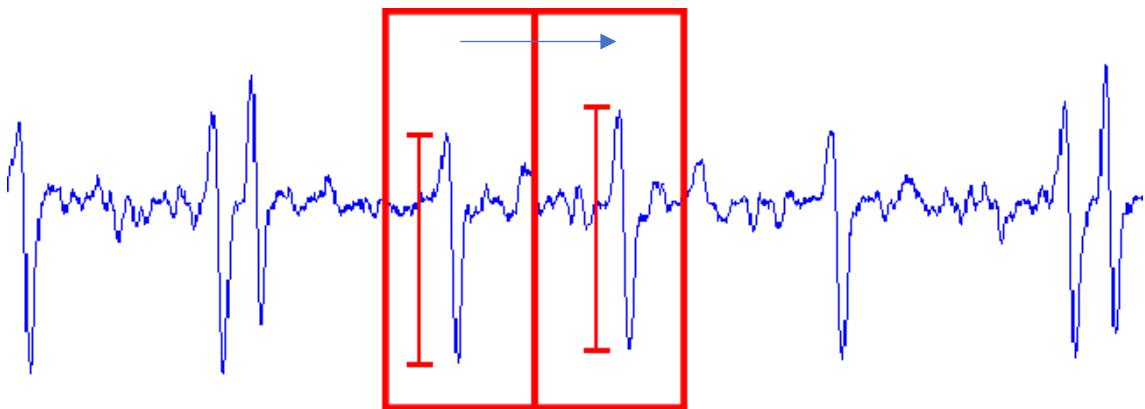


Figura 4.2 – Detecção de *spikes*

Para detecção de um *burst*, Fig. 4.3, sabe-se que os *spikes* devem ser próximos, podendo assumir um ISI máximo de 100ms. A distância entre *bursts* deve ser de no mínimo 100ms (IBI, mínimo na ordem de 100ms). Além disso, o *burst* deve ser formado por um número de 5 a 10 *spikes*.

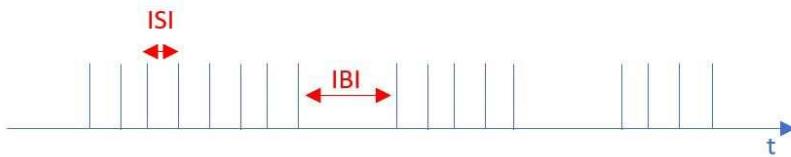


Figura 4.3 – Detecção de *bursts*

4.4 Extração dos Trechos de Ruído

A extração de trechos de ruído do sinal bruto da MEA foi realizada através do software *SpikeManager* na função *Signal Stretches*. Esta função é responsável por decompor o sinal MEA em trechos de ruído, *spikes* e *bursts*. A decomposição gera os sinais com preservação temporal, Fig 4.4, em que os trechos de interesse são mantidos na posição original em relação ao eixo temporal (eixo horizontal), e sinais sem preservação temporal, Fig 4.5, em que os trechos de interesse são justapostos. A fim de preservar a dimensão das amostras, os trechos suprimidos são substituídos por zero. Neste trabalho serão utilizados o sinal de ruído com preservação temporal, Fig 4.4.

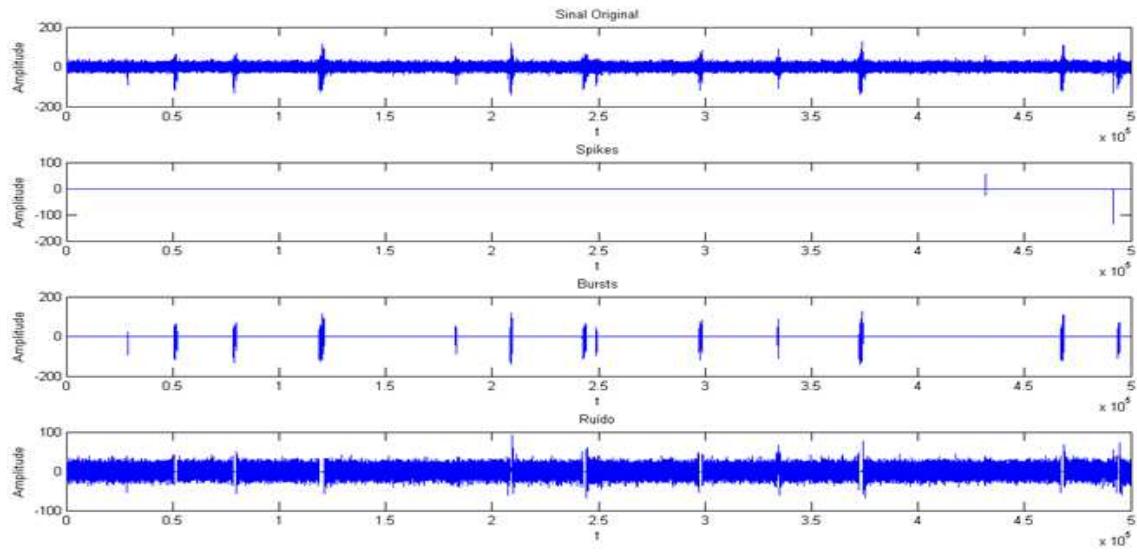


Figura 4.4 - Separação de trechos com preservação de tempo

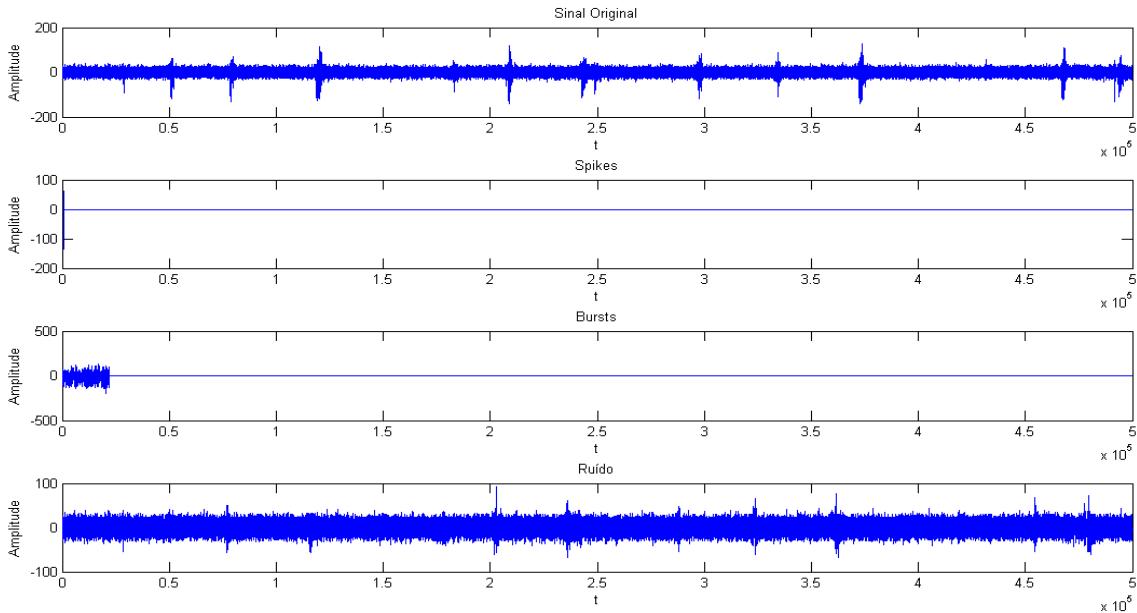


Figura 4.5 - Separação de trechos sem preservação de tempo

4.5 Quantificadores Não-Lineares

Técnicas estatísticas revelam a presença de correlações de longo-alcance e de leis de potência como parte de cascadas de processos multifractais em sinais fisiológicos. Estas propriedades estatísticas sugerem que os sistemas regulatórios não-lineares operem

longe do equilíbrio e que a manutenção da estabilidade não é o objetivo do controle fisiológico (GOLDBERGER, AMARAL, *et al.*, 2002). Espera-se que as informações relevantes sobre o comportamento dos neurônios estejam no intervalo entre os *spikes*, ou seja, os eventos de descarga neuronal, da mesma forma que a variabilidade da frequência cardíaca é estudada pelo intervalo entre os picos R de um eletrocardiograma. Dessa forma, métodos como a Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA) e quantificadores como o Exponente de Hurst são aplicados sobre séries do intervalo *interspike* (ISI) para observar as mudanças que ocorrem no padrão de disparos dos neurônios em termos de suas componentes não-lineares.

Expoente α

A técnica de DFA (PENG, HAVLIN, *et al.*, 1995), realiza a remoção da tendência local da série de dados, analisando o comportamento das flutuações resultantes em função da escala empregada no processo de destendenciamento. O resultado do método é um expoente de escala (v) que permite a quantificação das correlações de longo-alcance na série de dados.

Sejam $x[i]$ elementos de uma série de intervalos ISI de tamanho N . Inicialmente a série é integrada, subtraindo de cada ponto o valor médio da série. O sinal integrado é então dividido em intervalos igualmente espaçados de tamanho l . Para cada intervalo é ajustada uma reta pelo método dos mínimos quadrados, que representa a tendência local do intervalo. Em seguida a série é destendenciada, subtraindo a tendência em cada intervalo. A raiz quadrada média desta série resultante é então calculada.

Nesse sentido cabe examinar a relação entre o expoente v da DFA e o expoente α da densidade espectral de potências (ESPOSTI, FERRARIO, *et al.*, 2008, PENG, HAVLIN, *et al.*, 1995), dada pela Equação 4.1.

$$\alpha = 2v - 1 \quad (4.1)$$

O limiar entre sinais estacionários e não-estacionários é dado por $\alpha = 1$. Dessa maneira podem se distinguir diferentes “zonas de estacionariedade”, como indica (ESPOSTI, FERRARIO, *et al.*, 2008): para $\alpha < 0,5$ o sinal é altamente estacionário e para $\alpha > 1,5$

é altamente não-estacionário, com uma zona de transição entre $0,5 \leq \alpha \leq 1,5$. Dada a correspondência observa-se que $\alpha = 0$ para o ruído branco e para o ruído Browniano.

Expoente Hurst

A auto-similaridade pode ser entendida como a semelhança entre as componentes da escala aparente de um objeto e suas subcomponentes, observadas em menores escalas. No contexto de processos estocásticos a auto-similaridade é definida em termos da distribuição estatística do processo. Seja $y(l)$ um processo estocástico, em que, l é um parâmetro contínuo, o mesmo é chamado auto-similar com parâmetro de auto-similaridade H (o expoente de Hurst), se para um fator positivo c o processo re-escalonado com escala de tempo $y(cl)$ possui a mesma distribuição estatística do processo original, conforme a Equação 4.2. Neste trabalho o expoente de Hurst foi estimado através do método do Periodograma.

$$y(l) = c^{-H} y(cl) \quad (4.2)$$

Mean Ratio Test – MRT

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. Então, o teste de razão média (do inglês *Mean Ratio Test* – MRT) pode ser empregado para comparar as funções de distribuição espectral dos subconjuntos de amostras.

O espectro de um vetor de observações, $[x_1, \dots, x_N]$, pode ser estimado pelo periodograma de Welch definido em (Eq. 4.3). O periodograma de Welch foi escolhido para ser empregado nesta metodologia, pois seus valores são essencialmente independentes para frequências diferentes. Em que $S(f), |f| \leq \frac{1}{2}$, seja a densidade espectral de potência de X . A amostra X é dividida Q segmentos, que provavelmente

se sobrepõem, de comprimento P cada (OLSEN, CHAUDHURI, *et al.*, 2008). A equação 4.3 é o espectro estimado calculado através da média dos periodogramas.

$$\hat{P}_x(f_n) = \frac{1}{Q} \sum_{q=1}^Q \hat{p}_q(f_n) \quad q = 1, 2, \dots, Q \quad (4.3)$$

Para procurar e localizar mudanças no espectro de um sinal MEA, foram calculados os periodogramas (Eq. 4.3) 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 $[x_1, \dots, x_{2N}]$ 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 em seguida a razão destes dois periodogramas foi obtida seguindo (Eq. 4.4). Onde R é a razão e N é igual ao número de observações de cada subconjunto de um segmento MEA.

$$R \left(f_1, \dots, f_{\frac{N}{2}} \right) = \left[\frac{\hat{P}_2(f_1)}{\hat{P}_1(f_1)}, \dots, \frac{\hat{P}_2(f_{\frac{N}{2}})}{\hat{P}_1(f_{\frac{N}{2}})} \right] \quad (4.4)$$

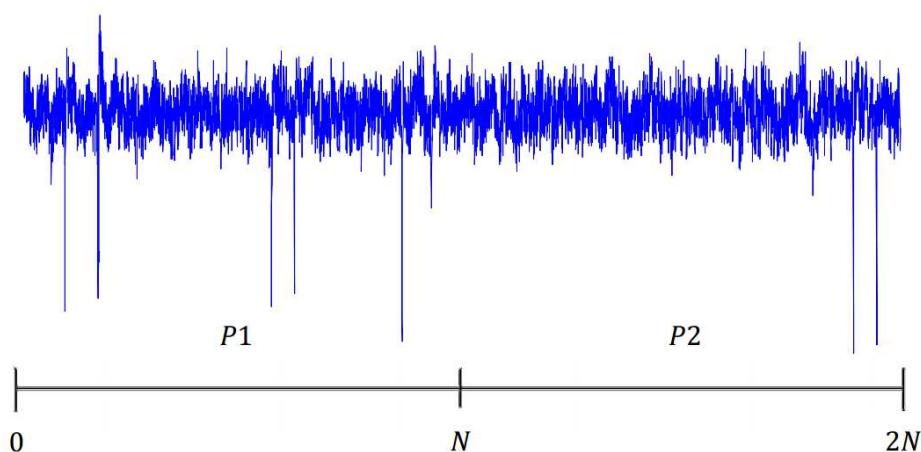


Figura 4.6 - Ilustração de uma janela de sinal MEA de duração $2NT$ ms, dividido em dois subconjuntos P1 e P2 com N amostras cada.

O método padrão para testar não-estacionariedades é baseado na média das razões dos periodogramas (*Mean Ratio Test* - MRT). Os espectros da primeira metade da janela de tempo (subconjunto 1) e da segunda metade da mesma janela (subconjunto 2) são dados por $\{S_1(f_1), \dots, S_1(f_{\frac{N}{2}})\}$ e $\{S_2(f_1), \dots, S_2(f_{\frac{N}{2}})\}$, respectivamente. O objetivo é testar $H_0: S_1(f_j) = S_2(f_j)$ ou equivalentemente $H_0: \frac{S_2(f_j)}{S_1(f_j)} = 1, j = 1, 2, \dots, \frac{N}{2}$.

O teste é dado por: $H_0: \frac{S_2(f_n)}{S_1(f_n)} = 1, n = 1, 2, \dots, N$, onde $j = \left[\frac{N}{2L}\right]$. Quando H_0 é verdadeiro, a razão média (MR) é igual a 1, Eq. 4.5. Para testar se há uma mudança nas propriedades estatísticas do segmento MEA ilustrado na Fig. 4.6, testa-se: $H_0: MR = 1$ contra $H_1: MR \neq 1$ (OLSEN, CHAUDHURI, et al., 2008).

$$MR = \left(\frac{1}{N}\right) \sum_{n=1}^N \frac{S_2(f_n)}{S_1(f_n)} = 1 \quad (4.5)$$

Jarque-Bera – JB

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). Para tanto, considera-se 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} , denota-se 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 .

Assume-se o teste da hipótese $H_0: \theta_2 = 0$. Define-se $d_j = \sum_{i=1}^{2N} \partial l_i(\theta) / \partial \theta_j$ e $I_{jk} = E \left[\sum_{i=1}^{2N} \left(\frac{\partial l_i(\theta)}{\partial \theta_j} \right) \left(\frac{\partial l_i(\theta)}{\partial \theta_k} \right)' \right]$, para $j = 1, 2$ e $k = 1, 2$. Fixando-se \hat{d}_j e \hat{I}_{jk} para denotar d_j e I_{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 que a estatística é definida por:

$$LM = \hat{d}'_2(\hat{I}_{22} - \hat{I}_{21}\hat{I}^{-1}_{11}\hat{I}_{12})^{-1}\hat{d}_2 \quad (4.6)$$

É sob $H_0: \theta_2 = 0$, assintoticamente distribuída como uma distribuição χ^2 com r graus de liberdade, abreviado por χ^2_r . Um teste para $H_0: \theta_2 = 0$, baseado na Eq. 4.6, classificado como um teste de escore ou teste do multiplicador de Lagrange (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 (BREUSCH, PAGAN, 1980, GODFREY, 1978). Todavia, tem sua característica distinta na formulação de $l(\theta)$. Em vez de assumir uma função densidade de probabilidade particular para 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. O teste obtido dessa forma é conhecido ter ótimas propriedades de poder para grandes amostras para membros da família geral especificada (JARQUE, BERA, 1987).

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

$$X_i = \mu + u_i \quad (4.7)$$

Assume-se 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 (JARQUE, BERA, 1987).

Denote a média populacional desconhecida de X_i por $\mu = E[X_i]$ e por conveniência escrevemos $X_i = \mu + \mu_i$, assumindo que a função densidade e probabilidade de μ_i , $f(\mu_i)$, é membro da família de Pearson. A função densidade de probabilidade Pearson é definida para ser uma solução válida para a equação diferencial:

$$\frac{\partial f(u_i)}{\partial u_i} = \frac{(c_1 - u_i)f(u_i)}{(c_0 - c_1 u_i + c_2 u_i^2)} \quad (-\infty < u_i < \infty) \quad (4.8)$$

onde,

$$c_0 = \frac{4b_2 - 3b_1}{10b_2 - 12b_1 - 18} \mu_2 \quad (4.9)$$

$$c_1 = \sqrt{\mu_2} \sqrt{b_1} \frac{b_2 + 3}{10b_2 - 12b_1 - 18} \quad (4.10)$$

$$c_2 = \frac{2b_2 - 3b_1 - 6}{10b_2 - 12b_1 - 18} \quad (4.11)$$

$$\sqrt{b_1} = \frac{\hat{\mu}_3}{\hat{\mu}_2^{\frac{3}{2}}} \quad (4.12)$$

$$b_2 = \frac{\hat{\mu}_4}{\hat{\mu}_2^2} \quad (4.13)$$

$$\hat{\mu}_j = \sum_{i=1}^{2N} \frac{(x_i - \bar{x})^j}{2N} \quad (4.14)$$

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{2N} \frac{x_i}{2N} \quad (4.15)$$

Sob condições de normalidade, b_1 é igual a 0 e b_2 é igual a 3, implicando que c_1 e c_2 são iguais a 0. O objetivo é testar a hipótese de normalidade, ou seja, testar $H_0: c_1 = c_2 = 0$. O teste estatístico LM será denotado por teste JB (JARQUE, BERA, 1987), cuja equação principal é apresentada em:

$$JB = 2N \left[\frac{\sqrt{b_1}^2}{6} + \frac{(b_2 - 3)^2}{24} \right] \quad (4.16)$$

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 u dessas distribuições tendem a infinito. Isso ocorre porque essas distribuições tendem para um comportamento semelhante àquela de uma distribuição normal quando os parâmetros k e u tendem a infinito.

Para todos os sinais obtidos foram avaliados M segmentos disjuntos de duração $2NT$ ms cada, para canais individuais da MEA, isto é:

$$M = \frac{1200s}{2NT \text{ ms}} \quad (4.17)$$

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

Para uma determinada duração de tempo $2NT$ ms, foi estimado o parâmetro estatístico médio, para cada um dos M segmentos. Assim como, média de todos os canais, variância, obliquidade e curtose. Para cada canal de MEA, M segmentos de duração $2NT$ ms foram avaliados para o teste de estacionariedade, teste de razão média, e o teste de gaussianidade, teste Jarque Bera. A porcentagem de segmentos MEA que não pode ser modelada como um processo estacionário (PSNE), ou a que não pode ser modelada por um processo gaussiano (PSNG) foi calculada para cada canal, para as seguintes durações de tempo $2NT = [10 20 40 60 80 100 150 200 250 1000]ms$.

Análise de Conglomerados

A análise de conglomerados será aplicada nos resultados de PSNE e PSNG com objetivo de agrupar os resultados em conglomerados ou clusters. Os conglomerados são identificados como grupos que compõem a população ou a amostra que está sendo analisada. As unidades de um grupo apresentam muitas semelhanças entre si e muitas diferenças em relação às unidades dos demais grupos. Trata-se de um método

exploratório, não um teste estatístico, contendo uma série de algoritmos para classificação dos objetos segundo o grau de similaridade, na tentativa de estabelecer uma estrutura, mesmo sendo inexistente. A análise pode ser realizada segundo alguns critérios de procedimentos, os quais são selecionados conforme as características das variáveis a serem analisadas.

Para aplicação deste método será utilizado o Software Bioestat 5.3. A medida da distância entre as observações é a base da análise de conglomerados. Inicialmente, cada observação é única, entretanto, à medida que os objetos são agrupados, deve-se decidir qual a forma de medir a distância entre um conglomerado e um objeto, ou entre dois conglomerados. Cada método de agregação fornece um critério diferente para definir, no espaço multidimensional, o ponto dentro do grupo que servirá de referência para calcular as distâncias entre esse grupo e outros objetos ou grupos.

A distância na análise de conglomerados é um parâmetro para medir o grau de similaridade entre dois objetos. Cada variável corresponde a uma dimensão, e cada objeto é representado por um ponto no espaço multidimensional resultante. Quanto menor a distância mais similar serão os objetos e, portanto, aumenta a probabilidade de pertencerem ao mesmo grupo.

Neste trabalho foi definido como método de agregação a ligação completa e o tipo de distância calculada foi a Euclidiana.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÕES ANÁLISE CLÁSSICA E DESCRIPTORES DA ESTRUTURA DE DENSIDADE DE PROBABILIDADE DO SINAL BRUTO

Os resultados e discussões foram organizados em sessões a fim de otimizar a sua apreciação. Neste capítulo são apresentados os resultados referentes a utilização de simples quantificadores de primeira ordem; análise Clássica, expoente Alfa e expoente Hurst; além dos resultados de PSNE e PSNG: como descriptores da estrutura de densidade de probabilidade.

Ao todo foram coletados dados de sinal MEA de 85 dias *in vitro* de dez experimentos diferentes, ou seja, de dez placas de cultura de células de neurônios do córtex e do hipocampo cerebral, obtidos de seis a oito embriões de ratos Wistar em seu 18º dia de desenvolvimento. Estas dez placas de cultura celular, preparadas e mantidas sob as mesmas condições foram submetidas ao sistema MEA60 para coleta da atividade elétrica espontânea por 20 minutos durante toda a vida do seu agrupamento celular.

A Tabela 5.1 contém as 10 culturas avaliadas neste trabalho com os respectivos dias *in vitro* registrados. Observa-se que as culturas identificadas pelos números 364, 365 e 366 são aquelas com mais DIV registrados por se tratar de culturas que sobreviveram mais na placa de cultura sob as condições ambientais relatadas na seção 5.1.

Tabela 5.1 – Dias *in vitro* com registro pelo sistema MEA60 das culturas (experimentos) avaliados.

		CULTURAS (EXPERIMENTOS)									
		357	359	360	361	364	366	365	372	371	367
DIV	7	x									
	8		x	x	x	x					
	11		x	x	x	x					
	14	x									
	15		x	x	x	x					
	18	x		x	x	x					
	21		x								
	22			x	x	x					
	25	x	x	x		x	x	x	x	x	x
	29			x	x	x	x	x	x	x	x
	32			x	x	x	x	x	x	x	x
	36			x	x	x	x	x	x	x	x
	39			x		x		x		x	x
	43			x	x	x		x		x	x
	46			x	x	x			x		x
	50			x	x	x					
	53			x	x	x					
	57					x					
	60			x	x	x					
	64			x	x	x					
	67			x		x					
	71				x						
	74				x						
	78				x						
	81				x						
	85				x						
	88				x						

5.1 – Incerteza de Calibração aplicada à Potência

O procedimento proposto no capítulo III para avaliação do sistema metrológico para avaliação da potência com base nos valores de energia foi eficiente de fácil implementação e rastreável. A avaliação de energia permite avaliar a conformidade da corrente de saída, tensão de pico a pico, resistência e energia. Valores máximos de erros (todos acima dos permitidos pela fabricante, neste estudo de caso) foram apresentados em 100% dos equipamentos avaliados. Este resultado negativo pode ser justificado principalmente pelo fato de que o erro máximo aumenta à medida que os valores de potência de corte e coagulação aumentam. Importante destacar que o aumento do fator de temperatura, de 20 °C para 28 °C, afetou estatisticamente os valores de potência para todos os equipamentos avaliados. Observar resultados da característica potência aplicada nos sinais MEA, experimento realizado sob temperatura de 37,1 a 37,4 °C (devido à manutenção de condições biológicas favoráveis à cultura de células), no item 5.2.

5.2 - Quantificadores de Primeira Ordem

A Tabela 5.2 agrupa os resultados obtidos para o cálculo de frequência mediana, desvio da frequência mediana, potência média e desvio da frequência média com janelamento de 50 ms, extraídos a partir da estimação da densidade espectral de potência. Através desta tabela é possível observar o baixo grau de diferenciação dos sinais por meio destes quantificadores, mesmo quando os sinais apresentam grandes diferenças qualitativas ainda no domínio temporal. Isto pode ser observado pela Figura 5.1, que ilustra os segmentos dos canais 44 e 65 de uma cultura celular no DIV 29. Nestes dois canais em questão, o primeiro apresentou frequência mediana de 1487 Hz (vide Tabela 1) e o segundo, 1339 Hz, ambos com desvio padrão acima de 300 Hz. Portanto, fica evidente que a diferenciação entre estes dois trechos de sinal é estatisticamente fraca para tais quantificadores ligados à densidade espectral de potência.

Tabela 5.2 - Resultados dos quantificadores de primeira ordem.

Canal	Freq. Mediana (Hz)	Desvio Freq. Mediana (Hz)	Potência Média (10^{-3})	Desvio Potência Média (10^{-3})
13	1471,03	366,64	0,21	0,101
21	1458,27	309,3	0,2058	0,0716
26	1466,21	326,77	0,207	0,0767
34	1501,05	318,29	0,1966	0,0752
44	1487,21	301,97	0,2024	0,0706
58	1531,13	316,78	0,1928	0,08
65	1339,51	383,61	0,2304	0,0973
77	1414,49	329,63	0,2132	0,0775
84	1421,75	331,47	0,211	0,0938
87	1354,5	359,43	0,2258	0,0854
13	1471,03	366,64	0,21	0,101

Resultados similares aos obtidos para o sinal bruto da MEA também foram obtidos para o sinal de ruído, em que, também se observou pouca diferenciação dos sinais pelos quantificadores de primeira ordem analisados. Desta forma, reforça a conduta de se empregar quantificadores de ordem superior a fim de caracterizar este sinal biomédico com diferenciação estatística suficiente.

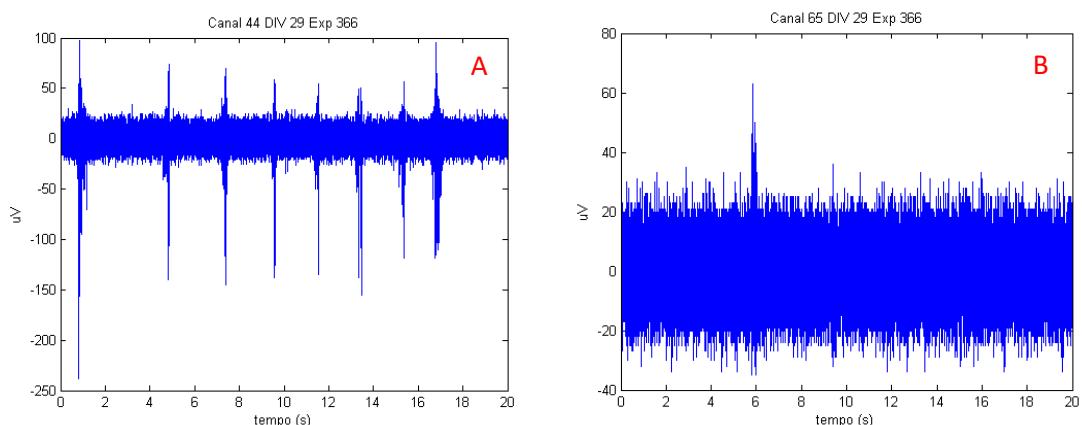


Figura 5.1 - (A) Trecho do sinal bruto da MEA do canal 44 da DIV29 (B) Trecho do sinal bruto da MEA do canal 65 da DIV29.

Os quantificadores não lineares, PSNE e PSNG, calculados sobre estes mesmos dados experimentais, podem ser observados nas Figuras 5.2 e 5.3, respectivamente. É possível inferir que estes indicadores possuem um poder de discriminação considerável ao observar, tanto na Figura 5.2, quanto na Figura 5.3, as diferenças significativas dos indicadores PSNE e PSNG para o canal 44 e 65, por exemplo. A diferença a nível de PSNE e PSNG situa-se ao em torno de 50%, para estes dois canais em questão.

Também foram calculados os indicadores PSNE e PSNG para o processamento do ruído. Os resultados são apresentados nas Figura 5.4 e 5.5. Assim como para o sinal bruto, foi possível observar que os quantificadores não-lineares têm maior poder de caracterização dos trechos de ruídos, refletindo diferenças significativas.

Ressalta-se que o sinal bruto do canal 44, caracterizado por forte presença de atividade neural, traduzido pela presença de numerosos *spikes*, apresentou frequência mediana, potência média e densidade espectral de potência muito similares àquelas do canal 65, caracterizado pela presença de baixa atividade neural e forte contribuição de ruído biológico / instrumentação. Os resultados de desvio padrão calculados para as duas primeiras características confirmam a grande incerteza associada a estas medidas, o que dificulta qualquer tipo de classificação.

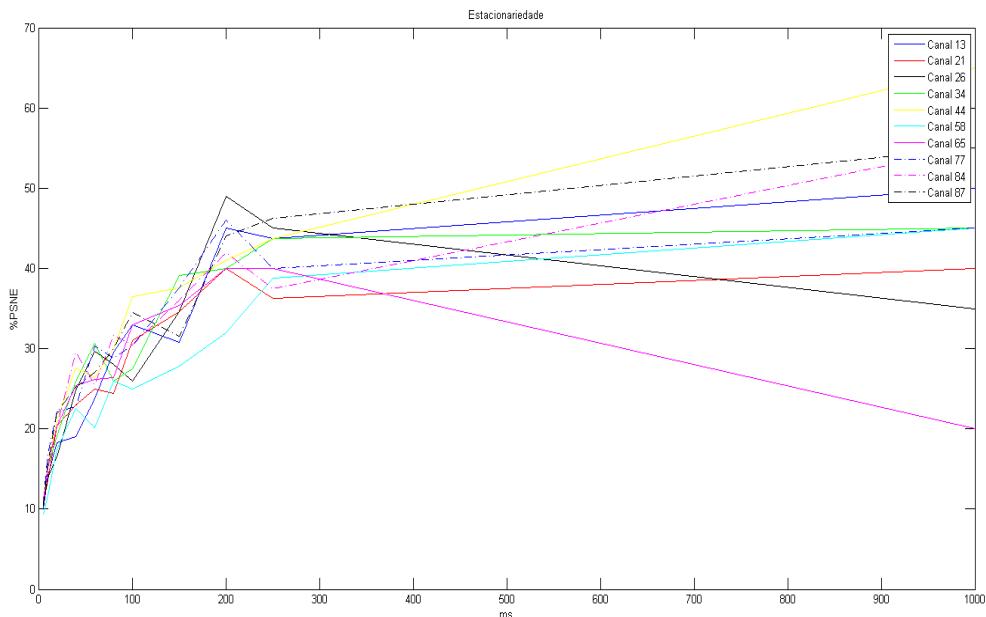


Figura 5.2 - PSNE (%) no eixo vertical e janelamentos em ms de processamento no eixo horizontal para os diversos canais avaliados.

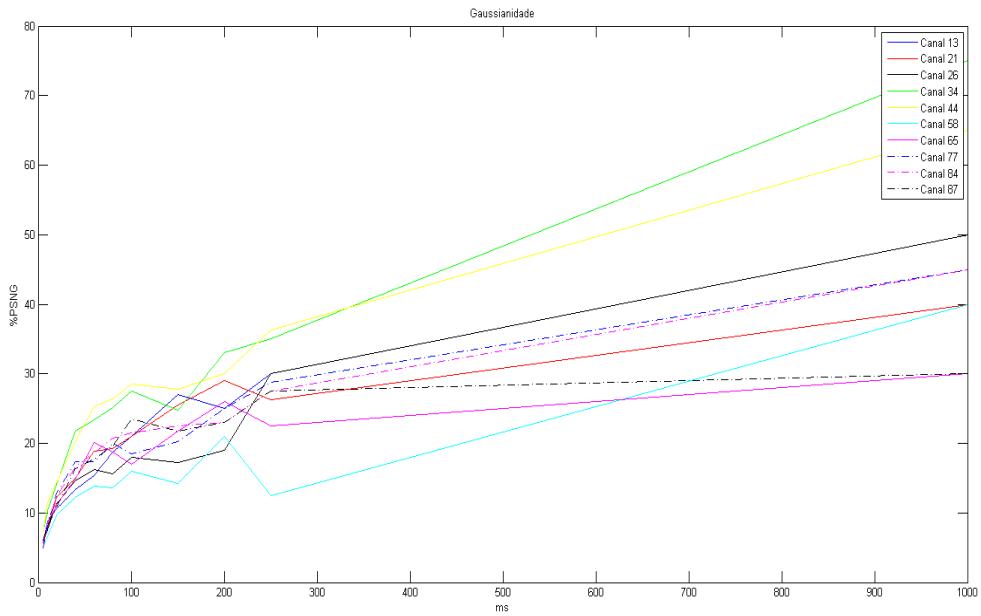


Figura 5.3 - PSNG (%) no eixo vertical e janelamentos de processamento em ms no eixo horizontal para os diversos canais avaliados.

No entanto, importantes considerações podem ser feitas através dos resultados obtidos pelos parâmetros de ordem elevada, PSNE e PSNG. Em primeiro lugar, é possível observar uma diferenciação dos sinais brutos na ordem de 50%, para os dois quantificadores. Ainda em relação ao sinal bruto, observa-se que sinais com forte presença de atividade neural, como o canal 44 da Figura 5.1, os parâmetros PSNE e PSNG apresentam valores elevados, caracterizando um sinal não-estacionário e não gaussiano durante praticamente 60% do tempo. O contrário pode ser visualizado nos resultados do canal 65, caracterizado por predominância de ruído, em que PSNE e PSNG se mantiveram entre 15 e 25%, sinalizando um sinal de caráter altamente gaussiano e estacionário. Estas observações são correlacionadas diretamente com a literatura que caracteriza, de maneira geral, o ruído puro como gaussiano e estacionário (STEIN, GOSSEN, *et al.*, 2005).

Os resultados de processamento do sinal de ruído permitem depreender que os parâmetros PSNE e PSNG são capazes de diferenciar trechos de sinais constituídos por apenas ruídos biológicos. A notar que estes últimos, qualitativamente, não apresentam diferenças perceptíveis no domínio do tempo. Relacionando estes resultados com as características de crescimento de cultura, elucidadas pela literatura (KANDEL, SCHWARTZ, *et al.*, 2000), é possível analisar que os canais da DIV08 se mostraram mais gaussianos e estacionários que aquelas do DIV32, Figuras 5.4 e 5.5.

Sabidamente, o dia *in vitro* 8 é caracterizado como cultura não madura, com comportamento desorganizado, poucas conexões da rede neural e, portanto, baixa presença de ruído biológico e alta presença de ruído de instrumentação. Já o sinal do DIV 32 apresenta-se como ápice de maturação da cultura, com conexões neurais fortalecidas, em plena comunicação organizada, e alto nível de ruído biológico.

Por fim, o DIV 64 mostrou-se altamente gaussiano, pois este dia *in vitro* aproxima-se da morte celular, em que, praticamente, não há mais comunicação na rede neural. Esta análise não considera o canal 33 da DIV 64 que apresentou comportamento desconexo com os demais canais. Ressalta-se que o ruído de instrumentação, também denominado ruído branco, é classificado como gaussiano e estacionário. Todavia o ruído biológico é caracterizado como não-gaussiano e não-estacionário, devido à complexidade e estocasticidade das suas fontes de origens, além de carrear em si parte da informação biológica – código neural (FAISAL, SELEN, *et al.*, 2008).

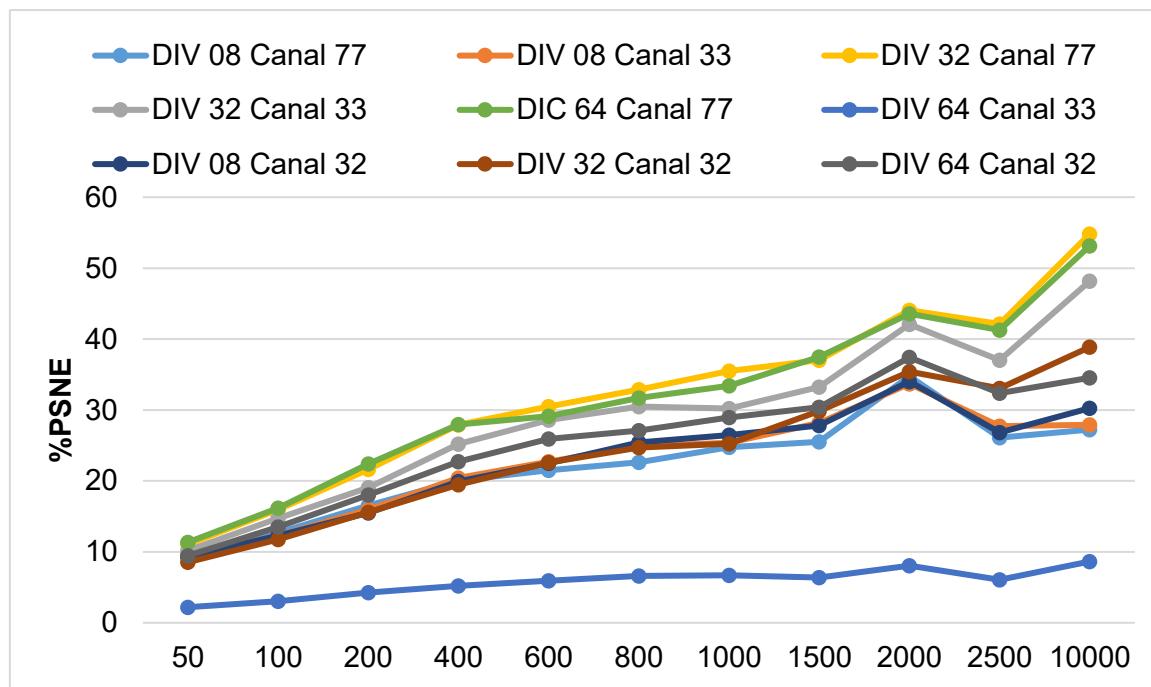


Figura 5.4 - PSNE no eixo vertical e janelamentos de processamento no eixo horizontal para os diversos segmentos de ruído avaliados.

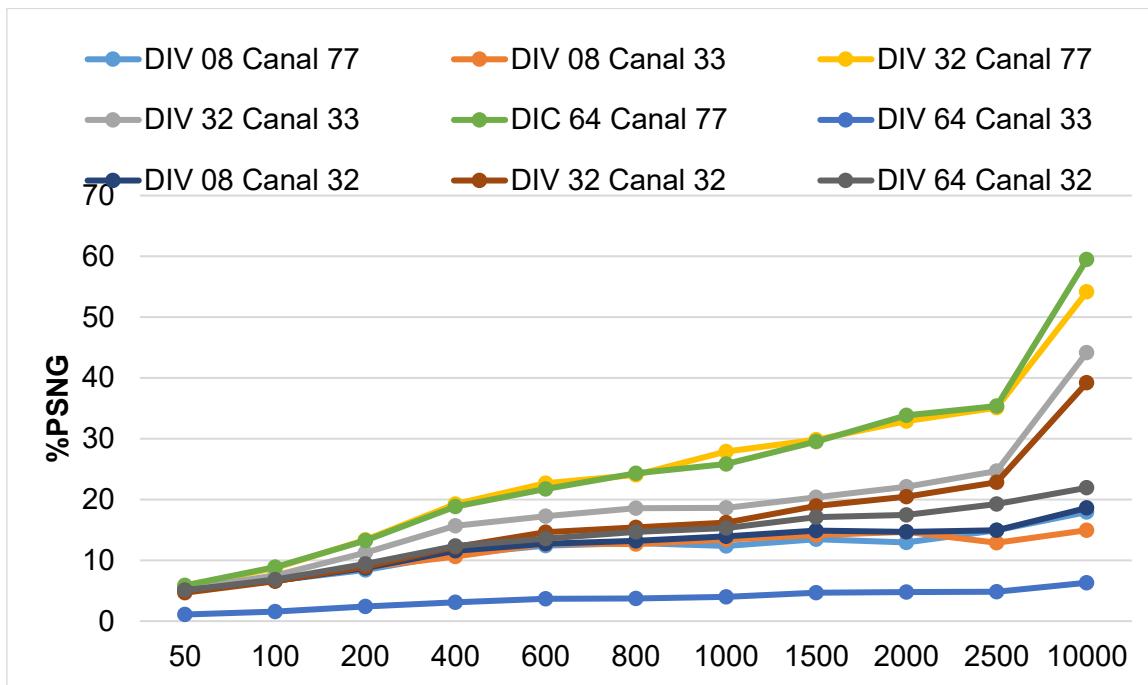


Figura 5.5 - PSNG no eixo vertical e janelamentos de processamento no eixo horizontal para os diversos segmentos de ruído avaliados.

5.3 – Resultados exploratórios da Análise Clássica, Exponente Alfa e Exponente Hurst

Os resultados exploratórios da análise clássica são dispostos na Figura 5.6. Pode-se observar que para as DIV iniciais, durante o processo de formação da rede neural, os totais de *spikes* e *bursts* são os mais baixos, como os entre as DIV's 08 e 18. Isto evidencia a baixa atividade da rede, reforçado pelos altos intervalos entre *spikes* e *bursts* (ISI e IBI). No período de maturidade (DIV 22 até DIV 60) da cultura, observa-se os maiores índices de *spikes* e *bursts*, assim como os menores intervalos ISI e IBI, caracterizando uma cultura ativa, com atividade neurológica organizada. Por fim, após o período de maturidade, a cultura de células começa a esboçar menor atividade elétrica, com a queda do total de *spikes* e *bursts* e aumento dos intervalos ISI e IBI, excetuando-se nas DIV's que antecedem a morte celular (DIV 81 – DIV 88) em que ocorrem um aumento significativo de *spikes* e *bursts* e uma diminuição dos intervalos ISI e IBI.

A Figura 5.7 mostra os valores do Expoente Alfa para cada DIV considerado neste experimento comparativo à análise clássica. As barras de erro da figura são referentes ao desvio padrão e a curva azul ao expoente alfa. O eixo y representa o valor médio do Expoente Alfa dos 60 canais da MEA para cada DIV e o eixo x representa o DIV analisado. Observa-se que no DIV 08 o menor valor do Expoente Alfa (-1,20) com elevado desvio padrão. Do DIV 18 até o DIV 29 o valor de alfa aumentou cruzando a linha do 0. Abaixo de zero indica um sinal altamente estacionário com um possível controle momentâneo do crescimento da cultura, com uma atividade semelhante em todos os canais da matriz de eletrodos. Os desvios padrão não superam os limites da região de transição entre a estacionariedade e não estacionariedade.

Ainda referente aos resultados do expoente alfa médio, do DIV 29 ao DIV 60 o valor do Expoente Alfa chegou à -0,3 com baixo desvio padrão em 43. Do DIV 60 ao DIV 71, o alfa apresentou-se próximo de zero com pouca variação, exceto pelo DIV 67. De forma sintética, a partir do DIV 29, até o 53-71 DIV's observa-se estabilidade de alfa em torno de zero, o que é característico de ruído branco. Neste período a rede de neurônios estaria pronta para transmitir um impulso, com atividade elétrica randômica, típica de um sistema em que não há transmissão de informação relevante (COTTERILL, HALL, *et al.*, 2016, ESPOSTI, FERRARIO, *et al.*, 2008). Entre os DIV's 74 e 88 há uma variação dos Expoentes Alfa e dos respectivos desvios padrão. No DIV 81 o Expoente Alfa é muito baixo com alto desvio padrão. Estes últimos DIV's retomam o comportamento observado nos primeiros DIV's, com aumento na variação dos valores que pode ser tratado como um desacoplamento funcional da atividade elétrica dos neurônios. Desta maneira, a rede perde sua capacidade de auto-organização, com períodos de grande não estacionariedade, o que culmina com a morte celular após este período.

Analogamente ao gráfico do Expoente Alfa observa-se a Figura 5.8 que representa o valor médio do Expoente Hurst para cada DIV com o respectivo desvio padrão. O eixo y representa o valor médio do Expoente Hurst para todos os canais da MEA e o eixo x representa o DIV em análise. Entre os DIV's 08 e 18 o valor do Expoente Hurst varia em torno de 0,5. Observa-se que para este quantificador o valor do desvio padrão permanece estável entre 0,07 e 0,1 em todos os DIV's. Os primeiros DIV's analisados indicam uma oscilação do valor de H seguida por um sutil crescimento, sendo que este crescimento pode ser interpretado como um aumento das correlações de longo-alcance. Da mesma forma que na análise por DFA, o pico observado na DIV 18 pode ser relacionado ao processo de “*pruning*” que ocorre na cultura.

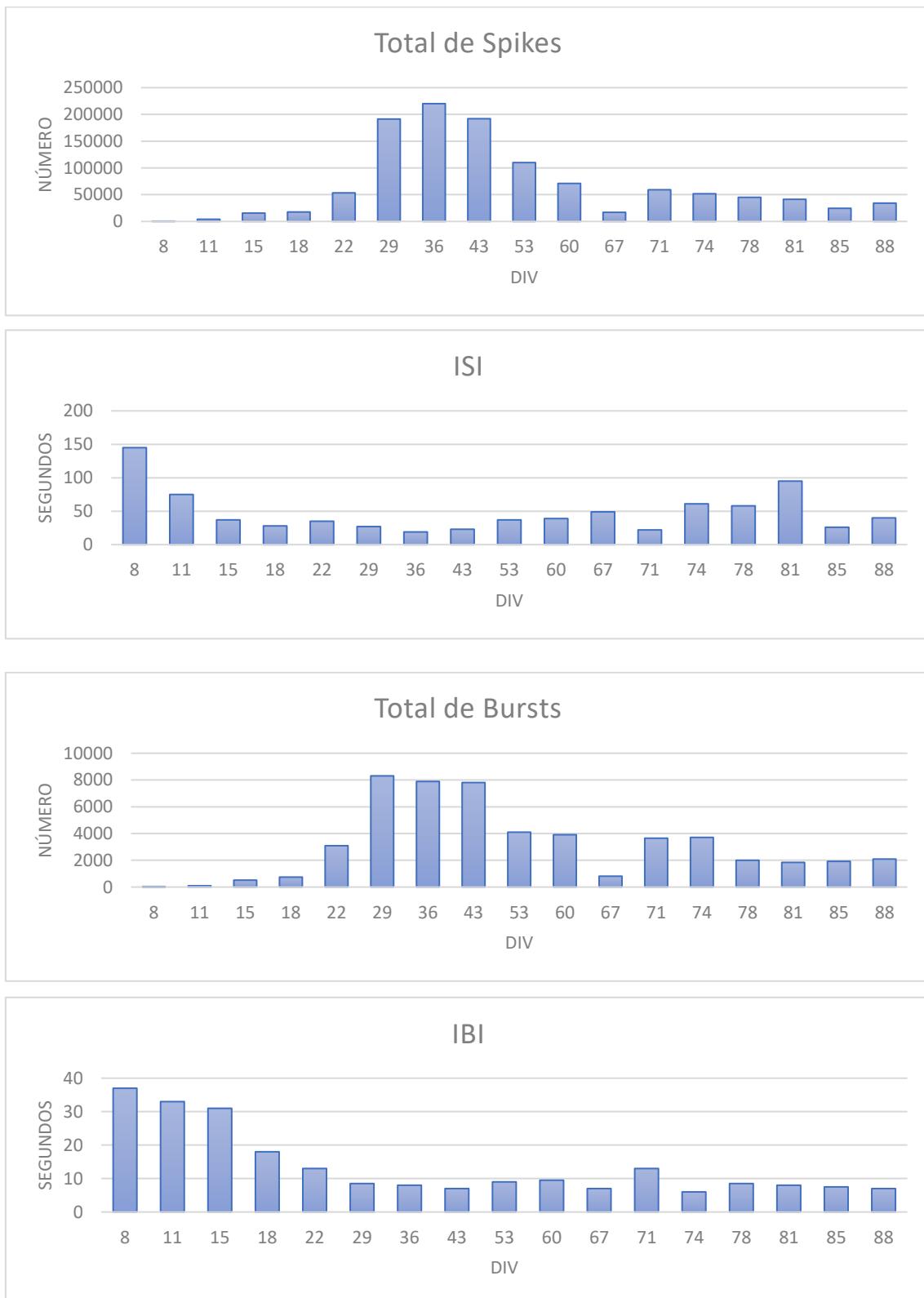


Figura 5.6 – Resultados da Análise Clássica, sendo eles total de *spikes*, ISI, total de *bursts* e IBI.

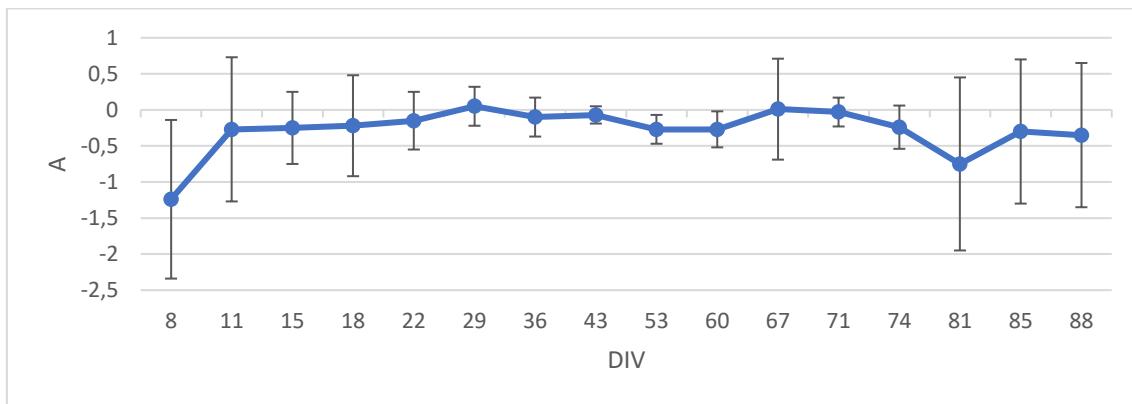


Figura 5.7 – Resultados do expoente alfa médio (A) para as DIV consideradas

No DIV 29 o valor do Expoente Hurst é de aproximadamente 0,53 e em DIV 53 o valor é de 0,4. No DIV 67 o Expoente Hurst volta a diminuir até atingir 0,30. Em resumo, entre 36 e 71, há certa estabilidade dos valores de H em torno de 0,45 para a cultura, o que é característico de ruído branco, exceto para a DIV 67. Além disso, a dispersão dos valores diminui o que indica um comportamento semelhante nos diferentes sítios da rede. Do DIV 71 à 88 o Expoente Hurst varia entre 0,40 e 0,50 mostrando uma perda das propriedades fractais, devido a um excesso de ordem ou randomicidade descorrelacionada da série de dados. Esta alteração é perceptível tanto pela variação do expoente H quanto pelo aumento da dispersão dos valores.

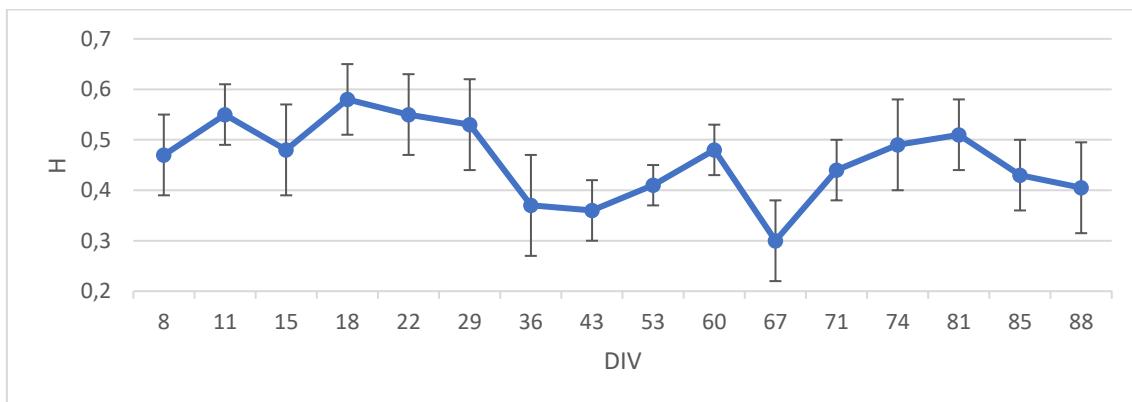


Figura 5.8 – Resultados do expoente de Hurst (H) para as DIV consideradas

5.4 - Análise Clássica, Expoente Alfa e Expoente Hurst por fases do crescimento celular

Conforme os resultados apresentados na seção 5.2, a análise clássica, o expoente alfa e o expoente Hurst apresentaram indicativo potencial de diferenciação das fases de crescimento celular da cultura neuronal avaliada. Desta forma, estas técnicas de processamento de sinais foram aplicadas ao conjunto de todos os experimentos executados neste trabalho, os resultados estão sintetizados na Tabela 5.3.

Os DIV dos experimentos foram separados nas três principais fases do crescimento celular: início do desenvolvimento, maturidade celular e morte celular. Em referência à literatura apresentada na seção 2.2 os dias *in vitro* compreendidos entre DIV 7 e DIV 18 foram classificados em início de desenvolvimento, com 20 amostras; a maturidade celular foi compreendida entre DIV 22 e DIV 46, com 44 amostras; e por fim, a fase de morte celular foi segmentada para os dias *in vitro* acima do DIV 46, com 21 amostras.

A fase de morte celular foi assim denominada para representar o período do desenvolvimento de células neuronais *in vitro* em que se iniciam os processos de envelhecimento da cultura. Não será estudado nesta tese o momento exato da morte celular completa da cultura de células, mas sim o processo que inclui a morte progressiva dos neurônios *in vitro*.

A Tabela 5.3 sintetiza os resultados de Análise clássica, expoente alfa e Hurst do sinal bruto captado pelos experimentos utilizando-se de MEA. Foram apresentados nesta tabela os valores referentes a média, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), assimetria e curtose a fim de caracterizar e descrever estatisticamente as três principais fases de crescimento celular. Em relação aos resultados de análise clássica, denota-se que grande parte das características extraídas se compõem de dados altamente heterogêneos, com coeficientes de variação superiores a 30%, para todas as fases de desenvolvimento celular avaliadas. A única característica com média dispersão se deu para o expoente Hurst, apenas durante a fase de morte celular. Desta forma, as características da análise clássica aplicada para este conjunto de dados devem ser representadas pela mediana.

Tabela 5.3 - Análise Clássica aplicada ao sinal bruto (contendo ruído e atividade espontânea) captado pelos experimentos com MEA

SINAL BRUTO		DFA	HURST	Nburst	IBI Médio	IBI Desvio	Spike Rand	ISI Médio	ISI desvio
Início do Desenvolvimento	Média	0,13	0,73	350,55	17,60	10,37	26,21	78,26	63,64
	Mediana	0,31	0,61	105,50	10,81	1,82	21,43	57,88	52,31
	Desvio	0,58	1,28	522,51	26,16	22,12	26,48	75,00	48,72
	CV	448,47	175,27	149,05	148,67	213,30	101,02	95,83	76,55
	Assimetria	-2,62	2,39	2,22	2,52	2,68	1,06	2,27	1,95
	Curtose	7,52	11,61	5,59	7,39	6,67	0,74	6,84	5,52
Maturidade Celular	Média	0,46	0,58	6659,58	11,36	3,68	20,53	28,64	44,50
	Mediana	0,46	0,56	5984,50	10,24	1,27	18,44	14,49	12,32
	Desvio	0,12	0,19	1706,04	4,91	1,21	17,18	125,44	104,70
	CV	25,93	32,86	25,62	43,26	32,91	83,68	437,99	235,30
	Assimetria	-0,18	0,00	0,87	2,51	4,85	0,61	5,75	6,60
	Curtose	0,21	-1,18	0,44	7,85	25,84	-0,49	35,82	43,74
Morte Celular	Média	0,39	0,70	2975,76	8,69	1,48	35,23	67,82	42,90
	Mediana	0,44	0,73	3375,00	8,03	1,22	30,42	36,68	17,39
	Desvio	0,12	0,19	1706,04	4,91	1,21	17,18	125,44	104,70
	CV	30,41	27,25	57,33	56,58	82,19	48,77	184,96	244,04
	Assimetria	-1,24	-1,11	-0,06	0,47	2,05	0,87	4,30	4,52
	Curtose	1,44	0,71	-1,27	-0,25	5,99	0,04	19,21	20,62

Outras medidas que permitem uma compreensão inicial dos dados e dão parâmetros da distribuição de densidade e probabilidade são a curtose e coeficiente de assimetria. De maneira geral, o coeficiente de assimetria indicou ligeira assimetria positiva ou negativa em todas as variáveis calculadas. Porém, devido ao baixo grau de assimetria, assume-se a utilização do desvio padrão convencional, não sendo necessário a utilização do desvio da mediana, apesar da medida de representação dos dados ser a mediana.

Neste mesmo sentido, a curtose foi calculada e indicou tendência a proximidade da distribuição normal dos dados, com exceção do desvio padrão da variável IBI, em que houve forte curtose positiva, principalmente na fase de maturidade celular. No entanto, a avaliação de distribuição dos dados foi verificada através do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, como segue na Tabela 5.4, e na análise do boxplot das variáveis.

Na Tabela 5.4 apresentam-se os resultados do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para aplicação deste teste foram observados o valor Crítico Unilateral ($p < 0,01$) de 0,329 para todos os testes da fase de início de desenvolvimento. Para fase de maturidade celular utilizou-se o valor crítico de 0,2291 e na fase de morte celular o valor 0,321. Nesta tabela é possível observar que a maior parte das variáveis de análise clássica, para todas as etapas do desenvolvimento celular, são de distribuição normal. É possível notar que a variável expoente Hurst apresenta conjunto de dados não

normais apenas na fase do início do desenvolvimento. No entanto, a variável ISI médio apresentou não normalidade nas faixas de maturidade e morte celular. É importante testar e conhecer a distribuição dos dados a fim de guiar as demais análises estatísticas, como é o caso da ANOVA de único critério utilizado nesta análise e que supõe dados normalmente distribuídos.

Tabela 5.4 - Resultados do teste Kolmogorov-Smirnov para normalidade das variáveis de análise clássica, DFA e HURST.

SINAL BRUTO		DFA	HURST	Nburst	IBI Médio	Spike Rand	ISI Médio
Início de Desenvolvimento	Desvio Máximo	0,3158	0,3583	0,2458	0,2483	0,1549	0,1776
	Resultado	Normal	Não Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Maturidade Celular	Desvio Máximo	0,0576	0,117	0,1505	0,2211	0,1334	0,3215
	Resultado	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Não Normal
Morte Celular	Desvio Máximo	0,1657	0,1913	0,1561	0,1855	0,1565	0,371
	Resultado	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Não Normal

Desta forma, foi aplicada ANOVA de único critério para as variáveis de análise clássica e para os expoentes alfa e Hurst. A designação ANOVA, análise de variância, foi executada através do software Bioestat 5.0 por meio do F-teste em homenagem a seu inventor Ronald Fisher. Este teste visou comparar mais de duas amostras cujos dados foram mensurados em escala intervalar. A designação um critério é pelo fato de se comparar somente as variações entre as fases do crescimento celular, cujo resultado é traduzido no valor do F-teste, complementando-se com o exame a posteriori (Tukey), das diferenças entre as médias amostrais. Nesta aplicação as amostras tinham tamanhos desiguais, o que é aceito por este teste. A Tabela 5.5 apresenta os resultados desta metodologia.

Para aquelas características em que o valor de F foi significativo, aplicou-se o teste Tukey das diferenças entre as médias amostrais. Observa-se na Tabela 5.5 que apenas as características DFA, Nburst e Spike randômico apresentaram diferenças significativas no teste F, havendo, portanto, alguma diferenciação entre as médias das fases de crescimento celular. Seguem as hipóteses da aplicação do teste Tukey para as variáveis com F significativo:

H0: a característica não é alterada pelo crescimento, maturação e morte celular da cultura neuronal *in vitro*;

H1: a característica é alterada pelo crescimento, maturação e morte celular da cultura neuronal *in vitro*;

Tabela 5.5 - Resultados da aplicação da ANOVA de único critério com teste F-teste e Tukey para análise das diferenças entre as médias amostrais para análise clássica, expoente alfa e expoente Hurst.

	F-teste		Início e Maturidade		Início e Morte		Maturidade e Morte	
	F	p value	#	p value	#	p value	#	p value
DFA	8,50	0,0007	0,33	< 0,01	0,26	< 0,05	0,07	ns
HURST	0,48	0,6231	*	*	*	*	*	*
Nburst	33,53	0,0001	6309	< 0,01	2625	< 0,05	3684	< 0,01
IBI Médio	2,14	0,1217	*	*	*	*	*	*
Spike Rand	4,88	0,01	5,68	ns	9,02	ns	14,69	< 0,01
ISI Médio	3,02	0,0528	*	*	*	*	*	*

Portanto, os resultados da Tabela 5.5 também nos permitem dizer que se rejeita a hipótese nula e assume-se que: a característica DFA é alterado ao longo das fases do crescimento celular, havendo diferença entre as médias do grupo de início do desenvolvimento para os demais, maturidade e morte celular, porém, não há diferença entre os grupos de morte e maturidade celular; a variável Nburst altera-se ao longo do crescimento celular e há diferença significativa entre as médias de todas as fases; o quantificador Spike Randômico também é sensível à mudança de fase do crescimento celular, porém essa diferença é significativa apenas entre as fases de maturidade e morte celular.

Apresentando os resultados da Tabela 5.5 de forma gráfica na Figura 5.9 em relação à variável Nburst é possível observar que a variável tem alta diferenciação entre as médias amostrais do grupo início de desenvolvimento e maturidade celular. Isto é evidente ao ponto que no início do crescimento celular a rede neural ainda não se

encontra totalmente formada, com densidade sináptica baixa e predominância de conexões tipo junção gap, gerando, portanto, um baixo número de *bursts*. Esta forte diferenciação também é observada entre as fases de maturidade e morte, em que na primeira observamos características de plasticidade e estabilidade da atividade espontânea e na morte celular nota-se um declínio desta atividade elétrica.

Por fim, o *Nburst* também é capaz de diferenciar as fases de início e morte celular. Estas fases do crescimento celular são muito parecidas no que se refere a atividade espontânea da rede neural, no entanto, a fase de morte celular é representada por um maior número de *bursts* já que o processo de morte celular não é uniforme e apresenta atividades assíncronas na rede. Esta mesma evidência é constada na Figura 5.10.

A Figura 5.10 corrobora a ANOVA realizada para *Nburst*. Neste Boxplot é possível observar diferença significativa entre as medianas das fases de crescimento celular, apresentando mediana de 350 *bursts* na fase de início da cultura celular, com baixa variação entre primeiro quartil e o terceiro quartil e valores máximos e mínimos próximos à mediana. Já na fase de maturidade celular há alta variabilidade entre os valores máximos e mínimos, provavelmente pela grande quantidade de *spikes* aleatórios, porém, sincronizados, assim como uma alta mediana de *Nbursts*, com valor de 6659 *bursts*. Por fim, a fase de morte celular apresenta uma mediana intermediária de *Nburst*, 2975 *bursts*, bem característica em comparação às demais fases e com baixa amplitude entre os máximos e os mínimos.

A Figura 5.11 traz o *Boxplot* da variável *Spike Randômicos*. Esta característica mostrou significativa diferença entre as médias das fases de maturidade da rede neural e morte celular no teste ANOVA, Tabela 5.5 e na Figura 5.11 se reforça o potencial desta característica como marcador biológico para morte celular. Nesta figura observa-se que para a fase de início do desenvolvimento há alta variabilidade dos resultados, com máximo de quase 65% dos *spikes* aleatórios e grande amplitude do primeiro e terceiro quartil mantendo a mediana em aproximadamente 21% dos *spikes* randômicos. Há pouca diferenciação entre o início e a maturidade, esta última também caracterizada com *spikes* aleatórios sincronizados. Porém, a análise se torna interessante ao observar a fase de morte celular, com mediana de *spikes* randômicos acima de 30% e baixa amplitude dos quartis, caracterizando esta fase do crescimento celular com baixa plasticidade e desorganização da rede neural.

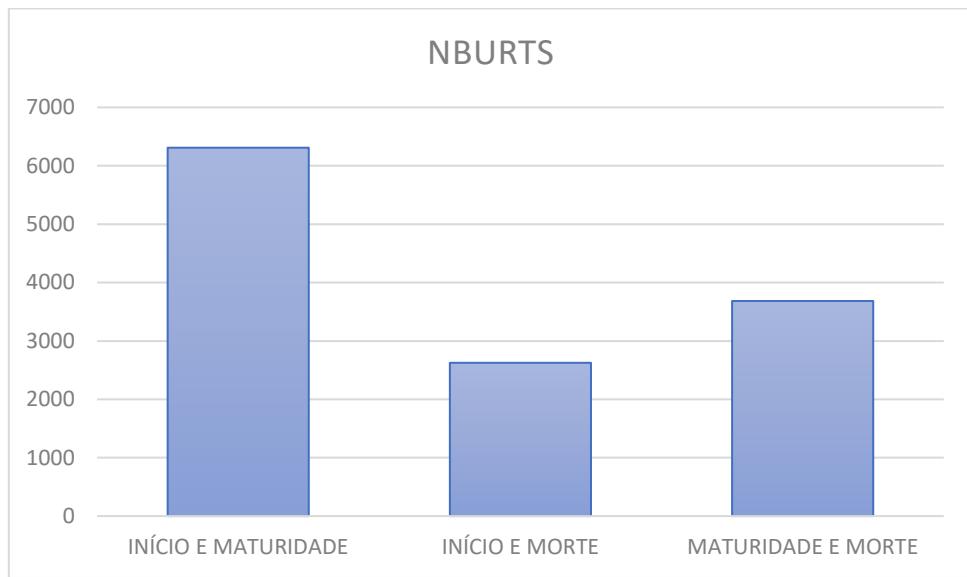


Figura 5.9 – ANOVA da variável *Nburst* para as três fases do crescimento celular *in vitro*, evidenciando diferença significativa entre a média de todas as fases.

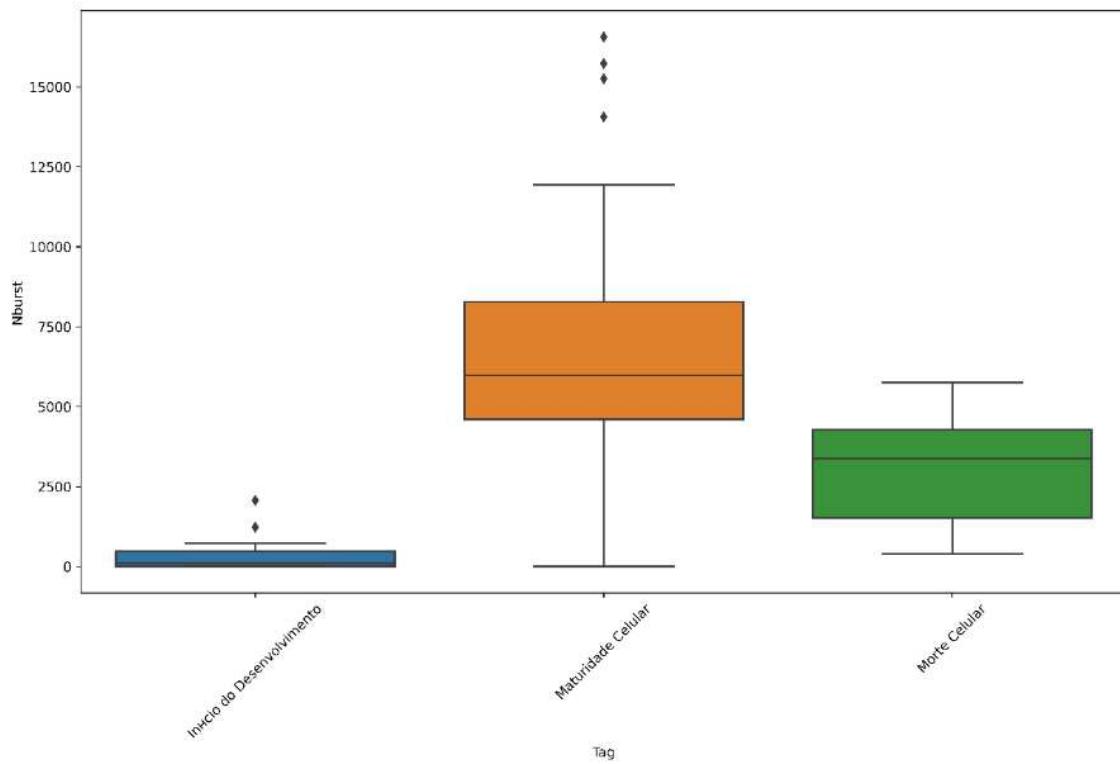


Figura 5.10 – Box Plot da variável *Nburst* (número de *bursts*) para as três fases do crescimento celular *in vitro*.

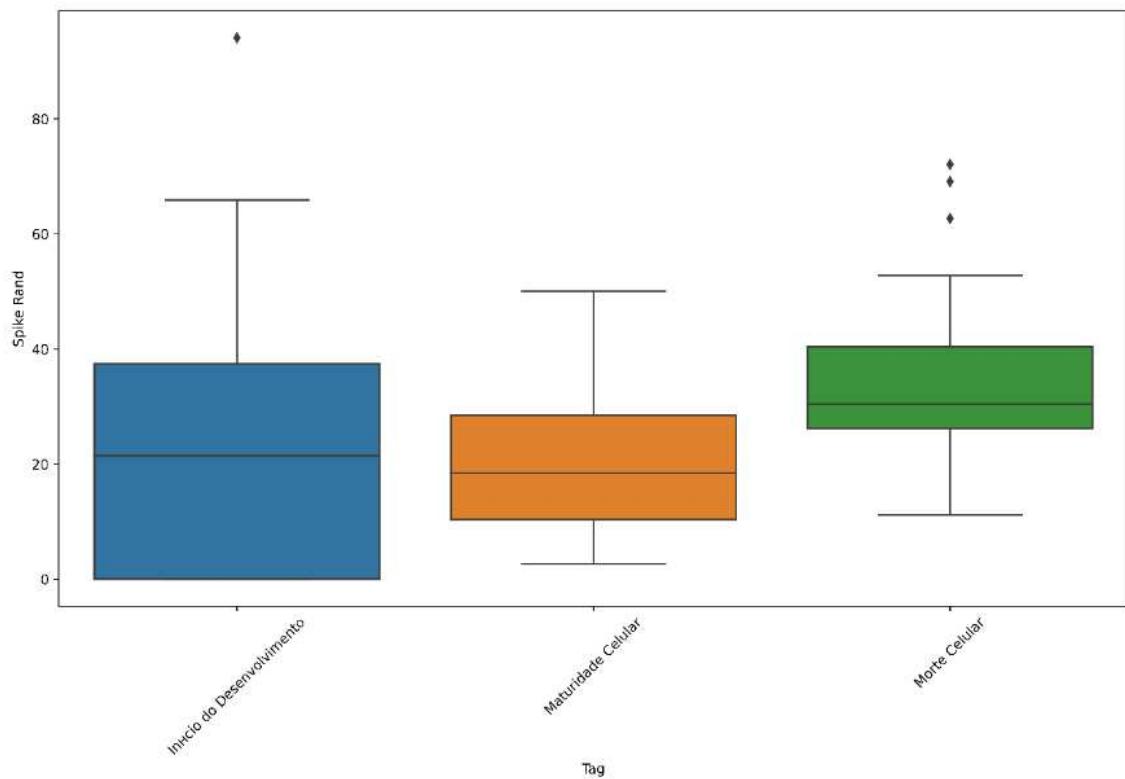


Figura 5.11 – Box Plot da variável *Spike Randômico* para as três fases do crescimento celular *in vitro*.

5.5 – Descritores da Estrutura de Densidade de Probabilidade no Sinal Bruto: PSNE e PSNG

Nesta seção serão apresentados os resultados referentes aos descritores da estrutura de densidade de probabilidade escolhidos para caracterizar os sinais MEA obtidos. São discutidos os resultados obtidos pelas janelas de processamento; os resultados de PSNE e PSNG na caracterização do crescimento da cultura neuronal; as análises estatísticas dos resultados médios de PSNE e PSNG no sinal bruto, ou seja, no sinal MEA composto por atividade elétrica espontânea, ruído de instrumentação e ruído biológico.

Resultados de PSNE e PSNG pela janela de processamento

A Figura 5.12 e 5.13 mostra os resultados do experimento denominando 364, referente à PSNG e PSNE, respectivamente, para a média destes descritores dos canais da matriz multieletrodo em todas as janelas de processamento analisadas. Os resultados foram obtidos para as janelas de processamento de 40ms a 1s, evidenciando variabilidade dos resultados associada ao tamanho da janela de processamento.

Para representar cada canal e, por conseguinte, toda a cultura para um determinado dia *in vitro* foi determinada a média dos resultados de janelamento. Isto se fez após calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (divisão do desvio por média, multiplicado por 100) dos resultados de cada canal obtido nas diferentes janelas de processamento. Este mesmo cálculo foi realizado em todos os canais de todas as DIV's consideradas, de todos os experimentos em análise. O coeficiente de variação foi inferior à 30% em todos os resultados revelando que os dados são homogêneos com média dispersão, assim, determinou-se a média como indicador descritivo dos parâmetros de características de cada canal, assim como da DIV como um todo.

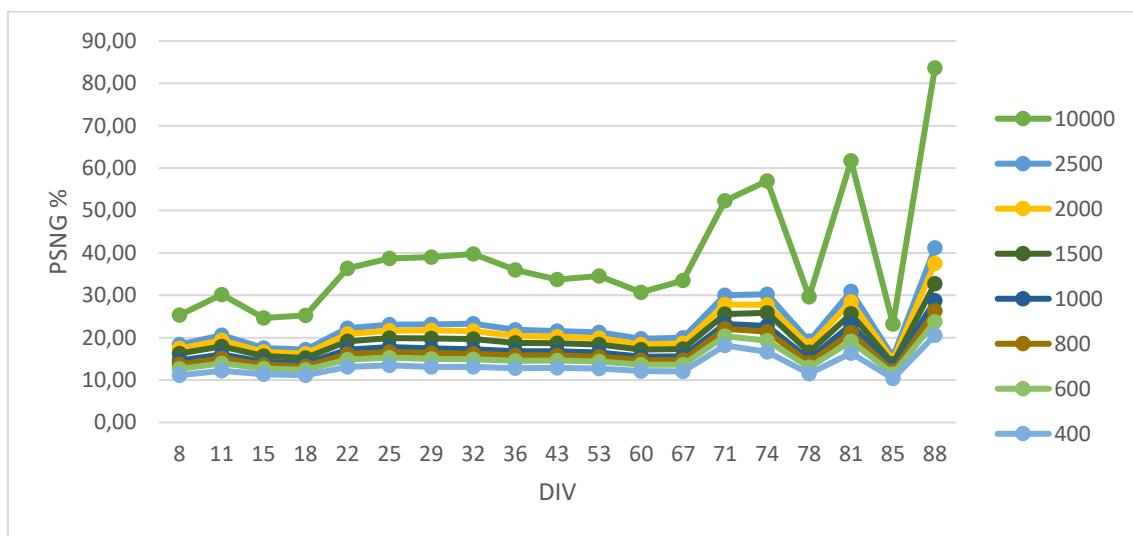


Figura 5.12 - Resultados médios de PSNG para as DIV 8 a DIV 88 de um dos experimentos. Evidencia-se a variabilidade dos resultados pela janela de processamento (de 400 a 10.000 amostras, ou seja, de 40 a 1000 ms).

Resultados de PSNE e PSNG na caracterização do crescimento da cultura neuronal

A Figura 5.14 representa a média de PSNG dos 60 canais das DIV's consideradas neste experimento, assim como a Figura 5.15 representa os resultados médios de PSNE. Observa-se em ambas as figuras o poder de caracterização dos estágios de crescimento da cultura celular, desde sua fase inicial do desenvolvimento (DIV 08 à DIV 22), até a fase de morte celular (DIV 71 à DIV 88). Em conformidade com a literatura, as fases iniciais, caracterizadas por tipos imaturos de sinapses, apresenta baixos níveis de não gaussianidade e não estacionariedade, reflexo da densidade sináptica baixa.

A fase de maturidade, entre as DIV 22 à DIV 36, caracterizada por completa maturação das conexões excitatórias, *spikes* sincronizados e conexões sinápticas próximas, apresenta não estacionariedade e não gaussianidade estáveis, superiores à fase inicial, em 16% de períodos não gaussianos e 23% de períodos não estacionários. Por fim, entre as DIV 36 à DIV 67 observa-se um decaimento nos níveis de PSNG e PSNE, caracterizando o início do processo de morte da cultura neuronal que se caracteriza a partir da DIV 67, em que nos valores de PSNG e PSNE apresentam variações extremas, caracterizando o desmantelamento da rede neural.

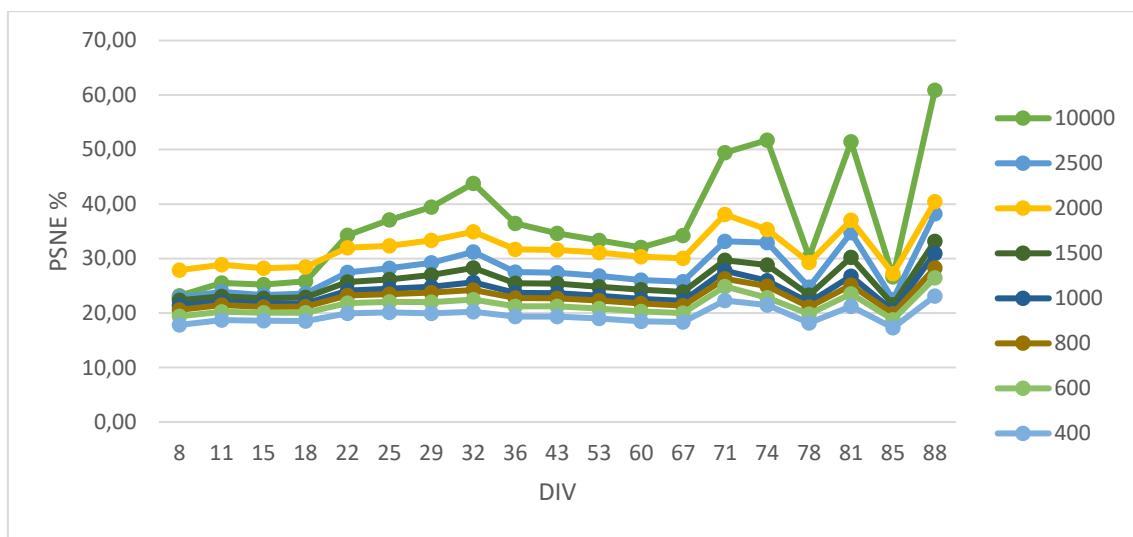


Figura 5.13 - Resultados médios de PSNE para as DIV 8 a DIV 88. Evidencia-se a variabilidade dos resultados pela janela de processamento.

Analogamente à Figura 5.14 e a Figura 5.15 apresentam os parâmetros médios de PSNG e PSNE, respectivamente. No entanto, os resultados são apresentados sob a ótica geométrica da matriz de eletrodos, evidenciando estes descriptores por canal. É possível observar que há correlação geográfica entre os canais com maior ou menor PSNG e PSNE, caracterizando as conexões sinápticas entre neurônios da cultura.

Além disto, é possível discutir sob as Figuras 5.16 e 5.17, as mesmas conclusões emitidas via análise dos resultados globais das Figuras 5.14 e 5.15. Ou seja, é possível observar pontos isolados de maior não gaussianidade (PSNG) e não estacionariedade (PSNE) nas DIV iniciais; um espalhamento de PSNG e PSNE ao longo de toda a matriz de microeletrodos na fase de maturação (DIV 22 à DIV 67); e ainda o período de instabilidade dos descriptores nas fases que antecedem e compõe a morte da cultura celular (DIV 67 à DIV 88).

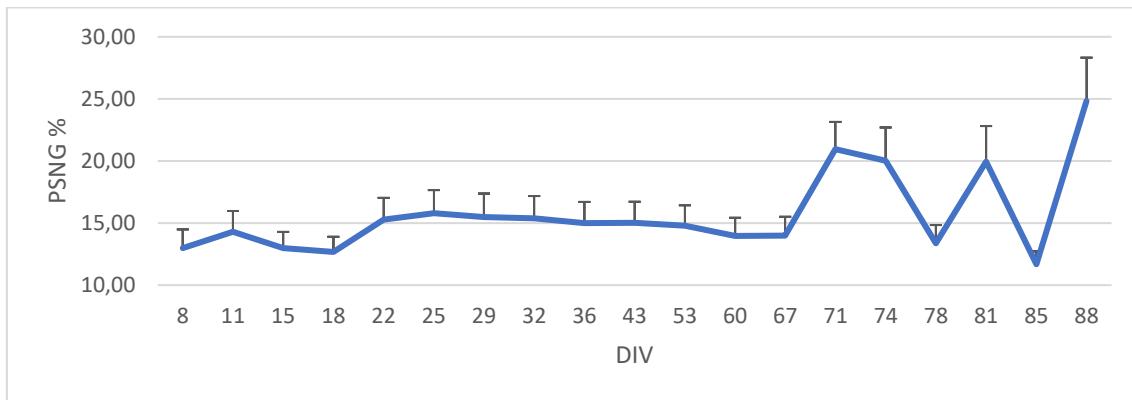


Figura 5.14 – Resultado do cálculo médio dos PSNG de cada canal das DIV consideradas.

Em complemento a esta análise, foram processados todos os sinais MEA obtidos através de 10 experimentos de atividade neuronal espontânea. Os resultados médios dos descriptores PSNE e PSNG são apresentados na Tabela 5.6. Apenas três experimentos analisados (Experimento 364, 365 e 366) possuem informações de um número significativo de dias *in vitro* que permite uma análise da evolução destes indicadores ao longo da evolução da cultura neuronal sob a MEA. Vale ressaltar que cada DIV de um experimento é representado pela mediana dos descriptores PSNG e PSNE calculados para os 60 canais da placa de cultura MEA. Este cálculo gerou um custo computacional médio de aproximadamente 8 horas de processamento para cada

DIV, visto que foram efetuados os cálculos para 8 janelamentos de sinal: janelas de processamento de 40ms a 1s conforme Figura 5.12. Portanto, foram mais de 680 horas de processamento, o que evidencia a importância em se definir o melhor janelamento para o processamento de sinais biomédicos.

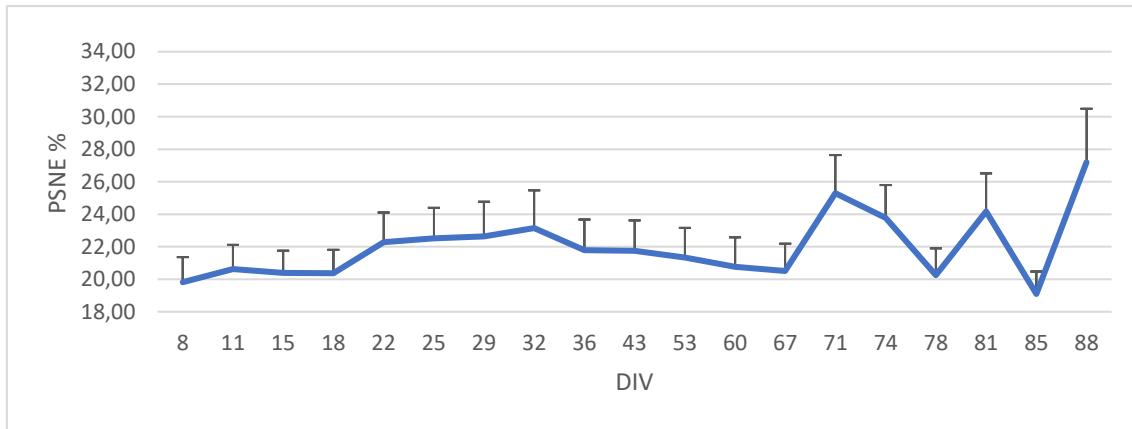


Figura 5.15 – Resultado do cálculo médio dos PSNG de cada canal das DIV consideradas.

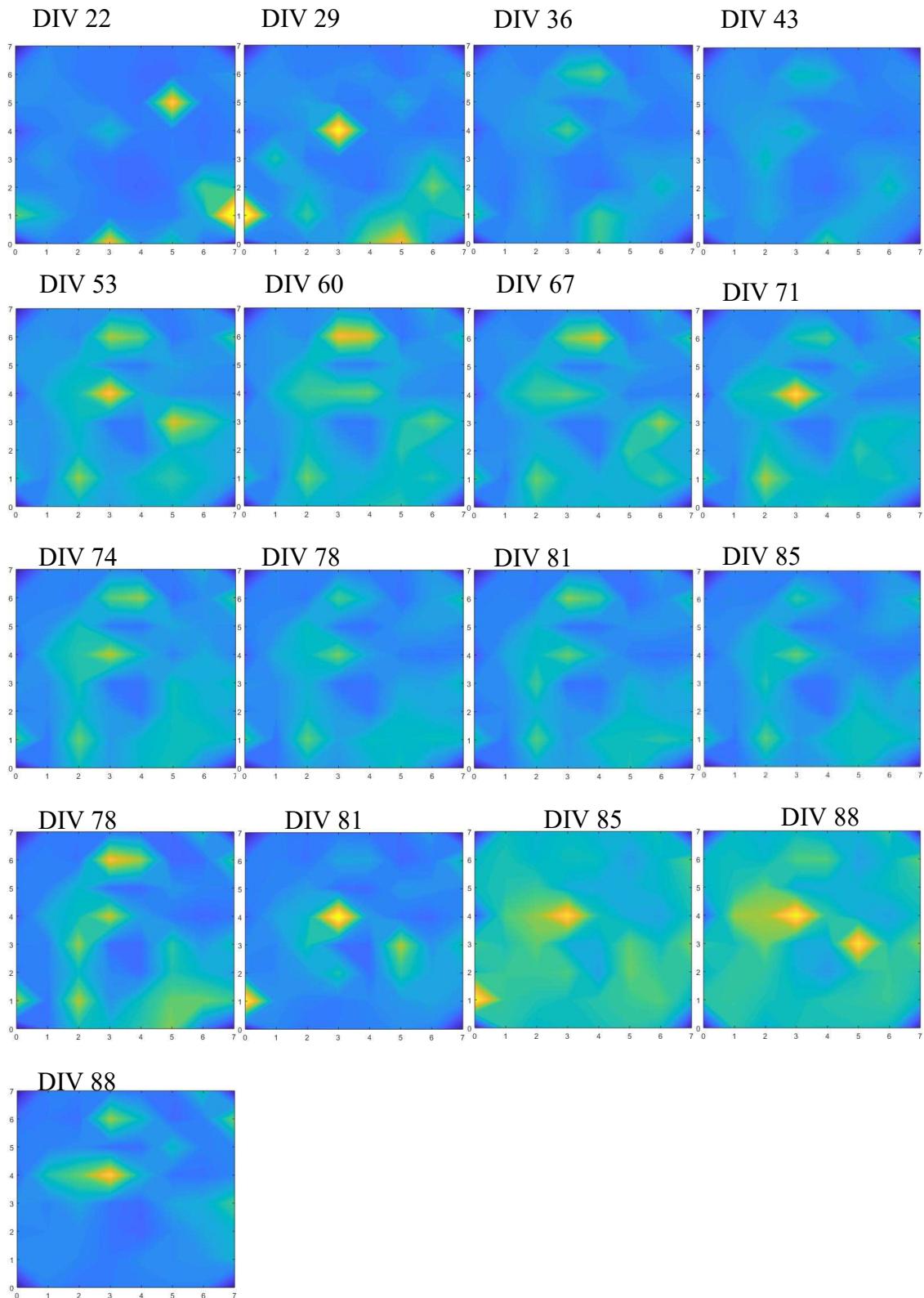


Figura 5.16 – Distribuição geométrica da média do parâmetro PSNG.

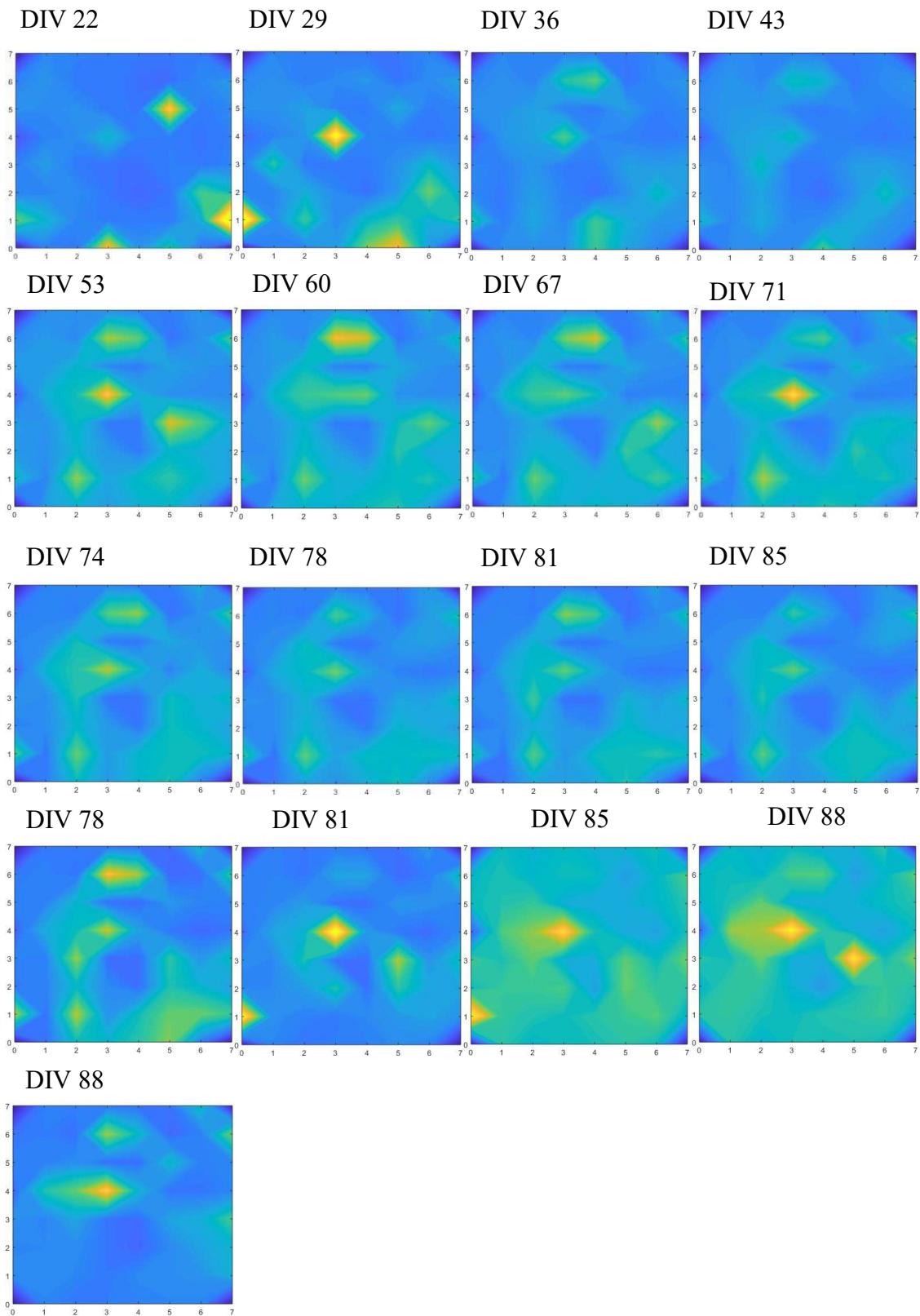


Figura 5.17 – Distribuição geométrica da média do parâmetro PSNE.

Os resultados expostos na Tab. 5.6 demonstram que há relativa semelhança entre o comportamento dos descritores PSNE e PSNG tanto em relação aos seus níveis máximos e mínimos, quanto em relação à tendência de caracterização das três fases do crescimento da cultura celular neuronal. Em relação ao PSNG, observa-se níveis máximos de 36% (DIV 25 do experimento 371) e mínimo de 7% (DIV 8 do experimento 361). Já os resultados de PSNE apresentaram mínimo de 12% (DIV 8 do experimento 361) e máximo de 37% (DIV 25 do experimento 371). No entanto, vale ponderar que a comparação entre estas características entre experimentos diferentes, por mais que originários de uma mesma metodologia de cultivo, não deve ser feita de maneira excludente à variabilidade natural e biológica dos experimentos. Isto se reforça à medida que os resultados são diretamente dependentes ao número de neurônios vivos na cultura e ainda a interconectividade da rede neural formada.

Análises estatísticas dos resultados médios de PSNE e PSNG

A fim de atestar a aderência ou a independência dos resultados à normalidade, foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov. Os resultados para os indicadores PSNE e PSNG são apresentados na Tab. 5.7 para as diferentes fases do crescimento celular. Como estes descritores apresentaram aderência à hipótese de normalidade, o teste ANOVA de único critério pode ser aplicado a estas variáveis.

Além do teste de normalidade, foi executada a análise de conglomerados entre os resultados de PSNG e PSNE de todos os canais das DIV registradas no experimento 364.

Tabela 5.6 – PSNE e PSNG médio de todos os dias *in vitro* de todos os experimentos de atividade neural espontânea analisados.

Tabela 5.7 – Teste Kolmogorov-Smirnov aplicado à média de PSNE e PSNG das DIV dos experimentos analisados.

SINAL BRUTO		PSNG	PSNE
Início de Desenvolvimento	Desvio Máximo	0,2153	0,2045
	Valor Crítico (0,05)	0,265	
	Resultado	Normal	Normal
Maturidade Celular	Desvio Máximo	0,1689	0,1141
	Valor Crítico (0,05)	0,1839	
	Resultado	Normal	Normal
Morte Celular	Desvio Máximo	0,1673	0,2337
	Valor Crítico (0,05)	0,256	
	Resultado	Normal	Normal

Analizando os resultados da análise de conglomerados para os resultados médios de PSNE, Fig. 5.18, observa-se similitude entre as DIV 15 e DIV 18 e proximidade com a DIV 11. Similitude entre as DIV 60, DIV 71 e DIV 64 e proximidade com a DIV 50 e DIV 74. Similitude entre as DIV 85 e DIV 88 e proximidade com as DIV 81 e DIV 78. Similitude entre as DIV 25 e DIV 26 e proximidade com a DIV 22. Similitude entre a DIV 43 e DIV 46 e proximidade com a DIV 53. E por fim, similitude entre as DIV 29 e DIV 67 com proximidade da DIV 32. A DIV 08 está separada das demais. Resultados muito próximos podem ser observados no gráfico da análise de conglomerados para os resultados médios de PSNG, Fig 5.19.

Estes resultados de análise de conglomerados apresentados da Figura 5.18 e 5.19 corroboram com a literatura no item 2.2, assim como com a divisão das fases de crescimento celular definidas no item 5.3. Desta forma, a Tabela 5.8 sintetiza os resultados de PSNG e PSNE nas estatísticas descritivas básicas: média, mediana, desvio, coeficiente de variação, coeficiente de assimetria e curtose. Os dados foram analisados sob o prisma das fases de crescimento celular apresentadas no item 5.3.

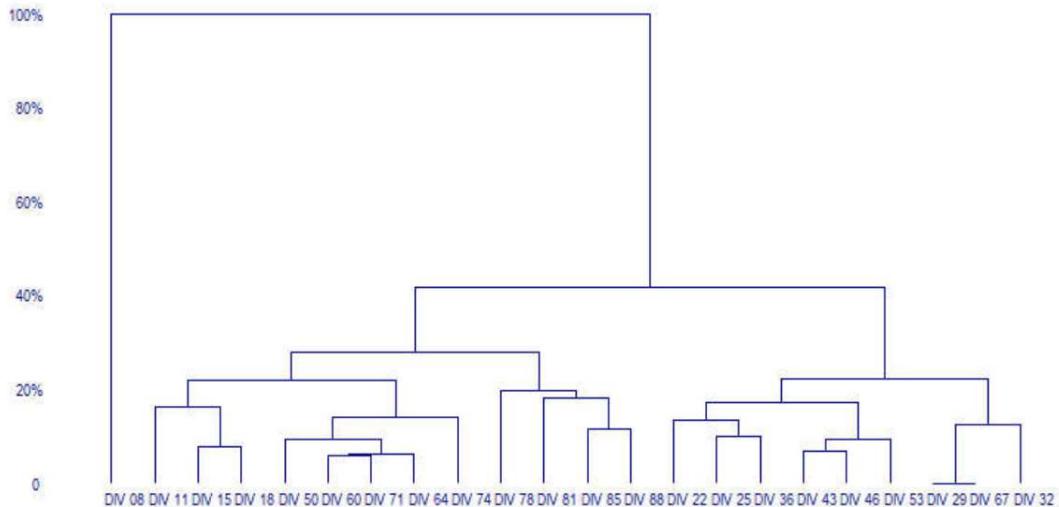


Figura 5.18 – Resultado da análise de conglomerados para os resultados médios de PSNE

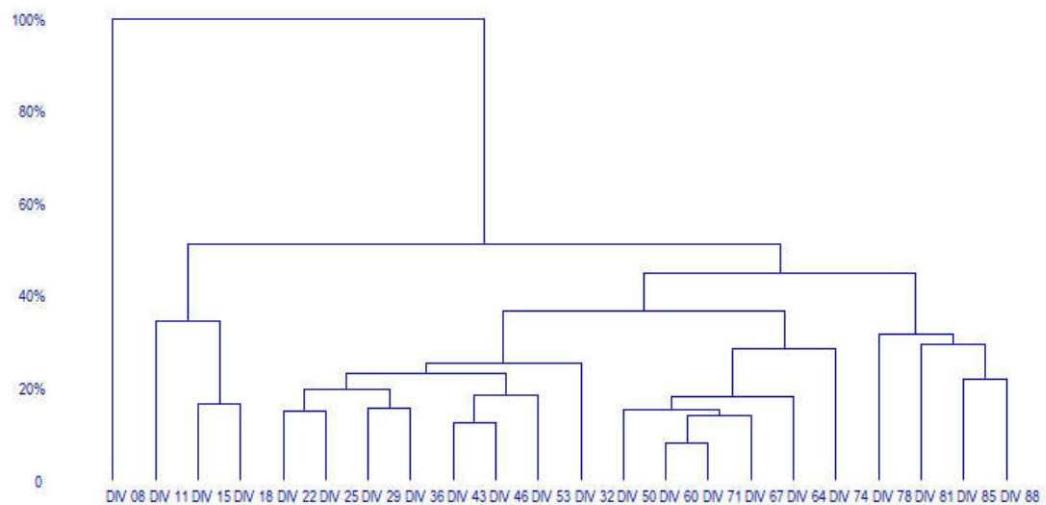


Figura 5.19 – Resultado da análise de conglomerados para os resultados médios de PSNG

Através da Tabela 5.8 podemos afirmar que as características PSNG e PSNE formam dados homogêneos, com coeficiente de variação CV inferior a 20% em ambos os descritores para todas as etapas da cultura. Isto permite a representação destas características através da média. A curtose e coeficiente de assimetria permitem uma análise preliminar dos dados e fornecem parâmetros da distribuição de densidade e probabilidade. Para todas as fases o coeficiente de assimetria indicou baixa assimetria positiva ou negativa, portanto se utilizou do desvio padrão convencional para

caracterizar a dispersão dos dados. A curtose por sua vez também indicou tendência a proximidade da distribuição normal dos dados, o que foi validado pela Tabela 5.8 através do Teste Kolmogorov-Smirnov.

Tabela 5.8 – Descritores da estrutura de densidade de probabilidade PSNG e PSNE aplicados ao sinal bruto (contendo ruído e atividade espontânea) captado pelos experimentos com MEA

SINAL BRUTO		PSNG %	DESVIO PSNG	PSNE %	DESVIO PSNE
Início do Desenvolvimento	Média	14,8485	5,6010	23,2585	3,2515
	Mediana	14,8600	4,7500	24,1500	3,4250
	Desvio	2,5665	2,6720	3,2938	1,2505
	CV	17,2846	47,7058	14,1616	38,4590
	Assimetria	-1,1931	0,4060	-2,2629	-0,0891
	Curtose	4,9962	-0,8843	6,9182	-0,7317
Maturidade Celular	Média	19,2125	6,9002	26,9181	4,5235
	Mediana	18,9100	5,3200	27,5450	3,9400
	Desvio	2,3822	1,0652	3,1486	1,4808
	CV	12,3991	15,4378	11,6970	32,7369
	Assimetria	1,1744	1,5199	-0,7743	0,9864
	Curtose	3,4802	1,7464	3,6079	0,9385
Morte Celular	Média	16,0324	5,4895	23,8957	4,6481
	Mediana	15,5700	5,4200	22,2700	4,0300
	Desvio	2,3822	1,0652	3,1486	1,4808
	CV	14,8586	19,4050	13,1764	31,8591
	Assimetria	0,8082	0,7946	0,4867	0,9428
	Curtose	-0,0758	2,0339	-1,3384	-0,4454

A Figura 5.20 reflete a média dos valores de PSNE e PSNG encontrados para os experimentos avaliados, calculados através da Tabela 5.6 e representados também na Tabela 5.8. É possível notar o padrão comportamental destas variáveis ao longo do crescimento celular. No início do desenvolvimento há em média de 12% a 16% dos segmentos não gaussianos ($14,84 \pm 2,56$) e de 19% a 25% dos segmentos não estacionários ($23,25 \pm 3,25$), o que sugere menor atividade elétrica espontânea e um sinal composto em sua maioria de ruído biológico e ruído de instrumentação (este último

completamente gaussiano e estacionário). Na maturidade da rede neural já se observa um maior número de segmentos não gaussianos, em torno de 17% a 22% ($19,21 \pm 6,9$), e de 25% a 28% ($26,91 \pm 4,52$) de segmentos não estacionários. Isto reflete a completa maturação das conexões excitatórias desta fase do crescimento celular em que o padrão de conectividade sináptica atingiu a estabilização com elevado número de *spikes* e *bursts*.

Por sua vez, a morte celular apresentou PSNG em torno de 12% a 16% ($16,03 \pm 5,49$), superior ao PSNG da fase inicial, porém inferior ao PSNG da fase de maturidade celular. A mesma análise se reflete na análise do descritor PSNE em que na morte celular apresentou um resultado de 20% a 26% ($23,89 \pm 4,65$). A partir da Figura 5.20 é possível observar a tendência do aumento de segmentos gaussianos e estacionários à medida que a cultura de células envelhece, ou seja, a medida em que os agrupamentos de células neuronais morrem. Vale ressaltar que a diferenciação entre as médias das fases de maturação celular foi quantificada através da ANOVA e apresentada Tabela 5.9. Por fim, é possível correlacionar este comportamento com os resultados de análise clássica, onde há a mesma flutuação das variáveis em torno do conceito das fases de crescimento celular.

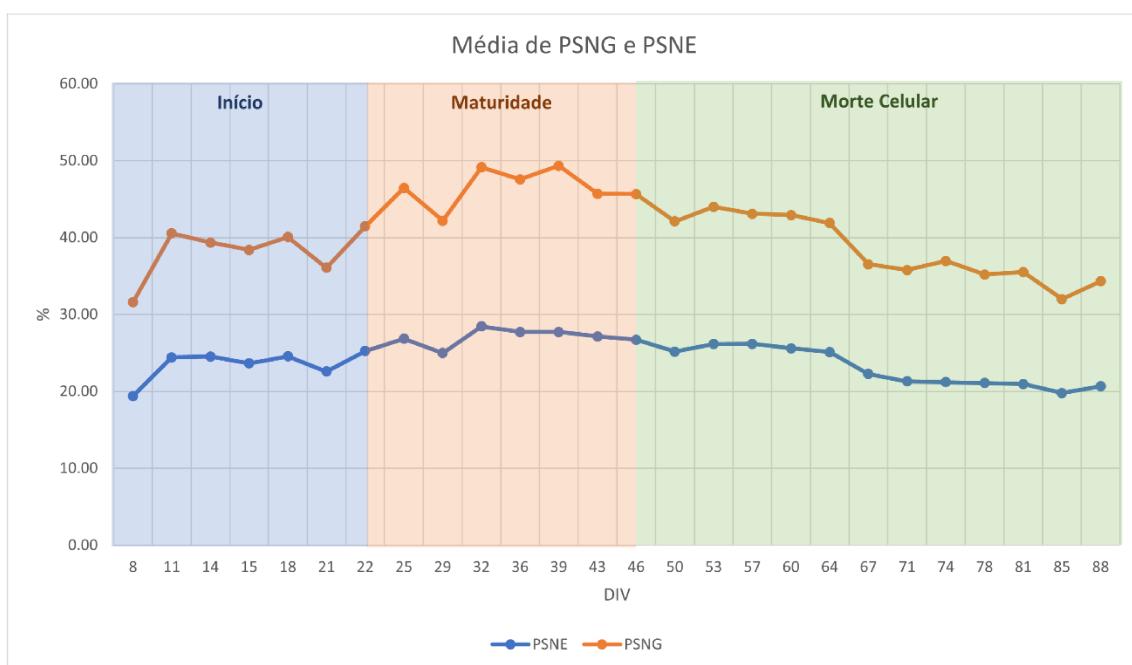


Figura 5.20 – Resultados médios de PSNG e PSNE para os DIV registrados dos experimentos MEA considerados neste trabalho. Nesta figura foram identificadas as fases de crescimento celular.

Através da Tabela 5.8 é possível denotar que tanto PSNG quanto PSNE possuem valor F significativo e foram habilitados para aplicação do teste Tukey. Este último revelou que podemos rejeitar a hipótese nula e assumir que a característica PSNG e PSNE são alteradas ao longo das fases do crescimento celular, havendo diferença entre as médias do grupo de início do desenvolvimento em relação à maturidade e ainda entre a etapa de maturidade e morte celular, porém, não há diferença entre a fase de início e a fase de morte celular. Estes resultados são reforçados através das Figuras 5.21 e 5.22 que apresentam os Boxplots destes descritores em questão.

Tabela 5.9 - Resultados da aplicação da ANOVA de único critério com teste F-teste e Tukey para análise das diferenças entre as médias amostrais considerando PSNG e PSNE.

	F-teste		Início e Maturidade		Início e Morte		Maturidade e Morte	
	F	p value	≠	p value	≠	p value	≠	p value
PSNG	10,23	0,0003	4,36	< 0,01	1,18	ns	3,18	< 0,01
PSNE	9,73	0,0003	3,66	< 0,01	0,64	ns	3,02	< 0,01

Ambos os *Box plots* das Figuras 5.21 e 5.22 se destacam ao ressaltar a diferenciação da fase de maturidade celular em relação às fases de início e morte celular. É possível observar que tanto para o PSNE, quanto para o PSNG, a mediana destes descritores foi em média 5% superior. Destaca-se ainda a fase de morte celular no que se refere ao descritor PSNE no terceiro quartil. Este quartil elevado com máximo em 30% traduz o comportamento desorganizado desta fase celular com picos de não estacionariedade em regiões concentradas da placa de MEA.

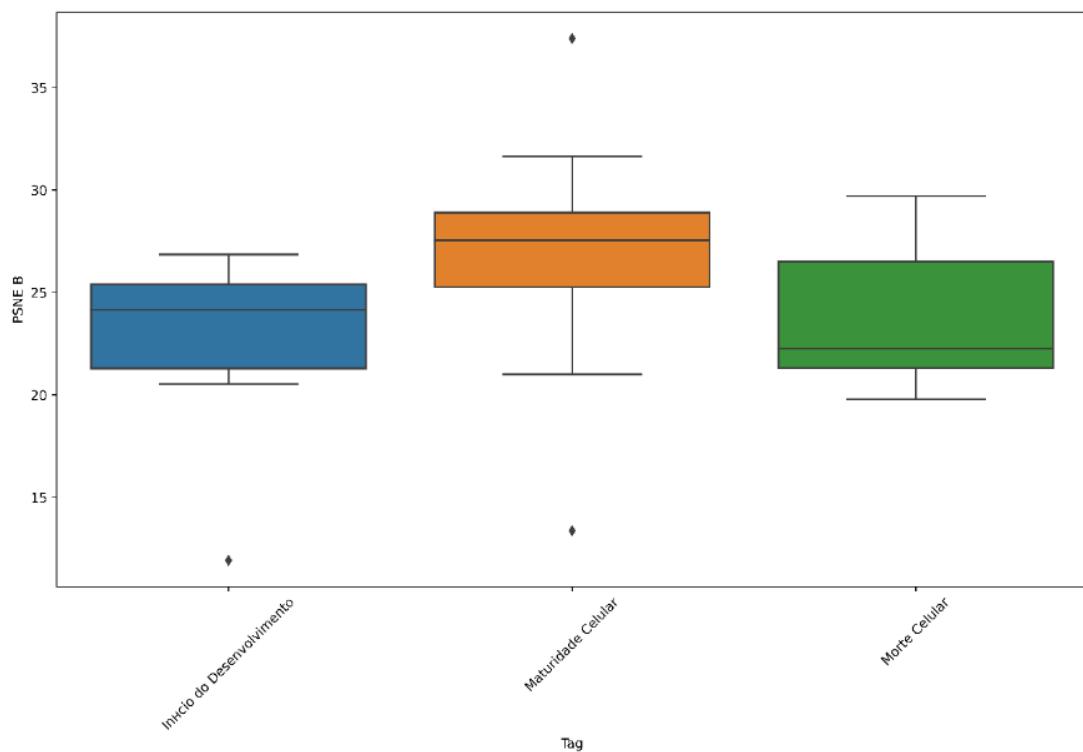


Figura 5.21 – Box Plot da variável PSNE para as três fases do crescimento celular *in vitro*. PSNE B refere-se ao PSNE para o sinal bruto.

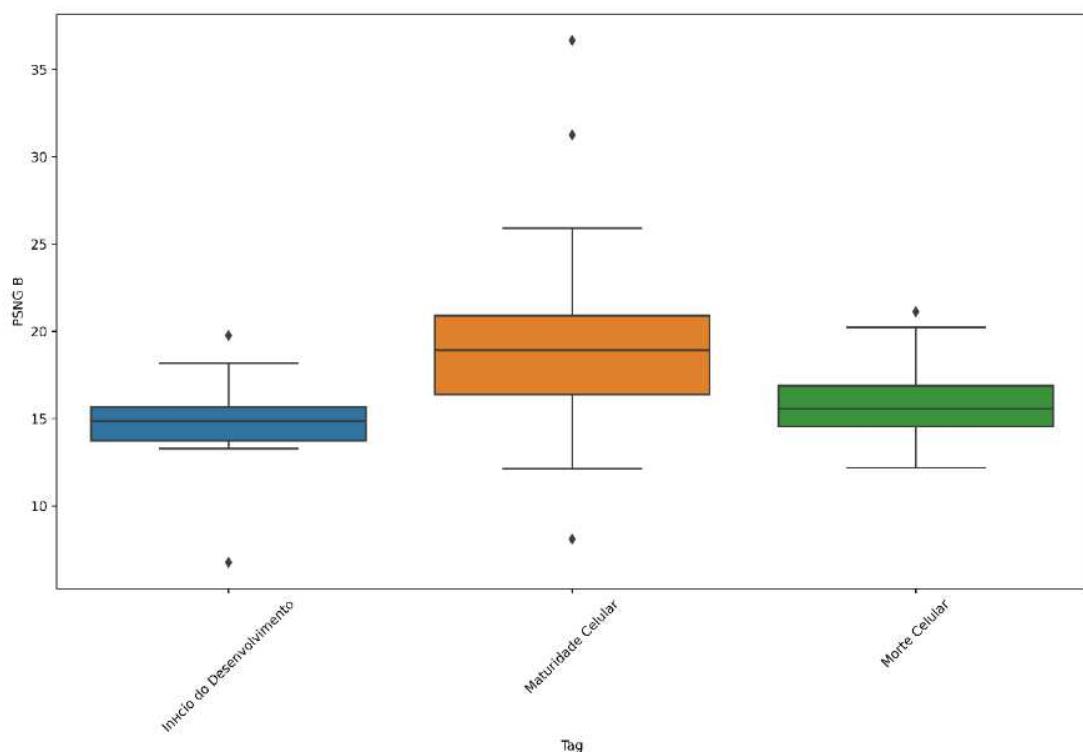


Figura 5.22 – Box Plot da variável PSNG para as três fases do crescimento celular *in vitro*. PSNE B refere-se ao PSNE para o sinal bruto.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS E DISCUSSÕES DOS DESCRIPTORES DA ESTRUTURA DE DENSIDADE DE PROBABILIDADE APLICADOS AO RUÍDO BIOLÓGICO

Análises estatísticas dos resultados médios de PSNE e PSNG no sinal de ruído biológico sob espectro geométrico da cultura de células

As Figuras 6.1 e 6.2 apresentam os resultados médios obtidos de PSNE para cada canal da matriz de microeletrodos, dispostos de maneira a representar sua posição geométrica na matriz. Os resultados são apresentados em duas linhas, a superior (Fig. 6.1.A e Fig. 6.2.A) apresenta os descritores resultantes do processamento do sinal de ruído da MEA (ruído de instrumentação e ruído biológico); e a linha inferior (Fig. 6.1.B e Fig. 6.2.B) apresenta o resultado do processamento do sinal bruto da MEA. A mesma apresentação é feita nas figuras 6.3 e 6.4 em relação aos resultados médios de PSNG.

Em relação ao PSNE (Fig. 6.1 e Fig. 6.2) observa-se que as DIV's correspondentes do sinal MEA apresentam maior porcentagem de segmentos não estacionários do que o sinal de ruído. Porém, vale ressaltar que o sinal de ruído da MEA também apresenta PSNE em níveis semelhantes ou um pouco menores nas mesmas localizações geográficas do sinal MEA bruto. Em algumas poucas regiões, como no comparativo das DIV 64 dos dois tipos de sinal, no sinal MEA bruto há PSNE na faixa de 25% a 30%

enquanto no sinal de ruído o PSNE se encontra na faixa de 5% a 10%. Esta mesma observação acontece nas DIV 08, 11 e DIV 50. Conclui-se que, para o PSNE, em linhas gerais, independente do estágio de maturação da cultura, o sinal de ruído apresenta menor PSNE em comparação com o sinal bruto. Esta atenuação do PSNE no sinal de ruído respeita a localização geográfica da fonte de atividade elétrica sob a placa MEA.

Sob a ótica do PSNG, (Fig. 6.3 e Fig. 6.4) as observações são opostas, as porcentagens de segmentos não gaussianos são maiores no sinal de ruído do que no sinal bruto da MEA. Isto é mais evidente nos períodos iniciais de desenvolvimento da cultura celular, em que as DIV 08 e DIV 11 para o sinal de ruído, apresentam pontos de PSNG entre 30% e 40%, enquanto, no sinal bruto da MEA o PSNG não chega a 20%. Nas DIV 18 a DIV 32, período de maturidade da rede neural, o sinal de ruído continua apresentando maior PSNG, porém de maneira mais similar aos níveis de PSNG do sinal bruto de MEA. Ao final do tempo de vida da cultura, DIV 50 a DIV 64, o comportamento dos resultados é similar ao período inicial do crescimento da cultura, em que o sinal de ruído apresenta níveis elevados de PSNG em regiões em que o sinal bruto apresenta um sinal mais gaussiano. Esta última consideração pode ser bem destacada pela DIV 64 nas posições (2,3) da placa MEA.

Conclui-se que, para o PSNG, em linhas gerais, dependente do estágio de maturação da cultura, o sinal de ruído apresenta maior PSNG (estágio inicial e final) em comparação com o sinal bruto. Esta acentuação do PSNG no sinal de ruído não respeita a localização geográfica da fonte de atividade elétrica sob a placa MEA nos dois estágios referidos, apesar de na fase de maturidade haver certa correlação direta. Esta observação é interessante e exige maior investigação, pois, sabendo-se que o sinal de ruído é composto por ruído de instrumentação (gaussiano) e ruído biológico (não gaussiano e não estacionário), pode-se hipotetizar que há informações neurais importantes no sinal de ruído da MEA, não somente nas características consolidadas advindas da análise clássica de *spikes* e *bursts*.

Corroborando com as Figuras 6.1 e 6.2 a Tabela 6.1 exibe os resultados dos descritores de densidade de probabilidade utilizados para caracterizar os sinais de ruído biológico da MEA. Nesta tabela os resultados são apresentados pela estatística descritiva básica executada neste trabalho para cada fase do crescimento celular, início, maturidade e morte celular.

Análises estatísticas dos resultados médios de PSNE e PSNG no sinal de ruído biológico

Os resultados apresentados na Tabela 6.1 permitem dizer que as características PSNG e PSNE para o sinal de ruído biológico formam dados homogêneos, com coeficiente de variação CV é próximo a 30% em ambos os descritores para praticamente todas as etapas da cultura. Isto permite a representação destas características através da média. A curtose e coeficiente de assimetria permitem uma análise preliminar dos dados e fornecem parâmetros da distribuição de densidade e probabilidade. Para todas as fases o coeficiente de assimetria indicou baixa assimetria positiva ou negativa, portanto se utilizou do desvio padrão convencional para caracterizar a dispersão dos dados. A curtose por sua vez também indicou tendência a proximidade da distribuição normal dos dados.

A Figura 6.5 reflete a média dos valores de PSNE encontrados na avaliação do sinal de ruído biológico por meio do Box Plot desta variável, assim como a Figura 6.6 apresenta o Box Plot da variável PSNG. No início do desenvolvimento há em média de 17% dos segmentos não estacionários ($16,79 \pm 8,05$) e de 31% dos segmentos não estacionários ($31,51 \pm 12,59$). Nesta fase é possível observar um sinal ligeiramente menos gaussiano do que o sinal bruto. No entanto, no que se refere a não estacionariedade, o sinal de ruído biológico apresentou aproximadamente 8% a mais de trechos não estacionários. Esta diferença significativa também é observada na fase de morte celular.

A fase de morte celular apresentou PSNG em torno de 18% ($18,20 \pm 7,53$), um pouco superior ao PSNG da fase inicial. Na análise do descritor PSNE para morte celular no sinal de ruído biológico encontrou-se média de 30% ($30,05 \pm 12,19$). PSNE próximo a fase inicial do desenvolvimento celular e bastante superior ao valor encontrado para este mesmo descritor aplicado ao sinal bruto, onde PSNE teve média de 24%. Desta maneira, na fase inicial e final do crescimento celular observamos um aumento significativo da média de segmentos não estacionários, superior até mesmo à fase de maturidade celular. Nesta fase da rede neural já se observa um maior número de segmentos não gaussianos, em torno de 21% ($21,27 \pm 8,14$), no entanto, em relação ao PSNE, os resultados médios apresentaram 29% ($28,80 \pm 8,49$) de segmentos não estacionários.

Tabela 6.1 – Descritores da estrutura de densidade de probabilidade PSNG e PSNE aplicados ao sinal de ruído biológico (retirando-se os *spikes* e *bursts*) captado pelos experimentos com MEA

SINAL RUÍDO		PSNG %	DESVIO PSNG	PSNE %	DESVIO PSNE
Início do Desenvolvimento	Média	16,7925	8,0550	31,5150	12,5910
	Mediana	16,1600	8,1900	30,2200	13,8200
	Desvio	5,7938	3,6888	10,5823	6,3569
	CV	34,5023	45,7949	33,5786	50,4879
	Assimetria	0,8765	0,3833	3,5068	0,1269
	Curtose	2,5807	-0,4540	14,1697	-0,2765
Maturidade Celular	Média	21,2659	8,1391	28,8077	8,4905
	Mediana	20,3800	6,8550	29,3700	8,5250
	Desvio	5,5326	2,2801	3,4722	4,8092
	CV	26,0164	28,0137	12,0530	56,6425
	Assimetria	1,1285	1,4107	-2,4724	0,0930
	Curtose	2,4695	3,2410	8,5298	-1,2175
Morte Celular	Média	18,2014	7,5343	30,0467	12,1890
	Mediana	16,3400	7,3600	28,9500	13,5800
	Desvio	5,5326	2,2801	3,4722	4,8092
	CV	30,3967	30,2625	11,5560	39,4551
	Assimetria	2,7916	1,8469	0,9901	-0,3843
	Curtose	9,6254	4,9218	0,4673	-0,9730

Este aumento dos segmentos não estacionários para o ruído biológico aconteceu nas fases de início de desenvolvimento e morte celular. Estas fases são biologicamente próximas no sentido do comportamento elétrico. A primeira, com tipos imaturos de sinapse e baixa densidade sináptica e a última com progressiva deterioração da rede neural e menor atividade espontânea. Importante destacar que, a diferenciação do sinal de ruído biológico para com o sinal de MEA bruto se dá unicamente pela retirada dos *spikes* e *bursts* do sinal. A comparação dos resultados de PSNE e PSNG para estes dois sinais para as fases do crescimento celular são representados na Figura 6.5.

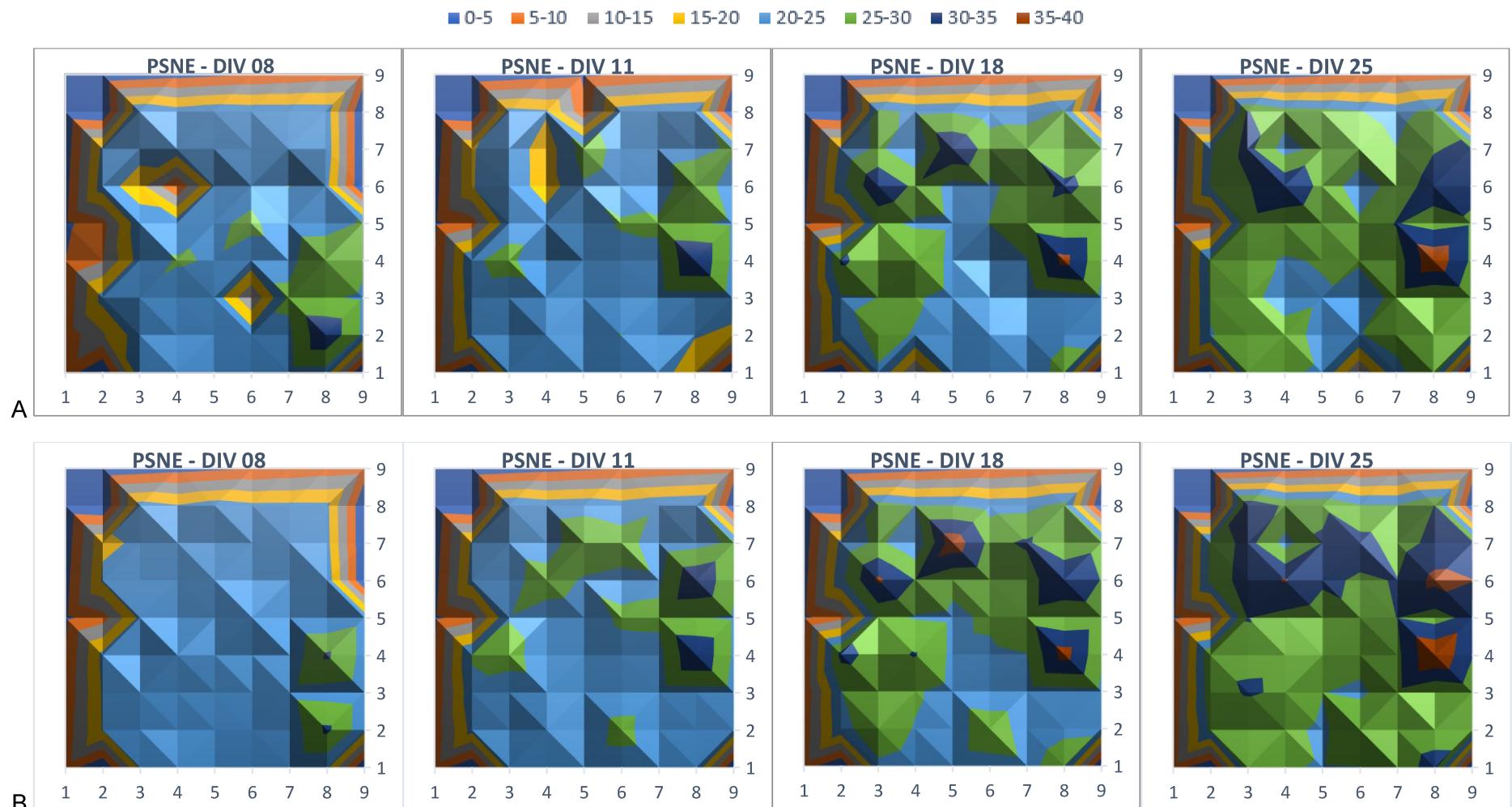


Figura 6.1 – Comparativo espaço-temporal da média de PSNE do dia *in vitro* 8 ao 25 para: A. sinal de ruído instrumentação mais ruído biológico; B. Sinal bruto MEA (com atividade neuronal espontânea – *spikes* e *bursts*)

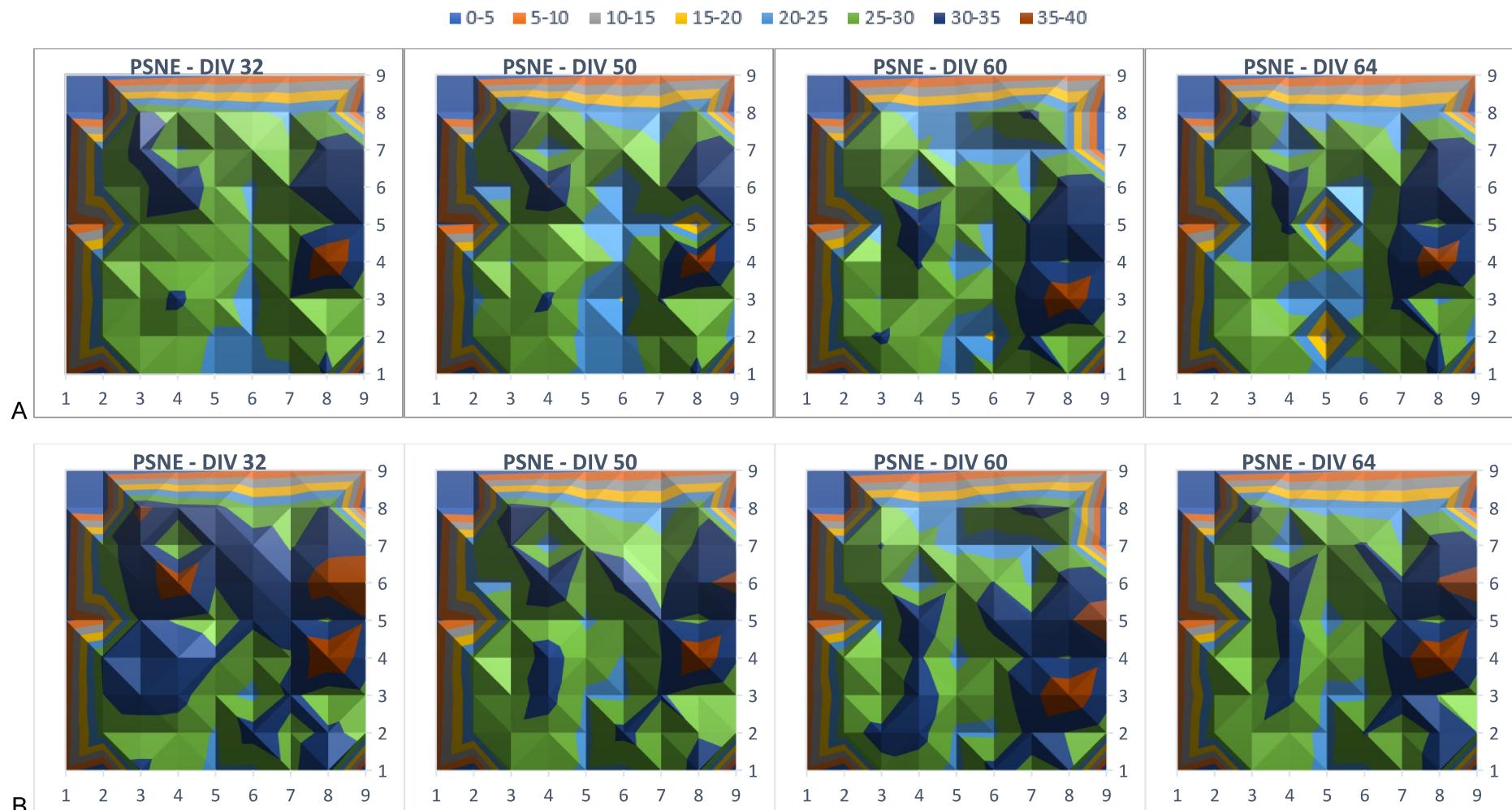


Figura 6.2 – Comparativo espaço-temporal da média de PSNE do dia *in vitro* 32 ao 64 para: A. sinal de ruído instrumentação mais ruído biológico; B. Sinal bruto MEA (com atividade neuronal espontânea – *spikes* e *bursts*)

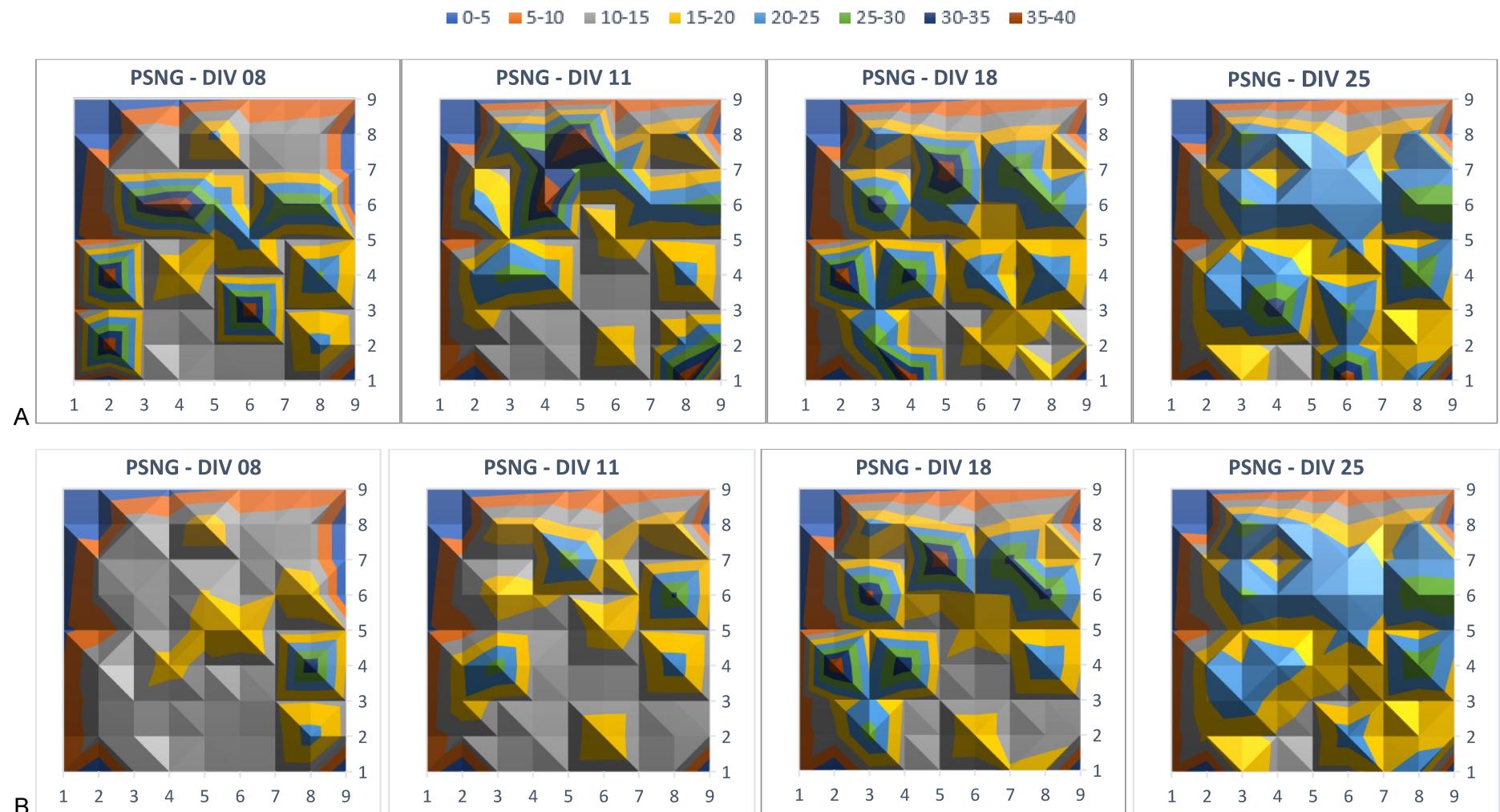


Figura 6.3 – Comparativo espaço-temporal da média de PSNG do dia *in vitro* 8 ao 25 para: A. sinal de ruído instrumentação mais ruído biológico; B. Sinal bruto MEA (com atividade neuronal espontânea – *spikes* e *bursts*)

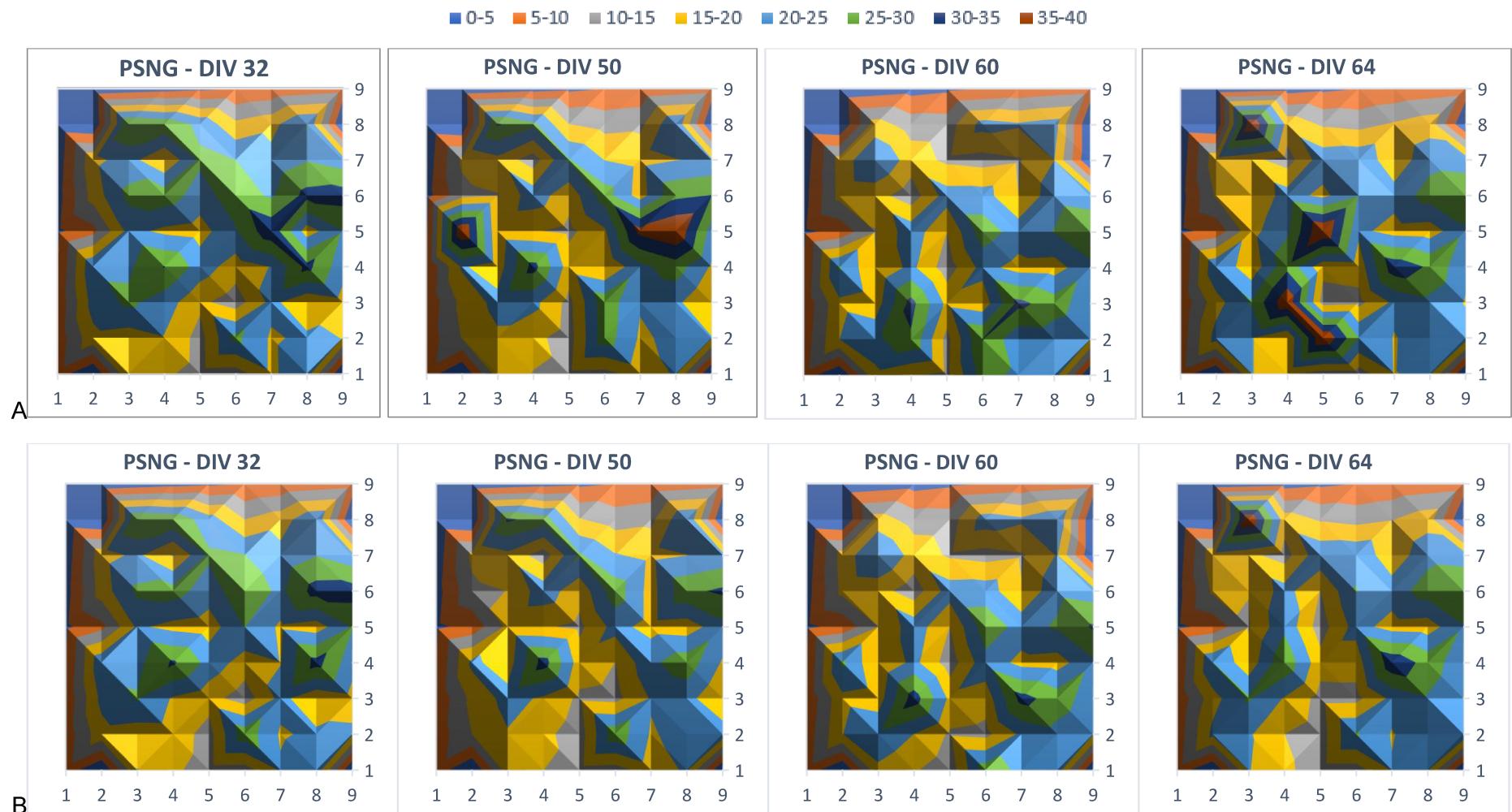


Figura 6.4 – Comparativo espaço-temporal da média de PSNG do dia *in vitro* 32 ao 64 para: A. sinal de ruído instrumentação mais ruído biológico; B. Sinal bruto MEA (com atividade neuronal espontânea – *spikes* e *bursts*)

Também foi aplicada ANOVA nestes descritores para o sinal de ruído. Os resultados são apresentados na Tabela 6.2. Estes resultados denotam dificuldade de diferenciação entre as fases de crescimento celular ao analisar o descritor PNSE, não sendo possível, estatisticamente, separar nenhuma das fases por meio apenas deste descritor. No entanto, assim como no sinal bruto, o PNSG foi capaz de diferenciar significativamente as fases de início e maturidade celular, mas não conseguiu diferenciar nenhuma outra fase. A partir desta tabela é possível assumir diferenciação de aproximadamente 4.5% de PSNG entre as fases de início e maturidade celular com significância estatística de $p < 0,05$.

Tabela 6.2 - Resultados da aplicação da ANOVA de único critério com teste F-teste e Tukey para análise das diferenças entre as médias amostrais considerando PSNG e PSNE no sinal de ruído biológico.

	F-teste		Início e Maturidade		Início e Morte		Maturidade e Morte	
	F	p value	≠	p value	≠	p value	≠	p value
PSNG	5,11	0,008	4,48	< 0,05	1,41	ns	3,06	ns
PSNE	1,12	0,33	*	*	*	*	*	*

As análises da Tabela 6.2 podem ser também retiradas através das Figuras 6.5 e 6.6 que representam, respectivamente, o box plot das variáveis PSNE e PSNG para o sinal de ruído biológico pelas fases do crescimento celular.

Na Figura 6.5 observa-se a proximidade da mediana, primeiro e terceiro quartil, assim como nos máximos e mínimos da variável PSNE para o sinal de ruído biológico nas fases avaliadas. Não indicando forte diferenciação entre as fases, como quantitativamente reforçado pela análise ANOVA da Tabela 6.2.

A Figura 6.6 remete a mesma análise da Figura 5.22, com relativa diferenciação da fase de maturidade celular das demais pelo descritor de PSNG, exceto pelo fato de uma maior extensão entre o primeiro e terceiro quartil, o que denota maior variabilidade dos resultados de não gaussianidade quando aplicado ao sinal de ruído biológico.

Vale destacar que apesar da não diferenciação importante entre as fases de crescimento celular tanto para o PSNE quanto para o PSNG no sinal de ruído a importância destes descritores da densidade de probabilidade deste sinal se deu

comparativamente ao sinal bruto da MEA, composto pelo ruído biológico, mas também, pela atividade elétrica espontânea da rede neural.

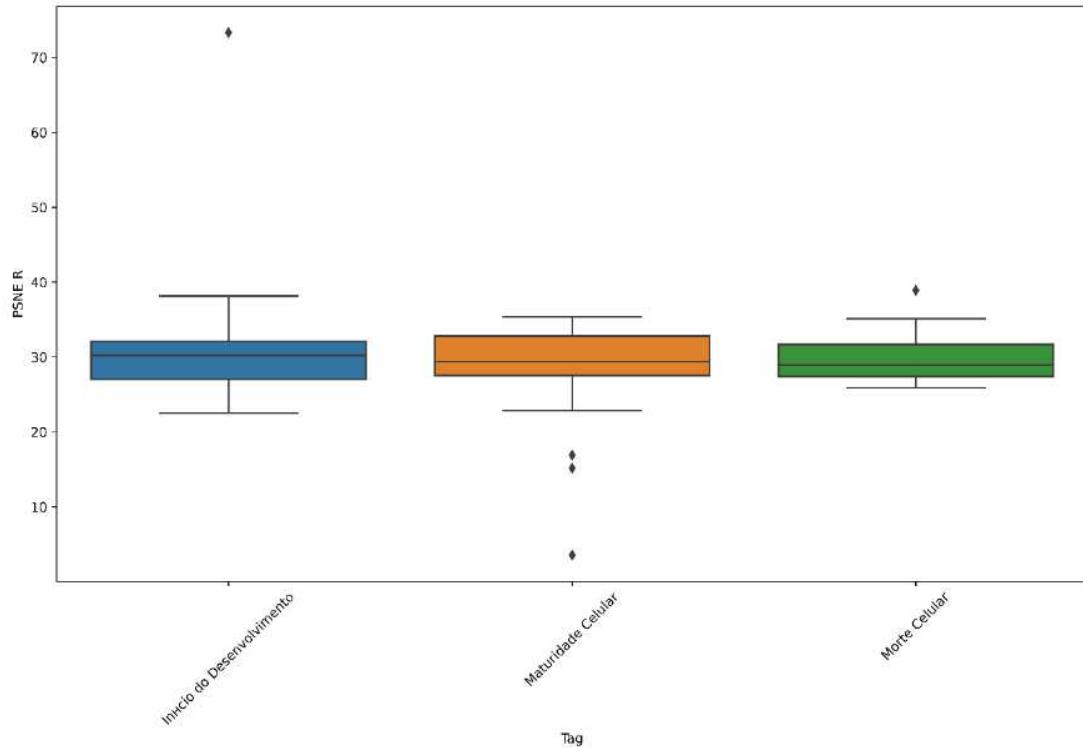


Figura 6.5 – Box Plot da variável PSNE para as três fases do crescimento celular *in vitro*. PSNE R refere-se ao PSNE para o sinal de ruído biológico.

Comparação dos resultados médios de PSNE e PSNG no sinal de ruído biológico e sinal bruto

Explorando a Figura 6.7 e os resultados apresentados até esta seção é possível observar que o comportamento do PSNG se apresenta relativamente bem próximo nos dois sinais, bruto e ruído biológico, para todas as fases do sinal. É notório que os resultados de PSNG foram superiores em aproximadamente 2%, porém com maior desvio padrão para o sinal de ruído. Considerando o efeito da retirada da atividade espontânea neste último é possível entender que este descritor não foi capaz de obter informações adicionais do sinal de ruído biológico das culturas. Porém, nos permite afirmar que o ruído biológico no crescimento de células neurais *in vitro* não se

assemelha a um sinal puramente gaussiano, ou ao ruído branco gaussiano formado por sinal aleatório, de densidade espectral constante em distribuição normal e média zero.

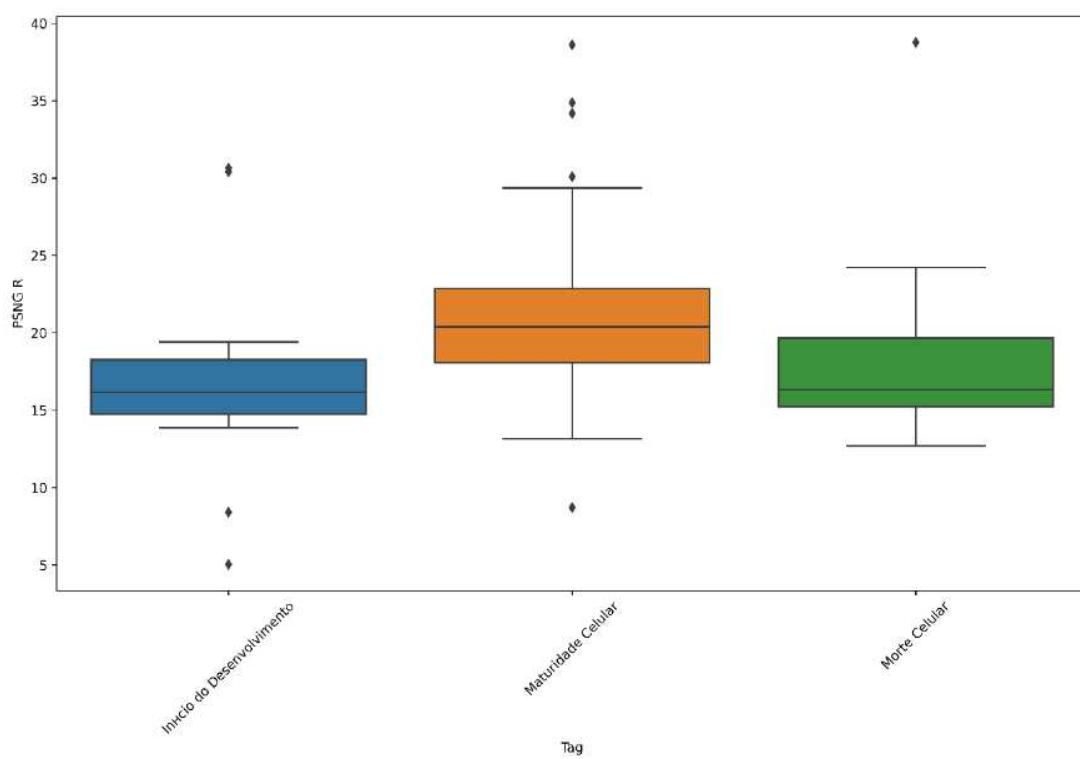


Figura 6.6 – Box Plot da variável PSNG para as três fases do crescimento celular *in vitro*. PSNG R refere-se ao PSNG para o sinal de ruído biológico.

No entanto, os resultados médios de PSNE ilustrados na Figura 6.7 trazem interpretações diferentes e permitem avaliações diferentes das encontradas em PSNG. Para o descritor dos segmentos não estacionários, as fases de início e fim do crescimento celular para o ruído biológico se diferenciaram do sinal bruto, onde para o ruído biológico se observaram mais segmentos não estacionários do que para o sinal bruto. Este resultado se destaca pois nestas fases há menos atividade elétrica espontânea, o que leva ao sinal bruto se apresentar como um sinal mais estacionário do que para a fase de maturidade celular.

O PSNE no sinal de ruído biológico apresentou resultado similar de não estacionariedade em relação ao sinal bruto na fase de maturidade, mesmo sendo esta fase a com mais atividade elétrica espontânea e, portanto, a com mais *spikes* e *bursts* retirados para constituição do sinal de ruído biológico. Isto reforça que esta fase contempla *spikes* aleatórios, porém rítmicos, sincronizados, e com padrão de *bursts*

estáveis característicos da maturidade das conexões sinápticas, o que não eleva a não estacionariedade do sinal como esperado para o sinal bruto.

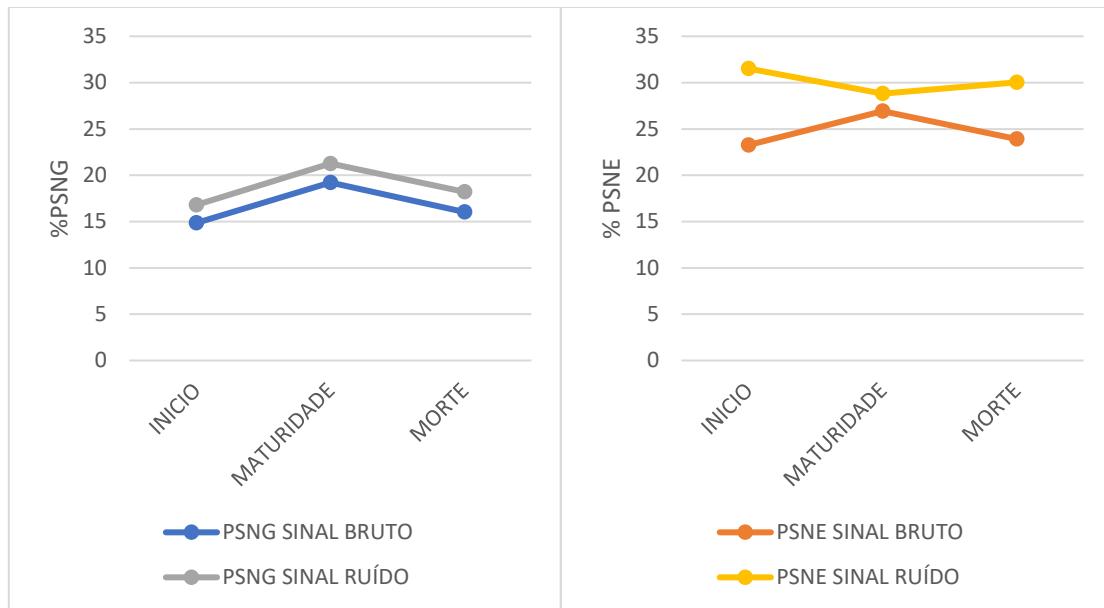


Figura 6.7 – Valores médios de PSNG e PSNE comparativamente entre o sinal de ruído biológico e o sinal bruto da MEA

É possível dizer através da Figura 6.7 que a retirada da atividade espontânea nas fases de crescimento celular e morte celular revelou a importância do ruído biológico na rede neural. Estas duas etapas são aquelas com maior número de eventos biológicos importantes, no início de desenvolvimento, ainda com poucos *spikes* e *bursts*, as conexões sinápticas imaturas estão se reforçando, os neurônios isolados se conectando a rede neural em busca de formar a plasticidade da rede com aumento da sinaptogênese química; já na fase de morte celular, vários são os estímulos que desencadeiam a morte celular por uma cascata de reações bioquímicas e moleculares que modificam estruturalmente a célula até o completo desaparecimento, encolhimento citoplasmático, condensação de cromatina (picose), fragmentação do núcleo (cariorrexe) e fragmentação da membrana plasmática.

A partir desta discussão, caracteriza-se que as fases de início de desenvolvimento e morte celular no sinal de ruído, por meio das características biológicas destas fases, são representados por sinais em que suas características estatísticas variam ao longo do tempo e carregam informações importantes não aleatórias no sentido estacionário ou gaussiano.

As Figuras 6.8, 6.9, 6.10 e 6.11 representam os histogramas de densidade de frequência do PSNE para o sinal bruto, PSNE para o sinal de ruído biológico, PSNG para o sinal bruto e PSNG para o sinal de ruído biológico respectivamente. Estas figuras descrevem todas essas variáveis no sentido amplo, pois a frequência relativa das classes representadas é uma estimativa da probabilidade de se obter um valor destes descritores dentro da classe.

Na Figura 6.8, representando o PSNE no sinal bruto, é possível notar que as fases de início e morte celular apresentam histogramas bem similares, com densidade de frequências próximas e centradas de 23 a 25% de segmento não estacionários. Também é possível notar a similaridade das caudas direita e esquerda nos limites das classes para estas duas fases. Já a fase de maturidade celular apresenta um deslocamento à direita, o que leva a concluir que esta fase apresenta maior número de segmentos não gaussianos, centrado em 27% e com limite de classes à direita de 37% a 38%. Tais resultados não se diferenciam dos já apresentados no Capítulo IV, porém, a análise comparativa desta Figura 6.9 com a Figura 6.10 traz outras discussões importantes.

A Figura 6.9 retrata os histogramas de densidade de frequência também para o PSNE, porém, agora sob o espectro do sinal de ruído biológico. É possível observar que a função de densidade de probabilidade de todas as fases do experimento foi alterada retirando-se a atividade elétrica espontânea do sinal bruto da MEA. A fase que menos sofreu alteração em sua conformação morfológica do histograma foi a fase de maturidade celular. Nesta fase houve uma diminuição da densidade em sua classe central e um deslocamento da curva à esquerda, levando o ponto central a aproximadamente 29%, com classes até 60% de segmentos não estacionários.

No entanto, as fases iniciais e finais são aqueles de maior diferença entre o sinal bruto e o sinal de ruído. Diferentemente do apresentado na Figura 6.8, na Figura 6.9 é possível observar que os histogramas de densidade de frequência destas duas fases apresentam alta diferenciação morfológica. Na fase de morte celular, característica por desorganização biológica e explosão bioquímica, há certa organização deste descritor, concentrado com alta densidade em 30% de PSNE com esparramamento relativo menor das caudas com classes de 20% a 40%. Já a fase de início de desenvolvimento para o sinal de ruído perde sua característica concentradora em 23% de PSNE e apresenta uma curva de densidade de probabilidade mais achatada, apresentando densidade de classe central quase 70% menor que na Figura 6.9, com caudas 25% a 60% de PSNE, centrado em 30% de PSNE.

Portanto, conforme apresentado no Box Plot da Figura 6.5, o valor central do PSNE para o sinal de ruído biológico nas três fases do experimento apresentou-se próximo a 30%, sem diferenciação entre as fases. Porém, a Figura 6.9 denota que ao se avaliar os histogramas de densidade de frequências há sim forte diferenciação entre as fases no quesito densidade das classes e esparramamento horizontal.

A análise das Figuras 6.10 e 6.11 permitem algumas discussões diferentes das encontradas nas Figuras 6.8 e 6.9. Assim como na Figura 6.8, ao analisar a Figura 6.10 que trata do histograma de densidade de frequência do PSNG para o sinal bruto da MEA, é possível observar proximidade das curvas do início do crescimento celular e morte celular em relação a densidade das classes predominantes, em torno de 15% para o início e 16% para a morte celular. Também se destaca a curva para a fase de maturidade, mais achatada, com maior esparramamento, ponto central de 18 a 21% e classes importantes em 30% de segmentos não gaussianos. Esta análise também se confirma pelos resultados apresentados e discutidos no Capítulo IV.

Porém, ao se analisar comparativamente as Figuras 6.10 e 6.11, esta última que representa os histogramas de densidade de frequência para as fases do sinal de ruído, é possível observar que diferentemente do que se destacou na Figura 6.9, há uma aproximação das curvas de densidade de probabilidade no que se refere à densidade das classes, achatamento e esparramamento, mas com alguma diferenciação do seu ponto central.

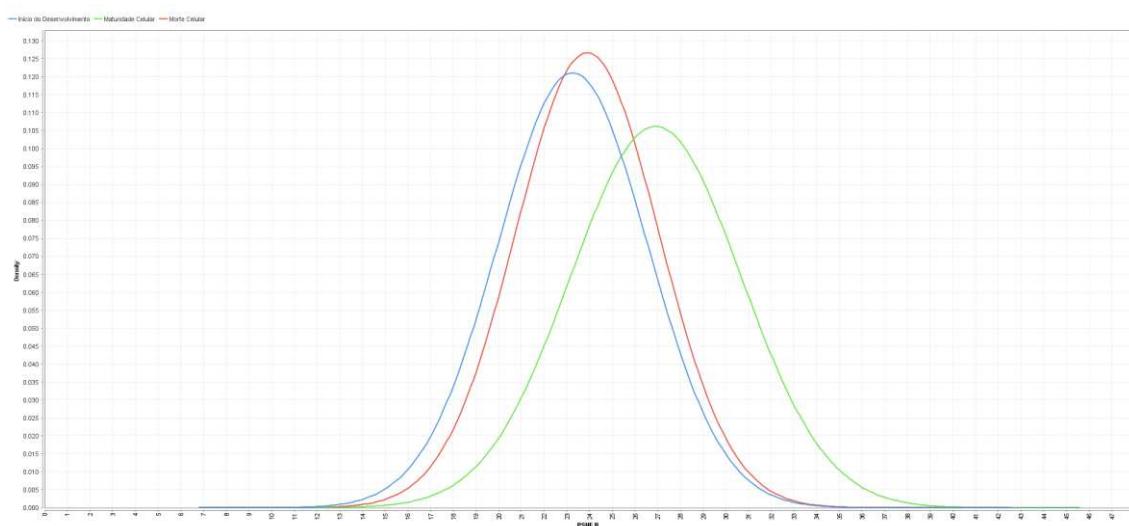


Figura 6.8 – Histograma de densidade de frequência para a variável PSNE para o sinal bruto da MEA. A curva azul refere-se à fase de início do desenvolvimento; a curva verde representa a maturidade celular; e a curva vermelha, a fase de morte celular.

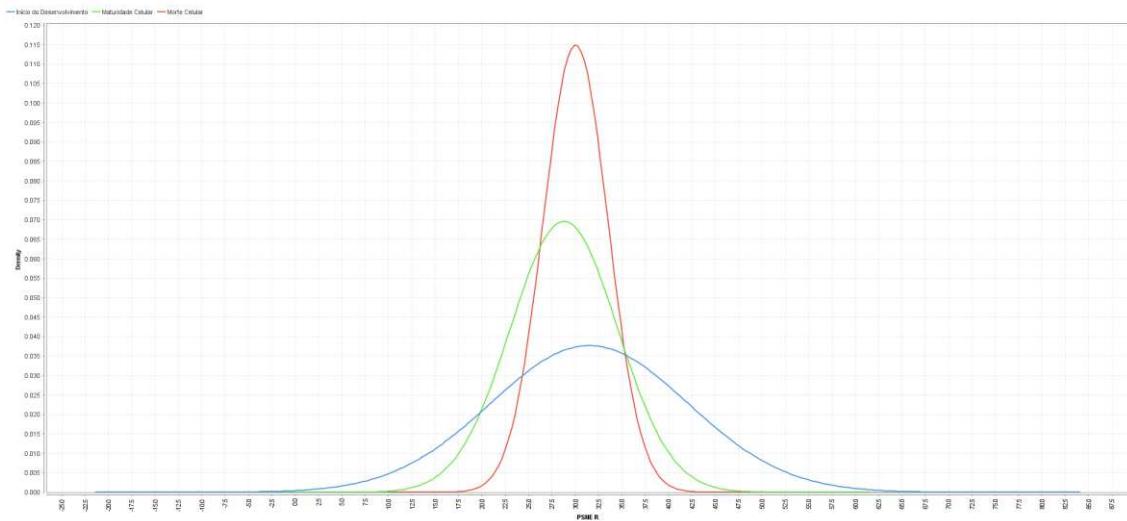


Figura 6.9 – Histograma de densidade de frequência para a variável PSNE para o sinal de ruído biológico da MEA. A curva azul refere-se à fase de início do desenvolvimento; a curva verde representa a maturidade celular; e a curva vermelha, a fase de morte celular.

Na Figura 6.11 os histogramas de densidade de frequência das três fases de crescimento celular avaliadas no ruído biológico possuem morfologia similar, com classe central no início do desenvolvimento em 16,5%, 18,5% na fase de morte celular e 21,5% de segmentos não gaussianos na fase de maturidade da rede neural

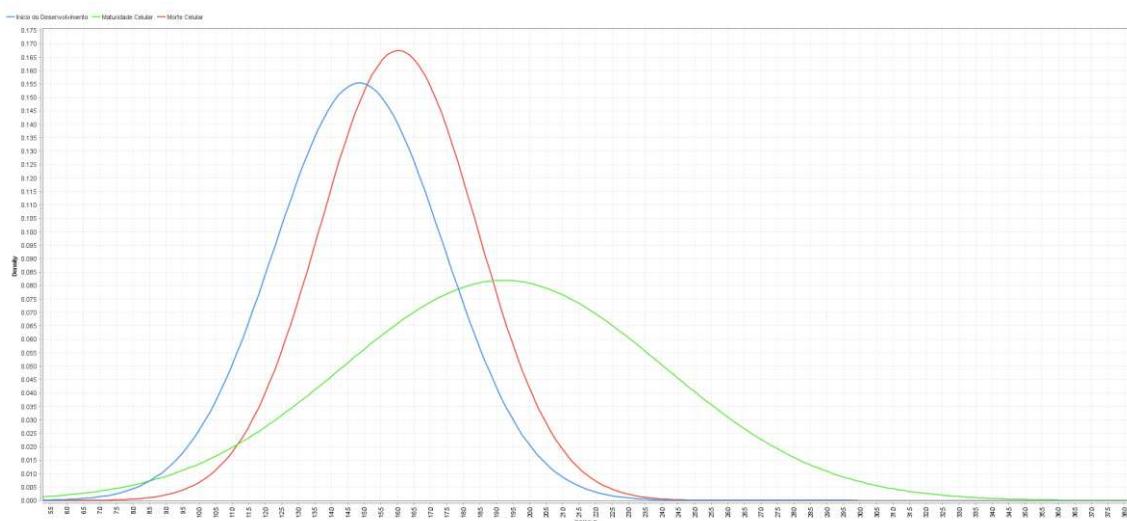


Figura 6.10 – Histograma de densidade de frequência para a variável PSNG para o sinal bruto da MEA. A curva azul refere-se à fase de início do desenvolvimento; a curva verde representa a maturidade celular; e a curva vermelha, a fase de morte celular.

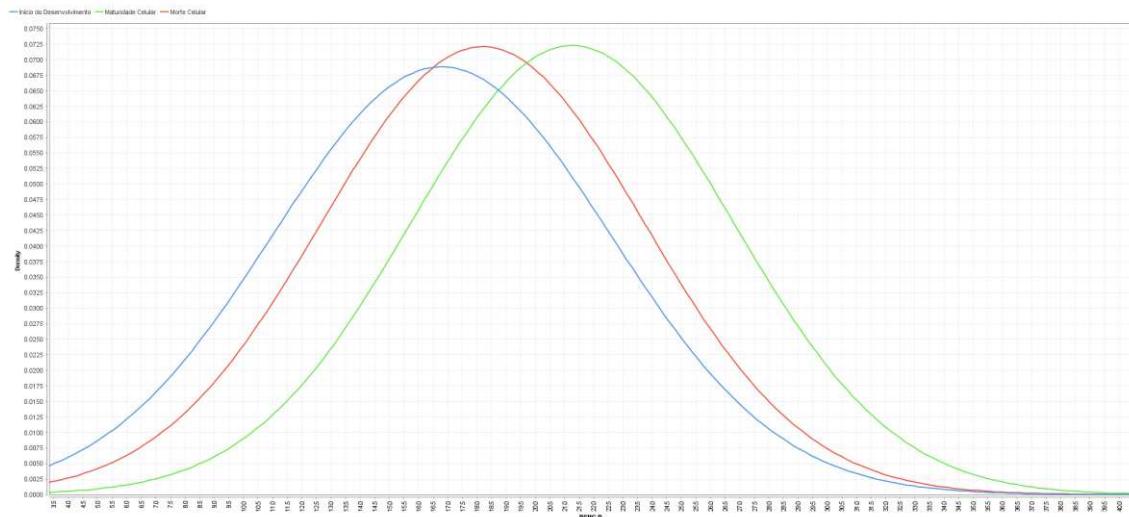


Figura 6.11 – Histograma de densidade de frequência para a variável PSNG para o sinal de ruído biológico da MEA. A curva azul refere-se à fase de início do desenvolvimento; a curva verde representa a maturidade celular; e a curva vermelha, a fase de morte celular.

Correlação das variáveis descritoras do sinal de atividade espontânea e ruído biológico da MEA

De maneira a explorar mais os resultados encontrados para o sinal bruto da MEA e para o sinal de ruído biológico – componente do sinal bruto - realizou-se o estudo da correlação entre as variáveis calculadas neste trabalho a fim de conhecer as relações existentes entre elas. Para tanto, utilizou-se o coeficiente de correlação para medir a direção e o grau de associação linear entre as variáveis.

As Figuras 6.12, 6.13 e 6.14 representam os resultados encontrados para o coeficiente de correlação de Spearman. Este indicador foi utilizado pelo fato de não exigir a suposição de que a relação entre as variáveis seja linear. Além disso, este descritor não requer que elas sejam quantitativas podendo ser utilizado para verificar relação entre variáveis medidas no nível ordinal.

A Figura 6.12 apresenta a correlação de Spearman para as variáveis calculadas para ambos os sinais estudados na fase de início do desenvolvimento celular. Desconsideramos no destaque dos resultados as correlações entre as variáveis e seus respectivos desvios. Com isso, é possível elencar os seguintes resultados com forte ou moderada correlação estatística:

- Moderada correlação positiva de 0,74 entre o número de *bursts*, *Nburst* e os dias *in vitro*;
- Moderada correlação positiva de 0,82 entre o *Nburst* e o intervalo entre *bursts* IBI médio;
- Forte correlação positiva de 0,9 entre o PNSE com o PSNG do sinal bruto da MEA.

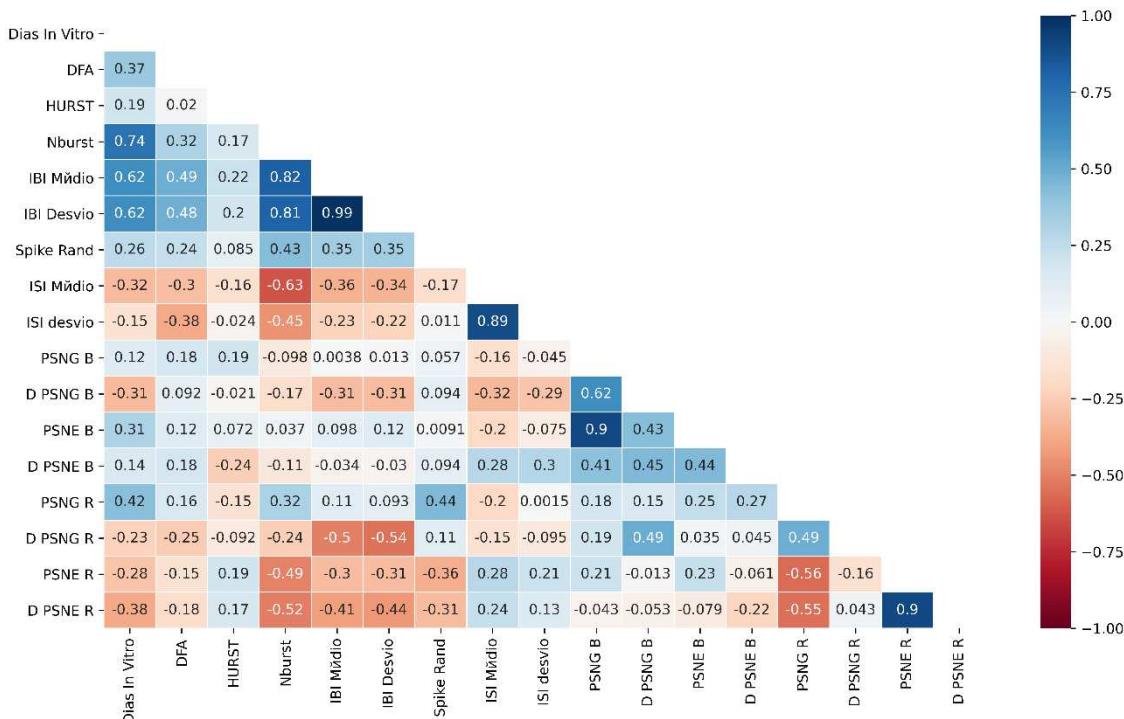


Figura 6.12 - Correlação entre as variáveis da fase de início do desenvolvimento celular

A Figura 6.13 apresenta a correlação de Spearman para as variáveis calculadas na fase de maturidade celular. Os resultados apresentaram apenas forte correlação positiva de 0,9 entre o PNSE com o PSNG do sinal bruto da MEA. Apesar da fase de maturidade celular apresentar estável ligação da rede neural e completude das funções da rede, até mesmo com capacidade rudimentar de aprendizado e memória, esta fase não apresentou correlações importantes entre as variáveis de análise clássica, apresentando apenas correlação forte entre os descritores de gaussianidade e estacionariedade.

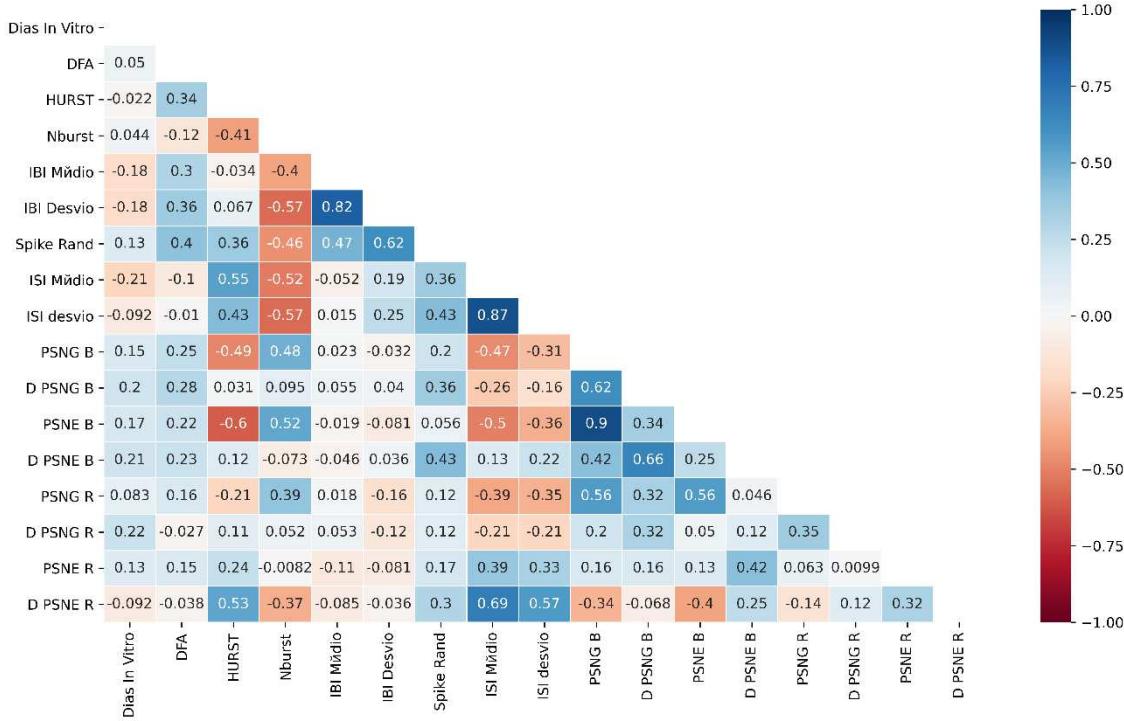


Figura 6.13 - Correlação entre as variáveis da fase de maturidade celular

Por fim a Figura 6.13 apresenta a correlação de Spearman para as características da fase de morte celular. Destacam-se os seguintes resultados com forte ou moderada correlação estatística:

- Moderada correlação negativa de -0,68 entre PSNG do sinal bruto e os dias *in vitro*;
- Moderada correlação negativa de -0,75 entre PSNE do sinal bruto e os dias *in vitro*;
- Moderada correlação negativa de -0,78 entre PSNG do sinal de ruído biológico e os dias *in vitro*;
- Moderada correlação negativa de -0,73 entre spikes randômicos e Nburst;
- Moderada correlação negativa de -0,73 entre intervalo médio entre spikes e Nburst;
- Forte correlação positiva de 0,88 entre o PNSE com o PSNG do sinal bruto da MEA;
- Forte correlação positiva de 0,92 entre o PNSG do sinal de ruído biológico com o PSNG do sinal bruto da MEA.

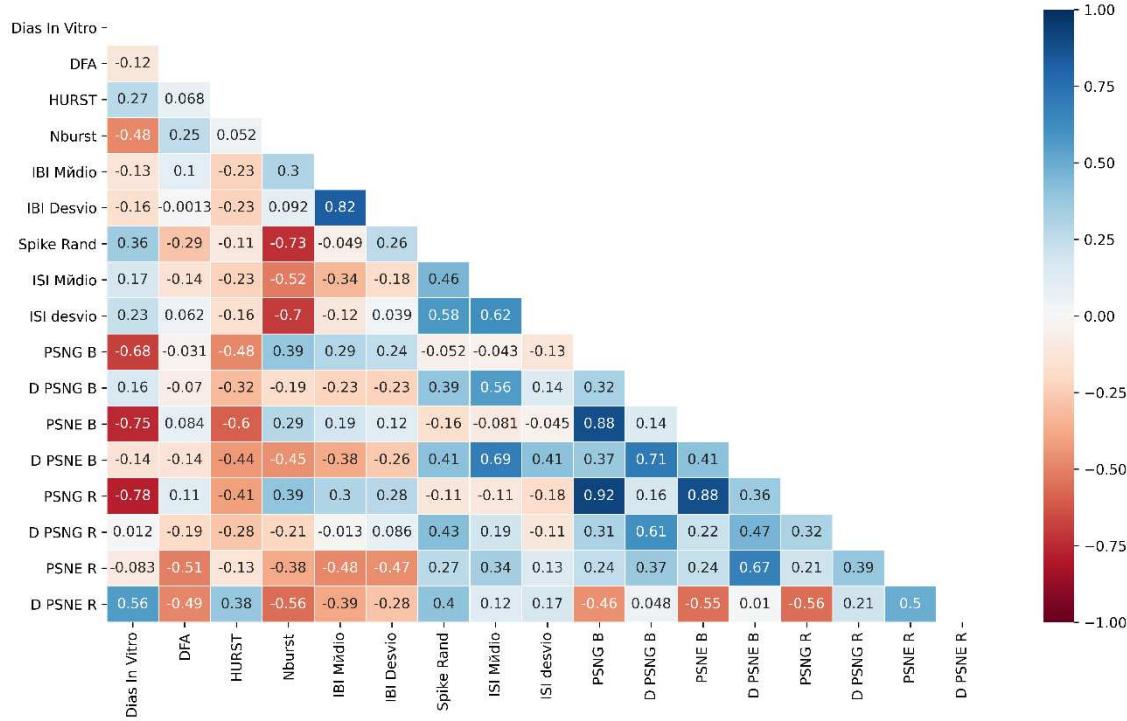


Figura 6.14 - Correlação entre as variáveis da fase de morte celular

Importante ressaltar que a fase de morte celular, uma fase biologicamente mais desorganizada no que se refere a reações bioquímicas e celulares, naturais do processo de morte celular biológica, é a fase que apresenta mais correlações fortes entre as variáveis estudadas, havendo inclusive alta correlação positiva entre a não gaussianidade do sinal bruto em relação ao sinal de ruído biológico desta fase do crescimento celular; assim como entre a não estacionariedade do sinal bruto em relação à não gaussianidade do sinal de ruído biológico.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES

Quantificadores baseados em densidade espectral de potência

- a) A diferenciação entre estes trechos de sinal bruto MEA é estatisticamente fraca para quantificadores ligados à densidade espectral de potência. Isto reforça a conduta de se estudar quantificadores de ordem superior a fim de caracterizar este sinal biomédico com diferenciação estatística suficiente.
- b) Os resultados de processamento do sinal de ruído permitem depreender que os parâmetros PSNE e PSNG, que analisam estacionariedade e gaussianidade, respectivamente, são capazes de diferenciar trechos de sinais constituídos por apenas ruídos biológicos ou mesmo do sinal bruto de MEA

Análise Clássica

- a) Os dias *in vitro* iniciais, durante o processo de formação da rede neural, apresentam os mais baixos números de *spikes* e *bursts*, como os entre as DIV's 08 e 18.
- b) No período de maturidade (DIV 22 até DIV 60) da cultura, observa-se os maiores índices de *spikes* e *bursts*, assim como os menores intervalos ISI e IBI, caracterizando uma cultura ativa, com atividade neurológica organizada
- c) Após o período de maturidade, a cultura de células começa a esboçar menor atividade elétrica, com a queda do total de *spikes* e *bursts* e aumento dos

intervalos ISI e IBI, excetuando-se nas DIV's que antecedem a morte celular (DIV 81 – DIV 88).

- d) DFA, *Nburst* e *Spike* randômico apresentaram diferenças significativas na ANOVA, havendo, portanto, alguma diferenciação entre as médias das fases de crescimento celular. A característica DFA é alterada ao longo das fases do crescimento celular, havendo diferença entre as médias do grupo de início do desenvolvimento para os demais, maturidade e morte celular, porém, não há diferença entre os grupos de morte e maturidade celular; a variável *Nburst* altera-se ao longo do crescimento celular e há diferença significativa entre as médias de todas as fases; o quantificador *Spike* Randômico também é sensível à mudança de fase do crescimento celular, porém essa diferença é significativa apenas entre as fases de maturidade e morte celular.
- e) *Nburst* tem alta diferenciação entre as médias amostrais do grupo início de desenvolvimento e maturidade celular. Isto é evidente ao ponto que no início do crescimento celular a rede neural ainda não se encontra totalmente formada, com densidade sináptica baixa e predominância de conexões tipo junção gap, gerando, portanto, um baixo número de *bursts*. Esta forte diferenciação também é observada entre as fases de maturidade e morte, em que na primeira observamos características de plasticidade e estabilidade da atividade espontânea e na morte celular nota-se um declínio desta atividade elétrica.
- f) *Spike* Randômicos mostrou significativa diferença entre as médias das fases de maturidade da rede neural e morte celular no teste ANOVA, Tabela 5.5 e na Figura 5.11 se reforça o potencial desta característica como marcador biológico para morte celular.

PSNE e PSNG

- a) Há alta variabilidade dos resultados de PSNE e PSNG conforme o tamanho do janelamento utilizado para o processamento do sinal. Desta forma, deve-se investigar um janelamento ótimo que reflita o resultado do descritor de forma mais próxima do real e ainda que permita uma caracterização mais robusta dos sinais MEA.
- b) Denota-se que a variável PSNG pode ser considerada com aderência à normalidade.

- c) A partir da análise de conglomerados, afirma-se que há similitude entre as DIV 15 e DIV 18 e proximidade com a DIV 11. Similitude entre as DIV 60, DIV 71 e DIV 64 e proximidade com a DIV 50 e DIV 74. Similitude entre as DIV 85 e DIV 88 e proximidade com as DIV 81 e DIV 78. Similitude entre as DIV 25 e DIV 26 e proximidade com a DIV 22. Similitude entre a DIV 43 e DIV 46 e proximidade com a DIV 53. E por fim, similitude entre as DIV 29 e DIV 67 com proximidade da DIV 32. A DIV 08 está separada das demais. Reforçando a hipótese de que PSNE e PSNG se constituem em boas propriedades para representação dos sinais MEA.
- d) Tanto os primeiros DIVs quanto os últimos apresentam características muito semelhantes, a saber, atividade elétrica altamente gaussiana e estacionária. Particularmente, durante o período de maturidade da cultura (DIV 29 à DIV 67), os sinais são essencialmente não-gaussianos e não-estacionários.
- e) As conclusões do item (a) acima aplicam-se praticamente a todos os canais da MEA de tal forma que as variâncias tanto em termos de caráter gaussiano quanto do estacionário dos sinais medidos são baixíssimas. Todavia, a partir de DIV 81, estas duas variâncias são claramente muito diferentes de todas as demais, revelando que a partir desta data o comportamento da atividade elétrica é extremamente desorganizado, variando muito de canal para canal. De fato, levando-se em conta os resultados quantitativos apresentados, a variância de PSNG e de PSNE poderiam ser usados como biomarcadores do início da morte celular.
- f) Ao longo do tempo de vida da cultura, as características de estacionariedade e gaussianidade se modificam, sendo possível estabelecer um paralelo com o ciclo de vida clássico deste preparo biológico, conforme discutido na revisão. Tais modificações ocorrem de maneira diferente nas regiões geométricas da MEA, em que, mesmo próximo à morte celular, ainda assim, alguns grupos de neurônios apresentam comportamento típico da maturidade, ou seja, sinais bastante não-gaussianos e não-estacionários.
- g) No início do desenvolvimento há em média de 12% a 16% dos segmentos não gaussianos ($14,84 \pm 2,56$) e de 19% a 25% dos segmentos não estacionários ($23,25 \pm 3,25$), o que sugere menor atividade elétrica espontânea e um sinal composto em sua maioria de ruído biológico e ruído de instrumentação (este último completamente gaussiano e estacionário). Na maturidade da rede neural já se observa um maior número de segmentos não gaussianos, em torno de 17% a 22% ($19,21 \pm 6,9$), e de 25% a 28% ($26,91 \pm 4,52$) de segmentos não

estacionários. Isto reflete a completa maturação das conexões excitatórias desta fase do crescimento celular em que o padrão de conectividade sináptica atingiu a estabilização com elevado número de *spikes* e *bursts*. A morte celular apresentou PSNG em torno de 12% a 16% ($16,03 \pm 5,49$), superior ao PSNG da fase inicial, porém inferior ao PSNG da fase de maturidade celular. A mesma análise se reflete na análise do descritor PSNE em que na morte celular apresentou um resultado de 20% a 26% ($23,89 \pm 4,65$).

Ruído biológico no sinal MEA

- a) O aumento dos segmentos não estacionários para o ruído biológico acontece nas fases de início de desenvolvimento e morte celular comparativamente ao sinal bruto. Estas fases são biologicamente próximas no sentido do comportamento elétrico. A primeira, com tipos imaturos de sinapse e baixa densidade sináptica e a última com progressiva deterioração da rede neural e menor atividade espontânea. Importante destacar que, a diferenciação do sinal de ruído biológico para com o sinal de MEA bruto se dá unicamente pela retirada dos *spikes* e *bursts* do sinal.
- b) A aplicação de ANOVA nestes descritores para o sinal de ruído denotou dificuldade de diferenciação entre as fases de crescimento celular ao analisar o descritor PNSE, não sendo possível, estatisticamente, separar nenhuma das fases por meio apenas desta variável. No entanto, assim como no sinal bruto, o PNSG foi capaz de diferenciar significativamente as fases de início e maturidade celular, mas não conseguiu diferenciar nenhuma outra fase.
- c) O comportamento do PSNG se apresenta relativamente bem próximo nos dois sinais, bruto e ruído biológico, para todas as fases do sinal. É notório que os resultados de PSNG foram superiores em aproximadamente 2%, porém com maior desvio padrão para o sinal de ruído. Considerando o efeito da retirada da atividade espontânea neste último é possível entender que este descritor não foi capaz de obter informações adicionais do sinal de ruído biológico das culturas. Porém, nos permite afirmar que o ruído biológico no crescimento de células neuronais *in vitro* não se assemelha a um sinal puramente gaussiano, ou ao ruído branco gaussiano formado por sinal aleatório, de densidade espectral constante em distribuição normal e média zero.

- d) O PSNE no sinal de ruído biológico apresentou resultado similar de não estacionariedade em relação ao sinal bruto na fase de maturidade, mesmo sendo esta fase a com mais atividade elétrica espontânea e, portanto, a com mais *spikes* e *bursts* retirados para constituição do sinal de ruído biológico. Isto reforça que esta fase contempla *spikes* aleatórios, porém rítmicos, sincronizados, e com padrão de *bursts* estáveis característicos da maturidade das conexões sinápticas, o que não eleva a não estacionariedade do sinal como esperado para o sinal bruto.
- e) A análise do ruído biológico nas fases de crescimento celular e morte celular revelou a importância do ruído biológico na rede neural. Estas duas etapas são aquelas com maior número de eventos biológicos importantes, no início de desenvolvimento, ainda com poucos *spikes* e *bursts*, as conexões sinápticas imaturas estão se reforçando, os neurônios isolados se conectando a rede neural em busca de formar a plasticidade da rede com aumento da sinaptogênese química; já na fase de morte celular, vários são os estímulos que desencadeiam a morte celular por uma cascata de reações bioquímicas e moleculares que modificam estruturalmente a célula até o completo desaparecimento, encolhimento citoplasmático, condensação de cromatina (picose), fragmentação do núcleo (cariorexe) e fragmentação da membrana plasmática.
- f) As fases de início de desenvolvimento e morte celular no sinal de ruído, por meio das características biológicas destas fases, são representados por sinais em que suas características estatísticas variam ao longo do tempo e carregam informações importantes não aleatórias no sentido estacionário ou gaussiano.
- g) As fases de início e fim do crescimento celular para o ruído biológico se diferenciaram do sinal bruto em PSNE, onde para o ruído biológico se observaram mais segmentos não estacionários do que para o sinal bruto. Este resultado se destaca pois nestas fases há menos atividade elétrica espontânea, o que leva ao sinal bruto se apresentar como um sinal mais estacionário do que para a fase de maturidade celular.
- h) Na fase de morte celular, característica por desorganização biológica e explosão bioquímica, há certa organização, concentrado com alta densidade em 30% de PSNE com esparramamento relativo menor das caudas com classes de 20% a 40%. Já a fase de início de desenvolvimento para o sinal de ruído perde sua característica concentradora em 23% de PSNE e apresenta uma curva de densidade de probabilidade mais achatada, apresentando densidade de classe

central quase 70% menor que na Figura 6.9, com caudas 25% a 60% de PSNE, centrado em 30% de PSNE.

- i) Há forte correlação positiva de 0,9 entre o PNSE com o PSNG do sinal bruto da MEA. Apesar da fase de maturidade celular apresentar estável ligação da rede neural e completude das funções da rede, até mesmo com capacidade rudimentar de aprendizado e memória, esta fase não apresentou correlações importantes entre as variáveis de análise clássica, apresentando apenas correlação forte entre os descritores de gaussianidade e estacionariedade.
- j) A fase de morte celular, uma fase biologicamente mais desorganizada no que se refere a reações bioquímicas e celulares, naturais do processo de morte celular biológica, é a fase que apresenta mais correlações entre as variáveis estudadas, havendo inclusive alta correlação positiva entre a não gaussianidade do sinal bruto em relação ao sinal de ruído biológico desta fase do crescimento celular; assim como entre a não estacionariedade do sinal bruto em relação à não gaussianidade do sinal de ruído biológico.

Em trabalhos futuros sugere-se a aplicação dos descritores de PSNG e PSNE para análise de maior volume de sinais MEA em sua forma bruta e seu ruído biológico, assim como o estudo destes sinais a estímulos elétricos externos controlados por meio de injeção de sinais conhecidos. Outra análise interessante de se aplicar em trabalhos futuros é a aplicação da inteligência artificial para clusterização das fases do desenvolvimento celular neuronal *in vitro* por meio de algoritmos classificadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. **Equipamento eletromédico - Parte 1: Prescrições gerais para segurança.** . [S.l: s.n.], 2010

ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular.** [S.l: s.n.], 2011. DOI: 10.1103/PhysRevE.87.062310

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., *et al.* **Biologia molecular da célula.** [S.l: s.n.], 2008. DOI: 10.1007/s13398-014-0173-7.2

ARRIAGA, E. A. **Determining biological noise via single cell analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry.** [S.l: s.n.], 2009. DOI: 10.1007/s00216-008-2431-z

ASSIS, A. R. de. **Análise da estacionariedade e gaussianidade da atividade elétrica neural, do ruído biológico e do ruído de instrumentação.** 2011. 168 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/14466>.

BIASOLI, V., DOELLINGER, R., COSTA, K., *et al.* "Aplicação de Estatística Robusta em Ensaios de Proficiência". 2007. **Anais [...] Salvador-BA,** [s.n.], 2007.

BIPM. **JCGM 101 - Evaluation of measurement data - Supplement 1 to the Guide to the expression of uncertainty in measurement - Propagation of distributions using a Monte Carlo method.** . [S.l: s.n.], 2008

BREUSCH, T. S., PAGAN, A. R. "The Lagrange Multiplier Test and its Applications to Model Specification in Econometrics", **The Review of Economic Studies**, 1980. DOI: 10.2307/2297111. .

BUSSAB, W. O., MORRETTIN, P. A. **Estatística Básica.** 5 ed. ed. [S.I.], Saraiva, 2002.

CANTELMO, N. F., FERREIRA, D. F. "Desempenho de testes de normalidade multivariados avaliado por simulação Monte Carlo", **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1630–1636, dez. 2007. DOI: 10.1590/S1413-70542007000600005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000600005&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 22 jun. 2021.

- CHANG, J. C., BREWER, G. J., WHEELER, B. C. "Microelectrode array recordings of patterned hippocampal neurons for four weeks", **Biomedical Microdevices**, 2000. DOI: 10.1023/A:1009946920296. .
- CHIALVO, D. R. "Emergent complex neural dynamics", **Nature Physics**, 2010. DOI: 10.1038/nphys1803. .
- CHIAPPALONE, M. **Acquisition and Processing of Electrophysiological Signals: a New Perspective towards Brain-Machine Interface**. 2003. 232 f. University of Genova, 2003.
- CHIAPPALONE, M., BOVE, M., VATO, A., *et al.* "Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development", **Brain Research**, 2006. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.03.049. .
- CIRILLO, M. A., FERREIRA, D. F. "Extensão do Teste para Normalidade Univariado Baseado no Coeficiente de Correlação Quantil-Quantil para o Caso Multivariado", **Revista de Matemática e Estatística**, v. 21, n. 3, p. 67–84, 2003. .
- CLAVEROL-TINTURÉ, E., GHIRARDI, M., FIUMARA, F., *et al.* "Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons", **Journal of Neural Engineering**, 2005. DOI: 10.1088/1741-2560/2/2/L01. .
- COLOMBI, I., TINARELLI, F., PASQUALE, V., *et al.* "A simplified in vitro experimental model encompasses the essential features of sleep", **Frontiers in Neuroscience**, 2016. DOI: 10.3389/fnins.2016.00315. .
- COTTERILL, E., HALL, D., WALLACE, K., *et al.* "Characterization of early cortical neural network development in multiwell microelectrode array plates", **Journal of Biomolecular Screening**, 2016. DOI: 10.1177/1087057116640520. .
- COX, D. R., HINKLEY, D. V. **Theoretical Statistics**. [S.l: s.n.], 1974. DOI: 10.1007/978-1-4899-2887-0
- CYBULSKI, T. R., GLASER, J. I., MARBLESTONE, A. H., *et al.* "Spatial information in large-scale neural recordings", **Frontiers in Computational Neuroscience**, 2015. DOI: 10.3389/fncom.2014.00172. .
- DAR, R. D., WEISS, R. "Perspective: Engineering noise in biological systems towards predictive stochastic design", **APL Bioengineering**, 2018. DOI: 10.1063/1.5025033. .
- DEFELICE, L. J. **Introduction to Membrane Noise**. [S.l: s.n.], 1981. DOI: 10.1007/978-1-4613-3135-3

- DESTEXHE, A., RUDOLPH, M. "Extracting information from the power spectrum of synaptic noise", **Journal of Computational Neuroscience**, 2004. DOI: 10.1023/B:JCNS.0000044875.90630.88. .
- DRAGAS, J., VISWAM, V., SHADMANI, A., *et al.* "In Vitro Multi-Functional Microelectrode Array Featuring 59 760 Electrodes, 2048 Electrophysiology Channels, Stimulation, Impedance Measurement, and Neurotransmitter Detection Channels", **IEEE Journal of Solid-State Circuits**, 2017. DOI: 10.1109/JSSC.2017.2686580. .
- ESPOSTI, F., FERRARIO, M., SIGNORINI, M. G. "A blind method for the estimation of the Hurst exponent in time series: Theory and application", **Chaos**, 2008. DOI: 10.1063/1.2976187. .
- FAISAL, A. A., SELEN, L. P. J., WOLPERT, D. M. **Noise in the nervous system**. **Nature Reviews Neuroscience**. [S.l: s.n]. , 2008. DOI: 10.1038/nrn2258
- FATT, P., KATZ, B. "Some observations on biological noise", **Nature**, 1950. DOI: 10.1038/166597a0. .
- FERGUSON, M., SHARMA, D., ROSS, D., *et al.* **A Critical Review of Microelectrode Arrays and Strategies for Improving Neural Interfaces**. **Advanced Healthcare Materials**. [S.l: s.n]. , 2019. DOI: 10.1002/adhm.201900558
- GARRETT, D. D., SAMANEZ-LARKIN, G. R., MACDONALD, S. W. S., *et al.* **Moment-to-moment brain signal variability: A next frontier in human brain mapping?** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. [S.l: s.n]. , 2013. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2013.02.015
- GLASER, E. M., RUCHKIN, D. S. "Principles of Neurobiological Signal Analysis", **Journal of Clinical Engineering**, 1977. DOI: 10.1097/00004669-197710000-00020. .
- GODFREY, L. G. "Testing for Higher Order Serial Correlation in Regression Equations when the Regressors Include Lagged Dependent Variables", **Econometrica**, 1978. DOI: 10.2307/1913830. .
- GOLDBERGER, A. L., AMARAL, L. A. N., HAUSDORFF, J. M., *et al.* "Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2002. DOI: 10.1073/pnas.012579499. .
- GONZE, D., GÉRARD, C., WACQUIER, B., *et al.* **Modeling-based investigation of the effect of noise in cellular systems**. **Frontiers in Molecular Biosciences**. [S.l: s.n]. ,

2018. DOI: 10.3389/fmolb.2018.00034

GROSS, G. W. "Simultaneous Single Unit Recording in vitro with a Photoetched Laser Deinsulated Gold Multimicroelectrode Surface", **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, 1979. DOI: 10.1109/TBME.1979.326402. .

GROSS, G. W., RHOADES, B., JORDAN, R. "Neuronal networks for biochemical sensing", **Sensors and Actuators: B. Chemical**, 1992. DOI: 10.1016/0925-4005(92)80022-P. .

GROSS, G. W., RHOADES, B. K., AZZAZY, H. M. E., *et al.* "The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors", **Biosensors and Bioelectronics**, 1995. DOI: 10.1016/0956-5663(95)96931-N. .

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**, 1985. DOI: 10.1016/0165-0270(85)90105-0. .

HARDINGHAM, G. E., BADING, H. **Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. Nature Reviews Neuroscience**. [S.l: s.n.], 2010. DOI: 10.1038/nrn2911

HENNINSON, M., ILLES, S. "Analysis and modeling of subthreshold neural multielectrode array data by statistical field theory", **Frontiers in Computational Neuroscience**, 2017. DOI: 10.3389/fncom.2017.00026. .

HILL, W. G., ZHANG, X. S. "Effects on phenotypic variability of directional selection arising through genetic differences in residual variability", **Genetical Research**, 2004. DOI: 10.1017/S0016672304006640. .

INMETRO. **A estimativa da incerteza de medição pelos métodos do ISO GUM 95 e de simulação de Monte Carlo**. . [S.l: s.n.], 2008

INMETRO. **Sistema Internacional de Unidades SI**. . [S.l: s.n.], 2012

JACOBSON, G. A., DIBA, K., YARON-JAKOUBOVITCH, A., *et al.* "Subthreshold voltage noise of rat neocortical pyramidal neurones", **Journal of Physiology**, 2005. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.080903. .

JARQUE, C. M., BERA, A. K. "A Test for Normality of Observations and Regression Residuals", **International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique**, 1987. DOI: 10.2307/1403192. .

- JIMBO, Y., TATENO, T., ROBINSON, H. P. C. "Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons", **Biophysical Journal**, 1999. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77234-6. .
- JIMBO, Yasuhiko, KASAI, N., TORIMITSU, K., *et al.* "A system for MEA-based multisite stimulation", **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, 2003. DOI: 10.1109/TBME.2002.805470. .
- JOHNSTONE, A. F. M., GROSS, G. W., WEISS, D. G., *et al.* **Microelectrode arrays: A physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century.** **NeuroToxicology**. [S.l: s.n.], 2010. DOI: 10.1016/j.neuro.2010.04.001
- KAMIOKA, H., MAEDA, E., JIMBO, Y., *et al.* "Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures", **Neuroscience Letters**, 1996. DOI: 10.1016/S0304-3940(96)12448-4. .
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M. **Principles of Neural Science, fourth addition.** [S.l: s.n.], 2000. DOI: 10.1036/0838577016
- KHOLODENKO, B. N. **Cell-signalling dynamics in time and space.** **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. [S.l: s.n.], 2006. DOI: 10.1038/nrm1838
- KIM, R., JOO, S., JUNG, H., *et al.* **Recent trends in microelectrode array technology for in vitro neural interface platform.** **Biomedical Engineering Letters**. [S.l: s.n.], 2014. DOI: 10.1007/s13534-014-0130-6
- KIM, S., MCNAMES, J. "Automatic spike detection based on adaptive template matching for extracellular neural recordings", **Journal of Neuroscience Methods**, 2007. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2007.05.033. .
- LEOTTI, V. B., BIRCK, A. R., RIBOLDI, J. "Comparação dos Testes de Aderência à Normalidade Kolmogorov-smirnov, Anderson-Darling, Cramer–Von Mises e Shapiro-Wilk por Simulação". 2005. **Anais** [...] Londrina - PR, [s.n.], 2005.
- LOPES, M. de M., CASTELO BRANCO, V. T. F., SOARES, J. B. "Utilização dos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificação da normalidade para materiais de pavimentação", **TRANSPORTES**, v. 21, n. 1 SE-Artigos, p. 59–66, 30 abr. 2013. DOI: 10.4237/transportes.v21i1.566. Disponível em: <https://www.revistatransportes.org.br/anpet/article/view/566>.
- MAISEL, B., LINDENBERG, K. "Channel noise effects on first spike latency of a stochastic Hodgkin-Huxley neuron", **Physical Review E**, 2017. DOI:

10.1103/PhysRevE.95.022414. .

MAROM, S., SHAHAF, G. **Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: Lessons beyond anatomy.** *Quarterly Reviews of Biophysics*. [S.l: s.n.], 2002. DOI: 10.1017/S0033583501003742

MARQUES, S. M. **Novas ferramentas de processamento de sinais para a análise da cultura de neurônios corticais cultivados em dispositivos multieletrodos.** 2012. 149 f. Universidade Federal de Uberlândia, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/14553>.

MCCONNELL, E. R., MCCLAIN, M. A., ROSS, J., et al. "Evaluation of multi-well microelectrode arrays for neurotoxicity screening using a chemical training set", *NeuroToxicology*, 2012. DOI: 10.1016/j.neuro.2012.05.001. .

MCDONNELL, M. D., WARD, L. M. **The benefits of noise in neural systems: Bridging theory and experiment.** *Nature Reviews Neuroscience*. [S.l: s.n.], 2011. DOI: 10.1038/nrn3061

MENDONÇA, P. R. F., VARGAS-CABALLERO, M., ERDÉLYI, F., et al. "Stochastic and deterministic dynamics of intrinsically irregular firing in cortical inhibitory interneurons", *eLife*, 2016. DOI: 10.7554/eLife.16475. .

MENEZES, C. I. C.; SALLES, M. T.; SILVA, M. A. S. "Uma Ferramenta para melhoria da Qualidade dos Instrumentos da Área da Saúde". 2003. *Anais [...]* [S.l: s.n.], 2003. p. 1–7.

MERCER, H. D., WHITE, R. L. "Photolithographic Fabrication and Physiological Performance of Microelectrode Arrays for Neural Stimulation", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1978. DOI: 10.1109/TBME.1978.326282. .

NAPOLI, A., OBEID, I. "Comparative Analysis of Human and Rodent Brain Primary Neuronal Culture Spontaneous Activity Using Micro-Electrode Array Technology", *Journal of Cellular Biochemistry*, 2016. DOI: 10.1002/jcb.25312. .

NEISHABOURI, A., FAISAL, A. A. "Axonal Noise as a Source of Synaptic Variability", *PLoS Computational Biology*, 2014. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003615. .

NENADIC, Z., BURDICK, J. W. "Spike detection using the continuous wavelet transform", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2005. DOI: 10.1109/TBME.2004.839800. .

NOVELLINO, A., CHIAPPALONE, M., VATO, A., et al. "Behaviors from an electrically

stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays", **Neurocomputing**, 2003. DOI: 10.1016/S0925-2312(02)00861-5. .

OBIEN, M. E. J., DELIGKARIS, K., BULLMANN, T., *et al.* **Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. Frontiers in Neuroscience**. [S.l: s.n.], 2015. DOI: 10.3389/fnins.2014.00423

OLSEN, L. R., CHAUDHURI, P., GODTLIEBSEN, F. "Multiscale spectral analysis for detecting short and long range change points in time series", **Computational Statistics and Data Analysis**, 2008. DOI: 10.1016/j.csda.2007.10.027. .

ÖZTUNA, D., ELHAN, A. H., TÜCCAR, E. "Investigation of four different normality tests in terms of type 1 error rate and power under different distributions", **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 36, n. 3, 2006. .

PENG, C. K., HAVLIN, S., STANLEY, H. E., *et al.* "Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series", **Chaos**, 1995. DOI: 10.1063/1.166141. .

PINE, J. "Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes", **Journal of Neuroscience Methods**, 1980. DOI: 10.1016/0165-0270(80)90042-4. .

POTTER, S. M., DEMARSE, T. B. "A new approach to neural cell culture for long-term studies", **Journal of Neuroscience Methods**, 2001. DOI: 10.1016/S0165-0270(01)00412-5. .

REGALIA, G., BIFFI, E., FERRIGNO, G., *et al.* "A low-noise, modular, and versatile analog front-end intended for processing in vitro neuronal signals detected by microelectrode arrays", **Computational Intelligence and Neuroscience**, 2015. DOI: 10.1155/2015/172396. .

ROCHA, P. R. F., SCHLETT, P., KINTZEL, U., *et al.* "Electrochemical noise and impedance of Au electrode/electrolyte interfaces enabling extracellular detection of glioma cell populations", **Scientific Reports**, 2016. DOI: 10.1038/srep34843. .

RODRÍGUEZ, E. R. L. **Mapeamento topológico virtual de neurônios proporcionais às atividades eletrofisiológicas em matrizes de microeletrodos**. 2015. 141 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/7865/TeseERLR.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

ROYSTON, P. "Corrigendum: A Toolkit for Testing for Non-normality in Complete and Censored Samples", **Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)**, v. 48, n. 1, 1999. DOI: 10.1111/1467-9884.00178. .

SAKAI, K., SHIMBA, K., KOTANI, K., *et al.* "Microfabricated multi-electrode device for detecting oligodendrocyte-regulated changes in axonal conduction velocity". 2015. **Anais** [...] [S.l: s.n.], 2015. DOI: 10.1109/EMBC.2015.7320035.

SCARSI, F., TESSADORI, J., PASQUALE, V., *et al.* "Impact of stimuli distribution on neural network responses". 2015. **Anais** [...] [S.l: s.n.], 2015. DOI: 10.1109/EMBC.2015.7319458.

SCHULTZ, L., ZURICH, M. G., CULOT, M., *et al.* "Evaluation of drug-induced neurotoxicity based on metabolomics, proteomics and electrical activity measurements in complementary CNS in vitro models", **Toxicology in Vitro**, 2015. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.05.016. .

SERLETIS, D., BARDAKJIAN, B. L., VALIANTE, T. A., *et al.* "Complexity and multifractality of neuronal noise in mouse and human hippocampal epileptiform dynamics", **Journal of Neural Engineering**, 2012. DOI: 10.1088/1741-2560/9/5/056008. .

SHAPIRO, S. S., WILK, M. B. "An analysis of variance test for normality (complete samples)", **Biometrika**, v. 52, n. 3–4, 1965. DOI: 10.1093/biomet/52.3-4.591. .

SIMONIAN, N. A., COYLE, J. T. **Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. [S.l: s.n.], 1996

SPIRA, M. E., HAI, A. **Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology**. **Nature Nanotechnology**. [S.l: s.n.], 2013. DOI:10.1038/nnano.2012.265

STEIN, R. B., GOSSEN, E. R., JONES, K. E. **Neuronal variability: Noise or part of the signal?** **Nature Reviews Neuroscience**. [S.l: s.n.], 2005. DOI: 10.1038/nrn1668

SULLIVAN, H. "Ionic Channels of Excitable Membranes, 2nd Ed.", **Neurology**, 1992. DOI: 10.1212/wnl.42.7.1439-a. .

TAKETANI, M., BAUDRY, M. **Advances in network electrophysiology: Using multi-electrode arrays**. [S.l: s.n.], 2006. DOI: 10.1088/0034-4885/77/2/026601

TAKEUCHI, A., NAKAFUTAMI, S., TANI, H., *et al.* "Device for co-culture of sympathetic neurons and cardiomyocytes using microfabrication", **Lab on a Chip**, 2011. DOI: 10.1039/c0lc00327a. .

TATENO, T., KAWANA, A., JIMBO, Y. "Analytical characterization of spontaneous firing in networks of developing rat cultured cortical neurons", **Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics**, 2002. DOI: 10.1103/PhysRevE.65.051924. .

THOMAS, C. A., SPRINGER, P. A., LOEB, G. E., *et al.* "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells", **Experimental Cell Research**, 1972. DOI: 10.1016/0014-4827(72)90481-8. .

TSIMRING, L. S. **Noise in biology. Reports on Progress in Physics**. [S.l: s.n]. , 2014. DOI: 10.1088/0034-4885/77/2/026601

VALDIVIA, P., MARTIN, M., LEFEW, W. R., *et al.* "Multi-well microelectrode array recordings detect neuroactivity of ToxCast compounds", **NeuroToxicology**, 2014. DOI: 10.1016/j.neuro.2014.06.012. .

VAN PELT, J., VAJDA, I., WOLTERS, P. S., *et al.* **Dynamics and plasticity in developing neuronal networks in vitro. Progress in Brain Research**. [S.l: s.n]. , 2005

VAN PELT, J., WOLTERS, P. S., CORNER, M. A., *et al.* "Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks", **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, 2004. DOI: 10.1109/TBME.2004.827936. .

VAN VREESWIJK, C., SOMPOLINSKY, H. "Chaos in neuronal networks with balanced excitatory and inhibitory activity", **Science**, 1996. DOI: 10.1126/science.274.5293.1724.

VASSALLO, A., CHIAPPALONE, M., DE CAMARGOS LOPES, R., *et al.* "A multi-laboratory evaluation of microelectrode array-based measurements of neural network activity for acute neurotoxicity testing", **NeuroToxicology**, 2017. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.03.019. .

VATO, A., BONZANO, L., CHIAPPALONE, M., *et al.* "Spike manager: A new tool for spontaneous and evoked neuronal networks activity characterization", **Neurocomputing**, 2004. DOI: 10.1016/j.neucom.2004.01.180. .

XIE, C., LIN, Z., HANSON, L., *et al.* "Intracellular recording of action potentials by nanopillar electroporation", **Nature Nanotechnology**, 2012. DOI: 10.1038/nnano.2012.8. .