

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

**QUANTIFICAÇÃO E AGRUPAMENTO DE
NEURÔNIOS *IN VITRO* USANDO MAPAS
AUTO-ORGANIZÁVEIS EM MATRIZ DE
MICROELETRODOS**

JOSÉ ROBERTO CAMPOS

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ HIROKI SAITO

São Carlos – SP

Março/2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO

**QUANTIFICAÇÃO E AGRUPAMENTO DE
NEURÔNIOS *IN VITRO* USANDO MAPAS
AUTO-ORGANIZÁVEIS EM MATRIZ DE
MICROELETRODOS**

JOSÉ ROBERTO CAMPOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência da Computação, área de concentração: Processamento de Imagens e Sinais

Orientador: Prof. Dr. José Hiroki Saito

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

São Carlos – SP

Março/2020



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato José Roberto Campos, realizada em 02/03/2020:

Prof. Dr. José Hiroki Saito
UFSCar

Prof. Dr. Cesar Henrique Comin
UFSCar

Prof. Dr. Emerson Carlos Pedrino
UFSCar

Prof. Dr. Marcelo Andrade da Costa Vieira
EESC/USP

Prof. Dr. João Batista Destro Filho
UFU

Às vezes o mais difícil da vida é isso: não é dar o que a gente tem, é dar o que a gente é!

Padre Fábio de Melo

A Deus, meu guia e suporte em todos os momentos. A minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me dado o dom da vida e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais. Ao Professor Doutor José Hiroki Saito, meu orientador, meu respeito, gratidão, admiração, pois acreditou em mim, tornou o meu sonho possível, pela imensa compreensão, e me incentivou para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Francisco e Maria de Lourdes, que são a minha matriz, exemplo de honestidade e caráter a ser seguido, e que sempre quando ouço falar de amor eles são sem dúvida nenhuma as primeiras pessoas que me vem em mente.

A minha esposa Fabiana que sem dúvida é a pessoa que esteve ao meu lado mesmo nos dias ruins, me apoiando, incentivando e acreditando no meu potencial, que por inúmeras vezes foi capaz de compreender os momentos de estresse e ainda por cima, saber dizer a palavra certa no momento certo.

Ao meu filho Ryan, que é o meu reflexo bom na terra, que com o seu jeito de ser é capaz de transformar a tristeza em alegria, por sua energia de criança saber transmitir tudo de bom para mim, alegria da minha vida.

Ao meu irmão Renato e sua família que sempre acreditaram em mim, pela eterna sabedoria ele foi a base do início de tudo.

Aos meus "dogs" Snoopy e Jade que é, sem medo de ser injusto com ninguém a eterna alegria de nossas vidas.

Aos meus sogros Rubinho "o artilheiro" e Terezinha por serem pessoas especiais em minha vida.

A minha ex-professora e hoje amiga de trabalho, Profa. Ma. Elisangela Citro pelo imenso apoio, à ela minha eterna gratidão.

Agradeço aos colegas que fiz durante a minha passagem pela UFSCar, ao prof. Dr. Vinicius Caridá, prof. Dr. Francisco Fambrini, prof. Dr. João Fernando Mari, prof. Dr. João Destro entre outros que puderam contribuir direta e indiretamente.

Agradeço fraternalmente a todos que, de certa forma puderam contribuir seja com sugestões, críticas, dicas e apoio.

Agradeço ao Instituto Federal de Mato Grosso do Sul pela cooperação e ao programa da Capes Pro-doutoral.

RESUMO

Compreender como a informação é codificada em grandes redes neuronais é um dos maiores desafios para a neurociência. Uma possível abordagem para investigar as capacidades de processamento de informações dos conjuntos neuronais é dada pelo uso de culturas neuronais dissociadas acopladas à matriz de microeletrodos (em inglês, *Microelectrode Array* – MEA). Por exemplo, os neurônios corticais dissociados de embriões de ratos cultivados *in vitro* em MEA apresentam padrões característicos de atividade eletrofisiológica, variando desde picos isolados nos primeiros dias de desenvolvimento até *bursts* altamente sincronizadas após 3-4 semanas. Neste contexto é importante um conhecimento da função da distribuição espacial dos neurônios, para isso a microscopia é uma alternativa utilizada para descobrir o posicionamento das células de neurônios sobre o substrato de vidro da MEA. Entretanto, nem sempre a microscopia é realizada, principalmente, em pequenos intervalos de tempo durante o registro de sinais. Naturalmente existe uma carência no contexto de métodos capazes de realizar tais funções sem prejudicar a medida dos sinais espontâneos produzidos pela rede neuronal. Para amenizar este problema, é proposto nessa tese uma estrutura para quantificar e classificar as células de neurônios e assim estimar o arranjo topológico da cultura, através da identificação de *spikes* e *bursts*, nos eletrodos da MEA. A estrutura desenvolvida para o mapeamento topológico de neurônios, utilizando rede neurais de mapas auto-organizáveis - SOM (*Self Organizing Map*), é aplicada aos sinais de gravação do experimento intitulado como Cultura 371, de células neuronais dissociadas cultivadas *in vitro*, realizado no Laboratório de Neuroengenharia e Bionanotecnologia da Universidade de Gênova, na Itália. Para validar o procedimento, são comparados um mapa topológico obtido como resultado desta tese com uma imagem de microscopia obtida no dia 38 de maturação da Cultura 371. Para a maioria dos eletrodos da MEA o teste Qui-Quadrado resultou nesta validação. Além disso, é realizado nos mapas topológicos a classificação dos neurônios observados ao redor dos microeletrodos utilizando a análise e separação de formas de ondas dos *spikes* registradas.

Palavras-chave: Matriz de Microeletrodos, Neurocomputação, Spikes, Bursts, Classificação

ABSTRACT

Understanding how information is encoded in large neuronal networks is one of the biggest challenges in neuroscience. A possible approach to investigate the information processing capabilities of neuronal nets is given by the use of dissociated neuronal cultures attached to the Microelectrode Array. For instance, cortical neurons dissociated from rat embryos cultivated in vitro in MEA show characteristic patterns of electrophysiological activities, ranging from isolated peaks in the early days up to highly synchronized bursts after 3-4 weeks. In this context it is important to know the spatial distribution function of neurons and, for that the microscopic images are an alternative used to find out the positioning of the neuron cells on the glass substrate of the MEA. However, it is worth noting that microscopy is not always performed mainly at short intervals during signal recording. Of course there is a lack in the context of methods capable to perform such functions without impairing the measurement of spontaneous signals produced by the neuronal networks. To minimize this problem, it is proposed in this thesis a framework for quantifying and classifying neuron cells and thus estimate the topological arrangement of the culture, by identifying spikes and bursts, on the MEA electrodes. The framework developed for mapping the topology of neurons, using Self-Organizing Map (SOM) neural network, is applied to the recording signals of the experiment entitled Culture 371 of dissociated neuronal cells, carried out at the Laboratory of Neuroengineering and Bionanotechnology at the University of Genoa, Italy. To validate the procedure, a topological map obtained as result of this thesis is compared with a microscopic image obtained on day 38 of maturation of Culture 371. Considering the majority number of MEA electrodes, the Chi-Square test resulted in confront of this validation. In addition, it is applied in the topological maps the classification the neurons observed around the microelectrodes using the analysis and separation of the registered spike waveforms.

Keywords: MultiElectrode Array, neurocomputation, spike, burst, classification.

ÍNDICE DE SIGLAS

BMU – *Best Math Unity*

DIV – *Dias In Vitro*

IA – *Inteligência Artificial*

ICA – *Independent Component Analysis*

KNIES – *Kohonen Network Incorporating Explicit Statistics*

MEA – *Multielectrode Array ou Microelectrode Array (Matriz de Microeletrodos)*

PCA – *Principal Component Analysis*

RNA – *Rede Neural Artificial*

SNC – *Sistema Nervosos Central*

SOM – *Self-Organizing Map*

LISTA DE FIGURAS

3.1	Ilustração de um Neurônio Biológico.	39
3.2	Potencial de Membrana em Função do Tempo.	41
3.3	Micrografia de um Microeletrodo de MEA. Fonte: (PINE, 1980).	42
3.4	MEA de 60 canais: (a) MEA, Fonte: Potter, Wagenaar e DeMarse (2006), (b) imagem da região central ampliada.	43
3.5	O tecido cerebral disposto sobre o substrato de vidro aderido à superfície sobre os eletrodos planares usado tanto para estímulo quanto para registro das atividades eletrofisiológicas. Figura adaptada do artigo de (RUTTEN et al., 2001).	44
3.6	Configuração básica para experimentos utilizando sistema MEA com 60 canais.	45
3.7	Sinal eletrofisiológico de 10.000 ms e a linha de limiar destacada.	46
3.8	(a) Amostra de um sinal registrado pela MEA; (b) <i>spikes</i> detectados; (c) identificação de bursts; (d) Intervalo entre <i>spikes</i> e (e) Intervalo entre <i>bursts</i>	47
3.9	Imageamento 3D por seccionamento óptico.	48
3.10	A) Representação da imagem original (1), com normalização do histograma (2), e com equalização do histograma. B) Respectiveos histogramas. Adaptado de Mary (2015).	50
3.11	Rede <i>Feedforward Multilayer Perceptron</i>	52
3.12	Modelo topológico do mapa de Kohonen - Adaptado de Bassani e Araújo (2012).	55
3.13	Ajuste dos pesos da vizinhança do BMU e aproximação dos neurônios. Em (A) pode-se notar a projeção do efeito da função de vizinhança, em (B) o efeito da adaptação dos neurônios em relação a suas distâncias do neurônio vencedor. O neurônio BMU recebe a maior taxa de adaptação - Fonte Zuchini et al. (2003).	57
3.14	Inicialização linear do vetor de pesos dos neurônios - Fonte Zuchini et al. (2003).	58

3.15	Diferentes formatos para arranjos SOM.	60
3.16	Curvas de respostas dos filtros Butterworth, Chebyshev, Bessel e Elíptico. . . .	61
3.17	Fluxograma da seleção de atributos pelo método da filtragem.	64
3.18	Fluxograma da seleção de atributos pelo método da Wrapper.	65
4.1	Ilustração de todo o processo para quantificar, estimar e classificar os neurônios ao redor dos microeletrodos através dos registros de atividades espontâneas. . .	68
4.2	Registro fotográfico da Microscopia do DIV38 após a junção das seis imagens.	69
4.3	Resultado do processamento para determinar as posições dos neurônios e dos microeletrodos do registro fotográfico do DIV38.	70
4.4	Espectro de amplitude da resposta de um filtro Butterworth.	71
4.5	Amostra do sinal original sem filtro (azul) e sinal filtrado com filtro passa-banda Butterworth (vermelho) do microeletrodo 44 do DIV25.	72
4.6	Diagrama de classes do <i>framework</i> para o pós-processamento dos sinais eletro- fisiológicos registrados em MEA.	72
4.7	Diagrama de sequência de uma requisição de identificação de <i>spikes</i>	74
4.8	Interface de usuário para seleção da cultura e DIV na qual se deseja analisar. Aqui é possível selecionar as culturas pré-carregadas ou importar novos dados de outras culturas no formato .mat.	74
4.9	Configurações gerais da aplicação onde é possível especificar método de detecção dos spikes, limiar e número de <i>spikes</i> que foram um <i>burst</i>	75
4.10	Interface para visualização e identificação dos <i>spikes</i> em cada microeletrodo. É possível importar e gravar a identificação em arquivo, no formato txt, csv e mat.	75
4.11	Visualização dos dados da cultura selecionada. É possível escolher dados antes da filtragem, pós filtragem e plot com as marcações dos <i>spikes</i> com ou sem agrupamento por forma de onda.	76

4.12	Interface onde toda a configuração da estimativa de neurônios é inserida. Existem três grupos de configuração: a) dados da cultura – seleção da cultura e DIV que se deseja estimar, é possível especificar intervalo por minutos. b) configuração da estimativa – taxa de aproximação e largura efetiva da vizinhança. c) configurações de visualização – tamanho e cor dos neurônios virtuais, exibir os neurônios e identificação.	77
4.13	Comparação entre o método convencional e o proposto por Quiroga para identificar <i>spikes</i>	78
4.14	Sinal do canal 12 da Cultura 371 do DIV39, em (A) pode-se observar o sinal sem a utilização do filtro e com limiar definido em 5x o desvio padrão. Em (B) o sinal está filtrado com banda de passagem e limiar baseado na mediana. . . .	79
4.15	Ilustração do redimensionamento da matriz de atributos e codificação para a entrada na rede neural SOM.	81
4.16	Método para estimar a densidade populacional dos neurônios virtuais sobre os microeletrodos na MEA.	83
4.17	Processo de identificação da BMU (A), calcular o número de neurônios e direção para a BMU (B), calcular a distância euclidiana (C) e Aproximar os neurônios que se encontram dentro da vizinhança efetiva (D).	85
4.18	Janela de 2 ms de um spike no registro filtrado da cultura 371, DIV 39.	86
4.19	Resultado do algoritmo da análise das componentes principais para as amostras extraídas na identificação dos <i>spikes</i>	87
4.20	Funcionamento do algoritmo ICA. N fontes desconhecidos são misturados linearmente por um processo desconhecido. Após o processamento do algoritmo, as N misturas são transformadas em N sinais independentes.	88
4.21	Análise de consistência utilizando o método Elbow.	89
4.22	Três formas de ondas de <i>spikes</i> classificadas com K-Means. Figura adaptada de Lewicki.	90
4.23	À esquerda o fluxograma do reconhecimento do número de neurônios baseado na forma de ondas identificadas em cada microeletrodo. À direita imagens ilustrativas referentes a cada etapa do processo.	91
4.24	Classificação dos neurônios estimados	92

5.1	Neurônios virtuais estimados após 10.000 iterações utilizando dados de testes dos registros do DIV25: a) distribuição inicial; b) distribuição após 20%, c) distribuição após 40%, d) distribuição após 60%, e) distribuição após 80% e f) distribuição final.	95
5.2	Mapa dos neurônios virtuais - DIV29.	95
5.3	Mapa dos neurônios virtuais - DIV32.	95
5.4	Mapa dos neurônios virtuais - DIV36.	96
5.5	Mapa dos neurônios virtuais - DIV39.	96
5.6	Mapa dos neurônios virtuais - DIV43.	96
5.7	Mapa dos neurônios virtuais - DIV46.	96
5.8	Matrix-U do DIV25.	97
5.9	Matrix-U do DIV29.	97
5.10	Matrix-U do DIV32.	97
5.11	Matrix-U do DIV36.	97
5.12	Matrix-U do DIV39.	98
5.13	Matrix-U do DIV43.	98
5.14	Matrix-U do DIV46.	98
5.15	Processamento do sinal registrado pelo eletrodo 24 do DIV25 da Cultura 371.	99
5.16	Processamento do sinal registrado pelo eletrodo 65 do DIV32 da Cultura 371.	100
5.17	Processamento do sinal registrado pelo eletrodo 85 do DIV39 da Cultura 371.	100
5.18	Processamento do sinal registrado pelo eletrodo 41 do DIV46 da Cultura 371.	101
5.19	Mapa Topográfico Classificado - DIV25.	103
5.20	Mapa Topográfico Classificado - DIV29.	103
5.21	Mapa Topográfico Classificado - DIV32.	103
5.22	Mapa Topográfico Classificado - DIV39.	103
5.23	Mapa Topográfico Classificado - DIV43.	104
5.24	Mapa Topográfico Classificado - DIV46.	104

5.25	Evolução da quantidade de neurônios estimados durante o período de observação da Cultura 371.	104
5.26	Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV25 da Cultura 371.	105
5.27	Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV29 da Cultura 371.	105
5.28	Relação dos neurônios virtuais estimados no DI32 da Cultura 371.	106
5.29	Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV36 da Cultura 371.	106
5.30	Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV39 da Cultura 371.	106
5.31	Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV43 da Cultura 371.	106
5.32	Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV46 da Cultura 371.	106
5.33	Mapa topográfico do DIV38.	107
5.34	Mapa topográfico do DIV39.	107
5.35	Histograma dos neurônios reais do DIV38 da Cultura 371.	108
5.36	Histograma dos neurônios virtuais estimados no DIV39 da Cultura 371.	108
5.37	Relação da quantidade de neurônios estimados pela proposta desta tese no DIV39 com os neurônios reais do DIV38 da Cultura 371.	108

LISTA DE TABELAS

2.1	Resumo das pesquisas usando matriz de microeletrodos.	33
5.1	Classificação dos neurônios no DIV25	102
A.1	Classificação dos neurônios no DIV25	122
A.2	Classificação dos neurônios no DIV29	123
A.3	Classificação dos neurônios no DIV32	124
A.4	Classificação dos neurônios no DIV36	125
A.5	Classificação dos neurônios no DIV39	126
A.6	Classificação dos neurônios no DIV43	127
A.7	Classificação dos neurônios no DIV46	128

SUMÁRIO

ÍNDICE DE SIGLAS

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	20
1.1 Justificativa e Motivação	21
1.2 Objetivos	22
1.2.1 Objetivo Geral	22
1.2.2 Objetivos Específicos	23
1.2.3 Hipóteses	23
1.3 Principais Contribuições	24
1.4 Organização do Trabalho	24
CAPÍTULO 2 – PESQUISAS RELACIONADAS AO TEMA	25
2.1 Pesquisa Bibliográfica sobre Matriz de Multieletrodos até 2009	25
2.2 Pesquisa Bibliográfica dos Trabalhos a partir de 2010	30
2.3 Síntese de Revisão Bibliográfica	33
2.4 Considerações Finais	37
CAPÍTULO 3 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	38
3.1 Células Neurais	38
3.1.1 Potencial de Ação	39
3.2 Matriz de Microeletrodos (MEA) para Registro de Sinais Eletrofisiológicos	41

3.2.1	Estímulo e Gravação de Dados	43
3.2.2	Definição, Quantificação e Detecção de <i>Spikes</i>	45
3.2.3	Definição, Quantificação e Detecção de <i>Bursts</i>	47
3.3	Imageamento óptico das células cultivadas <i>in-vitro</i>	48
3.3.1	Microscopia Confocal de Fluorescência	48
3.3.2	Processamento das Imagens de Microscopia	49
3.4	Redes Neurais Artificiais	50
3.4.1	Métodos de Aprendizagem/Treinamento	52
3.4.1.1	Paradigmas de Aprendizado/Treinamento	53
3.4.2	Redes Auto Organizáveis (<i>Self-Organizing Map - SOM</i>)	54
3.4.3	Treinamento do algoritmo SOM	57
3.4.4	Interpretação do mapa produzido pelo SOM	59
3.4.4.1	Arranjos Unidimensionais	59
3.4.4.2	Arranjos Bidimensionais, Cilíndricos e Toroidais	59
3.5	Técnicas de Filtragem	60
3.5.1	Filtragem Digital	62
3.5.1.1	Filtros IIR	62
3.5.1.2	Filtros FIR	62
3.6	Técnicas para redução de dimensionalidade dos dados e atributos	63
3.6.1	Técnicas de Seleção	63
3.6.1.1	Seleção de atributos por Filtragem	63
3.6.1.2	Seleção de atributos por Wrapper	64
3.6.2	Técnicas de Transformação	64
3.7	Considerações Finais	65

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS **66**

4.1	Estrutura do Sistema Desenvolvido	66
-----	---	----

4.2	Base de Dados: Cultura de Neurônios <i>in vitro</i> Utilizada	67
4.2.1	Identificação dos microeletrodos na MEA	70
4.2.2	Filtragem dos Sinais	71
4.3	<i>Framework</i> : Estrutura do Software para Análise de Sinais	71
4.3.1	Padrões de Desenvolvimento	72
4.3.2	Interfaces Gráficas	74
4.4	Deteccão de <i>Spikes</i> e Mapeamento Topológico dos Neurônios Virtuais	77
4.4.1	Identificação de <i>Spikes</i>	77
4.4.2	Codificação dos <i>Spikes</i> para Redução de Dimensionalidade dos Dados de Entrada	80
4.4.3	Mapeamento para a obtenção dos neurônios virtuais usando SOM	81
4.5	Agrupamento dos <i>Spikes</i>	85
4.5.1	Extração do formato de onda dos <i>spikes</i>	86
4.5.2	Algoritmo K-Means no agrupamento dos <i>Spikes</i>	88
4.5.3	Alinhamento e classificação dos <i>spikes</i>	90
4.6	Considerações Finais	92
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E VALIDAÇÃO		93
5.1	Experimentos e Resultados do Mapeamento dos Neurônios da Cultura 371	93
5.1.1	Matriz de Proximidades Unificadas (MATRIZ-U)	97
5.2	Identificação dos tipos de <i>spikes</i> e classificação	99
5.3	Visualização topológica dos neurônios em função dos <i>spikes</i> classificados	103
5.4	Análise Quantitativa e Evolução da Cultura 371 em Função dos neurônios virtuais	105
5.5	Validação dos Resultados	107
5.6	Teste de Hipótese do Qui-Quadrado	109
5.7	Considerações Finais	109
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS		110

6.1	Publicações geradas durante as pesquisas	111
	REFERÊNCIAS	112
	APÊNDICE A – TABELAS DAS MEDIDAS QUANTITATIVAS DOS DIV’S 25, 29, 32, 36, 43 E 46	121

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O registro de sinais das atividades neurais tem sido muito utilizado em pesquisas neurológicas, e a análise desses sinais é de grande relevância para a neurociência (ADELMAN, 2010). Os conceitos físico-químicos constituem a base para a compreensão dos processos eletrofisiológicos decorrentes do corpo humano ou de animais. São exemplos de registros de processos eletrofisiológicos, o eletroencefalograma (EEG), eletromiografia (EMG), eletrocardiograma (ECG), eletroneurografia (ENoG), entre outros. Tais sinais são provenientes da propagação de potenciais de ação, que representam o disparo de uma célula neuronal. Nesse contexto, os registros de sinais *in vivo* são realizados através de eletrodos externos fixados sobre a pele, por exemplo, ou internamente diretamente sobre um órgão. Por outro lado, existem outros tipos de registros, em que as atividades físico-químicas são estudadas sobre um conjunto de células separadas do corpo, denominados registros *in vitro*, em que fatias de tecidos ou cultura celular são postos sobre um dispositivo específico, como por exemplo a Matriz de Multieletrodos ou Microeletrodos (em inglês, *Multielectrode Array* ou *Microelectrode Array*, MEA), que consiste em uma placa que contém microeletrodos dispostos na forma matricial conectados diretamente à cultura (HAI; SHAPPIR; SPIRA, 2010).

A busca da compreensão dos sinais eletrofisiológicos de culturas de células neuronais vem gerando uma série de estudos científicos. Podem-se citar alguns deles como os estudos de padrões de comunicações elétricas do cérebro, tais como de transmissão dos impulsos nervosos através dos neurônios; a simulação de sinais neuronais em culturas de células *in vitro* em MEA e o mapeamento dos neurônios em regiões onde ocorreram os sinais com maior intensidade.

Os registros de sinais eletrofisiológicos em MEA têm sido largamente utilizados para capturar sinais das atividades espontâneas dos neurônios cultivados *in vitro* (BARRETO; FAMBRINI; SAITO, 2015; JONES et al., 2015; GROSS et al., 1995). Além disso, resultados interessantes foram obtidos com a análise de respostas de células neurais que foram aplicadas em

procedimentos ligados à reabilitação (DALY; WOLPAW, 2008). Todavia, as barreiras impostas pela complexidade associada ao cérebro vêm sendo derrubadas pelos esforços dos pesquisadores que estabeleceram novos pontos de vista, especialmente sobre patologias do sistema nervoso (LOUIS et al., 2016).

O estudo da dinâmica das atividades neurais provenientes dos sinais nervosos tem contribuído muito pelo aparecimento de novos modelos de sistemas inteligentes, baseados em análise comportamental do cérebro, mais especificamente dos neurônios. Sendo assim, a ciência médica vem trabalhando em conjunto com a engenharia eletrônica, computação e as ciências exatas, possibilitando pesquisas no contexto tecnológico, desenvolvendo Redes Neurais Artificiais (RNA) que modelam atividades superiores como a memória e cognição. RNAs são modelos computacionais inspirados no sistema nervoso dos seres vivos (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2010).

Durante o século XX e início do século XXI, apareceram diversas técnicas capazes de tornar possível a compreensão do Sistema Nervoso Central (SNC), contribuindo para o estudo de atividades motoras e sensitivas, ou ainda efeito de uma patologia (HOLLAND, 2003). Sabe-se que o SNC recebe milhões de informações de diferentes nervos e a partir daí o corpo responde ao estímulo recebido em função da resposta do SNC (GUYTON; HALL; GUYTON, 2006). A utilização da MEA como dispositivo para registro, com ou sem estímulos elétricos ou químicos, em culturas de células tem se tornado uma técnica bastante promissora e importante para a compreensão da dinâmica da rede de neurônios e suas reações à administração de fármacos. A análise dos sinais obtidos com os dispositivos MEA desempenha um papel importante para o estudo e evolução da neurociência, pois permite uma análise não invasiva e multilocal de uma rede de neurônios. As experimentações com a captura de sinais de neurônios *in-vivo* leva uma desvantagem em comparação com às observações de neurônios *in-vitro*, visto que estas apresentam desenvolvimento das conexões sinápticas mesmo após a dissociação, em outras palavras, as conexões continuam evoluindo no sentido de apresentar uma rica variedade de sinais eletrofisiológicos. Ademais, há uma grande vantagem associada aos estudos utilizando culturas *in-vitro*, já que são mais acessíveis ao imageamento por microscopia e admissão de fármacos para análise de resposta (POTTER; DEMARSE, 2001; NELSON et al., 2006).

1.1 Justificativa e Motivação

Analisar os sinais de cultura de neurônios dissociados em MEA demanda cuidados bem específicos no manuseio, para a preservação da vida da cultura, tais como, controle de tempera-

tura, do pH, umidade, entre outras. Além disso, o registro dos sinais eletrofisiológicos *in vitro*, apresenta limitações inerentes aos equipamentos envolvidos. Apesar disso, essa técnica é muito utilizada para a investigação extracelular de sinais neurológicos. Adicionalmente, exige-se um aparato maior, quando se deseja obter um registro fotográfico das culturas de neurônios *in vitro*, que são geralmente realizados por microscópicos durante a fase de observação dos sinais. Por essa razão não é comum o uso da microscopia durante essa fase. O aparecimento de novos modelos para o estudo dos sinais neurais tem crescido com a utilização da MEA, para a compreensão dos princípios da organização e dinâmica das redes neurais. A contribuição para o aparecimento de novos modelos matemáticos baseados na representação formal das funções do cérebro, mais especificamente, dos neurônios e redes neurais, e ferramentas que contribuam no desenvolvimento de novas tecnologias para a neurociência é uma das maiores motivações para pesquisas nessa área.

Com isso temos como a principal motivação deste trabalho o entendimento de como funciona a formação da rede de neurônios e seu comportamento no sistema nervoso biológico.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Nesta tese propusemos um método para a quantificação e visualização topológica dos neurônios sobre a MEA baseado nas características intrínsecas dos *spikes*, tendo em vista o registro de sinais eletrofisiológicos reais obtidos em laboratório. A visualização topológica dos neurônios sobre a MEA é normalmente obtida por um microscópio e as imagens são processadas para que seja possível a identificação dos neurônios sobre a MEA. Geralmente esse registro é realizado em um dia específico durante o processo de observação ou maturação da cultura. Embora o registro fotográfico por microscopia seja um método frequentemente adotado, ela apresenta alguns problemas, durante o registro, como interferências, degradação da cultura, entre outros. Além disso, o processo de identificação dos neurônios usando esses registros fotográficos não permite a classificação desses neurônios quanto ao tipo de sinais gerados. Diante disso é proposto um mapeamento topológico dos neurônios usando a rede auto organizável (*Self-Organizing Map - SOM*) proposta por Kohonen (KOHONEN, 1990). Adicionalmente um método para classificar os neurônios mapeados é desenvolvido. E finalmente os resultados são validados por uma imagem microscópica obtida durante o período de registro de uma cultura de neurônios utilizada nos experimentos.

O principal objetivo da tese é de caracterizar a morfologia das redes neurais cultivadas *in*

in vitro em MEA, quantificando as suas atividades eletrofisiológicas. Para isso é utilizado um modelo de técnica de mapeamento conhecido como Mapa Auto-Organizável (*Self-Organising Map - SOM*). Para completar essa caracterização é desenvolvido um procedimento para agrupamento dos neurônios virtuais mapeados.

1.2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos pode-se destacar:

- i) desenvolvimento de uma método para mapear neurônios virtuais em uma espaço bidimensional compatível com uma MEA, a partir de suas atividades eletrofisiológicas medidas em laboratório, quantificando o número de *spikes* (pulsos identificados nos registros de sinais neurais quando ultrapassam um determinado limiar) observados;
- ii) desenvolver um método para classificação dos tipos de neurônios similares encontrados em cada microeletrodo, a partir da análise dos sinais eletrofisiológicos registrados;
- iii) criar um *framework* para análise dos sinais, além de disponibilizar ferramentas de visualização específicas para os recursos propostos nesta tese.

1.2.3 Hipóteses

O estudo da disposição dos neurônios cultivados *in vitro* em MEA é de suma importância para entender a organização das células e classificar os neurônios presentes na cultura. Para isso, é conveniente realizar durante o registro dos sinais, o imageamento das células por microscopia, no entanto nem sempre isso é possível. Sendo assim este estudo investiga as seguintes hipóteses:

1. É possível considerar os sinais eletrofisiológicos dos neurônios durante todo o período de gravação do experimento 371, capturados pelos microeletrodos da MEA, para estimar a quantidade de neurônios ao redor dos microeletrodos;
2. Ao usar a rede neural auto-organizável de Kohonen, aplicando nas suas entradas pulsos proporcionais aos *spikes* detectados nos sinais eletrofisiológicos, é possível obter mapas da distribuição espacial dos neurônios na MEA, semelhantes aos obtidos por imageamento microscópico;
3. É possível classificar os neurônios estimados através da análise morfológica dos *spikes* detectados nos respectivos eletrodos. Isso mostra o tipo de neurônios encontrados nas regiões dos eletrodos.

1.3 Principais Contribuições

Pode-se descrever como uma contribuição, o desenvolvimento de um método para visualizar topologicamente a estimativa da distribuição dos neurônios em uma cultura *in vitro*, a partir das atividades neuronais, representadas pelos seus *spikes* ou *bursts*, uma forma de distribuição espacial dos neurônios ao longo da matriz MEA.

Sendo assim, esta tese traz três principais contribuições:

1. Desenvolvimento de uma visualização bidimensional de um método para estimar a topologia dos neurônios quando se tem apenas os sinais eletrofisiológicos registrados de MEAs;
2. Desenvolvimento de uma técnica para classificação dos neurônios virtuais presentes na visualização do item (1); e
3. Desenvolvimento de uma estrutura de Software flexível que possibilite acrescentar ferramentas de análise de dados coletados em culturas de neurônios *in vitro*.

1.4 Organização do Trabalho

Um dos principais meios para alcançar os objetivos desta tese foram as pesquisas em artigos científicos que, estão dispostos no Capítulo 2. Assim, o texto prossegue apresentando os principais artigos que abordam o tema desta tese. Além disso, para facilitar a leitura, no final do Capítulo 2 está um quadro resumo dos artigos apresentados.

Os principais fundamentos teóricos para o desenvolvimento desta tese estão dispostos no Capítulo 3, desde os modelos históricos até as técnicas mais recentes em relação ao uso de dados registrados por matrizes de microeletrodos. Esses métodos são descritos de forma bem direta, apresentando suas principais características, bem como suas limitações.

No Capítulo 4, são descritos os métodos propostos e desenvolvidos e, no Capítulo 5 são apresentados os resultados, análise e validação da proposta da tese. Por fim, no Capítulo 6 são apresentadas as conclusões.

No apêndice I são mostradas as tabelas com as classificações dos neurônios, neurônios estimados e o número de *spikes*.

Capítulo 2

PESQUISAS RELACIONADAS AO TEMA

Este capítulo apresenta as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento desta tese. É possível notar que a neurociência está em constante desenvolvimento e, por mais que seja uma linha de pesquisa bastante explorada é possível perceber o quanto ainda necessita de investigação. No início do capítulo, na Seção 2.1, são apresentados artigos pertinentes ao tema de registros de sinais neurais cultivados in vitro, até 2009. São apresentados posteriormente, na Seção 2.2 os trabalhos relativos a partir de 2010, sobre ambientes MEA. E por fim, uma tabela com o resumo de todos os artigos mencionados, seguido pelas considerações finais, são apresentados nas Seções 2.3 e 2.4.

2.1 Pesquisa Bibliográfica sobre Matriz de Multieletrodos até 2009

MEA foi inicialmente proposto por Thomas et al. em 1972, como um dispositivo de uma matriz de 30 microeletrodos de ouro com platina negra, sobre o substrato de vidro passivados por *photoresist* com intuito de reduzir a impedância com o meio de cultura e reduzir o ruído produzido na medição. Os eletrodos eram dispostos em duas linhas de 50 μm , e a distância entre os eletrodos em cada linha, de 100 μm . Cada eletrodo se estreitava em passos sucessivos até as bordas, contendo 7 μm do centro da lâmina (THOMAS et al., 1972). As células utilizadas foram culturas de cardiomiócitos de galinha. Nas primeiras tentativas ele usou células de neurônio do gânglio da raiz dorsal (DRG) de pintinhos, porém sem sucesso. O motivo dado ao insucesso do registro das atividades está associado à presença de uma camada glial ao redor dos neurônios atuando como isolante para os eletrodos da MEA dificultando a propagação do sinal elétrico.

Em 1980 foi publicado por Jerome Pine o seu trabalho de registro de sinais extracelulares de um grande número de células em uma MEA de 32 microeletrodos. Para testar a matriz

de microeletrodos, células dissociadas dos gânglios superiores dorsais de ratos recém-nascidos foram utilizadas no experimento, num período de três semanas. Durante esse tempo, pôde-se observar a formação das interconexões. Essas células foram crescidas sobre um substrato de colágeno fibroso medindo de 3-5 μm de espessura (PINE, 1980).

Um trabalho foi desenvolvido por volta de 1981 por Jobling, Smith e Wheal que construíram uma MEA de 9 eletrodos, de portas de transistores, transistores de efeito de campo (FET - *Field Effect Transistor*). Eles demonstraram uma boa relação da taxa sinal-ruído enquanto estimulavam a fatia com um eletrodo convencional. Vários trabalhos baseados em MEA-FET foram desenvolvidos (WHITSON et al., 2006).

Uma outra abordagem de construção de dispositivos de registro de atividades elétricas em neurônios foi proposta por Guenter Gross, em meados da década de 1970, criando uma MEA com 36 eletrodos de ouro, separados a 100 - 200 μm , isolado com um polímero *thermosetting* de aproximadamente 10 μm de diâmetro. No experimento utilizou-se gânglios de caramujos, que, com sucesso, registrou potenciais de ação de 3mV. Seguindo seu trabalho anterior, Gross observou sinais de células dissociadas da medula espinhal em 1982, e sinais de atividades espontâneas foram obtidos, que mostraram ser dependentes de uma temperatura de aproximadamente 30°C. *Bursts* periódicos e aperiódicos foram vistos, e posteriormente estudados com detalhes nos experimentos (DROGE et al., 1986).

Em 1986, Wheeler e Novac desenvolveram MEAs passivas utilizando 32 microeletrodos com 20 μm de diâmetro e 200 μm de espaçamento sem transistores. O objetivo do trabalho era registrar atividades de fatia do hipocampo analisando a densidade das correntes de potenciais de campo. Este foi o trabalho pioneiro na utilização de MEA no uso de estudos das reações a fármacos (WHEELER; NOVAK, 1986). Anos mais tarde, em 1989, Meister et al. utilizaram o sistema MEA para investigar sinais de uma cultura de retina de salamandra. Eles observaram a cultura por várias horas, estimulando-a com padrões luminosos de uma tela (Tubos de Raios Catódicos - CRT), conseguiram obter uma ampla faixa de sinais extracelulares, e relataram que os experimentos só foram possíveis pela baixa condutividade do tecido. Continuando os trabalhos utilizando sinais de retina, Meister et al. mostraram que um conjunto de até sete gânglios apresentavam disparos síncronos e que, mais da metade dos *spikes* era produzida por aquelas células (MEISTER; PINE; BAYLOR, 1994).

Durante anos, vários trabalhos foram sendo desenvolvidos com o intuito de melhorar o *biochip* MEA, e em 1995, no Japão, nascia a primeira MEA japonesa de 64 eletrodos para o registro de culturas dissociadas. O trabalho foi liderado por Taketani e Kawana nos laboratórios NTT e Matsushita. A cultura era mantida viva por semanas por um dispositivo desenvolvido

por eles para que pudessem ser observadas ao longo do tempo (SOUSSOU et al., 2006).

MEA tem sido amplamente usada em aplicações farmacológicas (CHIAPPALONE et al., 2003), medição eletrofisiológica (RIEKE, 1999) em outras áreas (HAMPSON; SIMERAL; DEADWYLER, 1999), embora seu modelo inicial fosse bastante limitado, e seu uso estivesse principalmente voltado para estimulação extracelular e monitoração de atividades elétricas tanto para células eletrogênicas, quanto para fatias de tecidos e culturas (RIEKE, 1999; LOEB; LEVINE; HE, 1990). A MEA tem sido útil em neurociência, para registro de *spikes* de fatias cerebrais (HAMPSON; SIMERAL; DEADWYLER, 1999), culturas neuronais dissociadas (EYTAN; MAROM, 2006), retinas (TORBORG; FELLER, 2005) e cardiomiócitos (FRIEDMAN, 2002). Registrar potenciais de ação de células de forma extracelular não invasiva por período de tempo de várias semanas tem sido a sua maior vantagem em relação aos métodos de captura de sinais intracelular, além da possibilidade de injeção de sinais de estímulo pelos eletrodos (WAGENAAR et al., 2005; FRIEDMAN, 2002).

Em 2003, Chiappalone et al. utilizaram uma MEA de 60 canais para o estudo de fármacos (CHIAPPALONE et al., 2003), e mencionaram que a utilização de células da medula espinhal é uma grande candidata para a investigação do comportamento, interação entre os neurônios e reação a diferentes drogas ministradas em períodos diferentes, e justifica a vantagem da utilização da matriz de microeletrodos em dois principais pontos: (1) é um dispositivo não invasivo e (2) permite a gravação de atividades espontâneas por um longo período. As células utilizadas foram obtidas da coluna espinhal de pintinhos entre os dias 7 e 8 de cultura, e os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos escritos por Dichter e Fischbach 1977.

Muitos trabalhos têm sido explorados acerca do tema MEA. Jimbo em seu trabalho descobriu que na dinâmica de culturas corticais de alta densidade, um único estímulo pode produzir uma sequência de pulsos em um curto intervalo de tempo (*bursts*) (JIMBO et al., 2000). Ainda na sequência dessa temática, um outro trabalho explorou que grupos de até 7 células ganglionares disparam de forma síncrona, e estes grupos geralmente são responsáveis por 50% ou mais dessa sequência de pulsos (*spikes*) da retina (SCHNITZER; MEISTER, 2003).

Jimbo et al.(2003) descreveram sobre estimulação em múltiplas posições programáveis em sistemas MEA produzindo uma interferência mínima durante o registro simultâneo extracelular. Os estímulos são realizados por módulos de circuitos de interface onde os amplificadores e dispositivos de comutação de estado sólido são integrados. Com este processo é possível a flexível seleção de locais na MEA para estímulo e troca em apenas 1,2 segundos permitindo o monitoramento quase contínuo dos sinais eletrofisiológicos sob os microeletrodos de registro e

estímulo. Adicionalmente o sistema é usado para visualizar padrões de propagação espacial em redes cultivadas de neurônios corticais (JIMBO et al., 2003).

Wagenaar, Pine e Potter(2004) descreveram sobre os parâmetros efetivos para estimulação de culturas dissociadas usando MEAs. Afirmam que é possível melhorar a eficiência usando uma variedade de formas de pulso sob controle de tensão e corrente determinando intervalo de tempo ótimo para evitar danos através da eletroquímica. Concluem que impulsos controlados por voltagem bifásica são mais efetivos e é mais vantajoso do que qualquer uma grande variedade de cenários de estimulação estendendo até a experimentos *in vivo* (WAGENAAR; PINE; POTTER, 2004).

Chiappalone et al. também investigaram os padrões de atividades durante a fase de maturação da rede por semanas. Eles mediram a taxa de *spikes* e *bursts* em diferentes fases da cultura, além disso, investigaram a influência da duração dos *spikes* no comportamento da rede, computando a correlação cruzada no trem de *spikes* (CHIAPPALONE et al., 2006).

No trabalho de Jimbo et al. em *Frontiers of Biochips Technology* (JIMBO et al., 2006), é descrito sobre sistema de registro de *spikes* baseados em neurônios cultivados em MEA, destacando as vantagens técnicas e alguns exemplos de registros de neurônios corticais são mostrados. Destaca-se que as características das respostas evocadas podem ser modificadas por estimulação elétrica sucessiva por eletrodos. São mostrados os potenciais de ação que são propagados espacialmente num único neurônio, baseados numa alta resolução temporal do sistema, além de uma combinação de registro com imageamento com fluorescência.

Usando células dissociadas de ratos ao longo de 60 dias Berdondini et al. (2006) propuseram uma nova estratégia para estudar a dinâmica da rede neuronal cultivada *in vitro* de neurônios corticais dividindo-os em *clusters* comunicantes, assim preservando um alto grau de conectividade nas sub-populações observadas. Nos experimentos, eles utilizam um MEA de 60 canais, e uma estrutura de agrupamento que consistiu de cinco câmaras de 3 mm de diâmetro interligadas aos microeletrodos. Os resultados apresentados foram bastante satisfatórios e observaram a capacidade de ativar seletivamente regiões específicas da rede e a dinâmica das sub-populações altamente conectadas.

Wagenaar, Pine e Potter descreveram sobre um repertório extremamente rico de padrões de *bursts* durante o desenvolvimento de registro de culturas corticais de 30 minutos de duração. Foi observado que as culturas dissociadas de células corticais exibiram um repertório muito mais rico no padrão de atividade, além disso enfatizam que o desenvolvimento evoluiu com a mudança dos padrões de *burst* durante a fase de observação (WAGENAAR; PINE; POTTER, 2006).

Corner (2008) descreve em seu trabalho sobre a ocorrência de *bursts* espontâneos como variáveis dependentes e/ou independentes na maturação do tecido de córtex cerebral cultivado *in vitro* por um longo período, e uma revisão sobre os estudos de sistemas vivos para o desenvolvimento de padrões bioelétricos gerados intrinsecamente na maturação das redes corticais.

Erickson et al. (2008) relataram sobre o desenvolvimento de um novo tipo de MEA, onde os neurônios são “enjaulados”, individualmente, permitindo uma investigação da conectividade da rede. Segundo os autores, as técnicas tradicionais de cultura de redes neuronais, tais como *patch clamp* e MEA, são limitadas devido: a um certo número de células identificadas que podem estar simultaneamente em contato eletricamente no tempo pelo qual as células podem ser estudadas; e a falta de especificidade de um neurônio a um eletrodo. O novo sistema proposto consistia de um arranjo de “jaulas” neurais que mecanicamente prendem os neurônios perto de eletrodos. Enquanto o corpo celular é preso, o axônio e os dendritos podem livremente crescerem ao longo da área em torno, para formar uma rede. O eletrodo é bidirecional, capaz de ambos: estimular e registrar os potenciais de ação. Esse sistema é não-invasivo, tal que todos os neurônios constituintes de uma rede possam ser estudadas por um tempo de vida com uma correspondência estável um a um de neurônio a eletrodo. Foram descritos experimentos para ilustrar um sistema de 16 “jaulas” em grade 4x4, com duração de várias semanas.

Pasquale et al. descreveram sobre a auto-organização de avalanches neuronais em neurônios corticais dissociados. Usando a teoria da criticalidade eles analisam eventos espontâneos de culturas dissociadas desde os primeiros dias até a fase de maturação. Eles afirmam que de acordo com a idade da cultura é notável um comportamento diferente (BAK; TANG; WIESENFELD, 1987). De modo mais específico, notou-se distribuições subcríticas de tamanhos e duração de avalanches. A variabilidade das avalanches neuronais é provada por parâmetros estatísticos que descrevem a atividade da rede. Na conclusão do trabalho confirmaram que as células preservaram a capacidade de auto-organização, sendo, a distribuição de características de avalanche crítica onde a sincronização da cultura é média entre *bursts* e baixa atividade de *spiking* aleatória (PASQUALE et al., 2008).

Berdondini et al. descreveram sobre registros extracelulares usando MEA de alta densidade e culturas corticais dissociadas. No estudo eles mostram nas simulações que é possível observar *spikes* duplicados em microeletrodos próximos onde a propagação é muito rápida gerando cerca de 60% de falsos positivos, porém esta condição não é compatível com condições experimentais típicas, ou seja, onde as culturas são densas mas não confluentes. Entretanto foi possível observar que as conexões locais são mais fortes em relação as conexões longas espalhadas sobre a rede, provando que o ganho detalhado é fornecido pela solução espacial (BERDONDINI et

al., 2009).

O trabalho de Davison et al. refere-se a um sistema desenvolvido em Python, PyNN, que consiste numa interface para simuladores de redes neuronais com intuito de reduzir as barreiras entre diferentes simuladores disponíveis no meio científico tais como: NEURON, NEST, PCSIM, Brian e o hardware neuromórfico Heidelberg VLSI. A API desenvolvida pode ser executada em qualquer simulador suportado e consequentemente aumentando a produtividade da modelagem da rede neural, fornecendo alto nível de abstração e uma facilidade na visualização e gerenciamento dos dados (DAVISON et al., 2009).

Marom et al. descreveram sobre um exemplo para os limites da engenharia reversa em neurociência, demonstrando que a aplicação da engenharia reversa para o estudo do princípio do funcionamento do sistema neural com um mecanismo conhecido, pode resultar numa indução perfeitamente válida mas indução errônea do princípio de funcionamento de uma rede neuronal. A equipe usou um modelo de brinquedo biológico, conhecido como Veículo de Braitenberg (Braitenberg, 1984), que é um robô equipado com olhos ultra-sônicos que transmitem as entradas para uma rede cultivada biologicamente de neurônios corticais, para que o robô fique em movimento constante, evitando se chocar com objetos ou paredes. O modelo é de tal forma que é levado em consideração apenas o tempo do olho transmitir o sinal para que o disparo de um primeiro neurônio ocorra, para permitir o distanciamento do obstáculo. Um neurofisiologista, no entanto, analisaria o disparo de todos os neurônios e faria um processamento conjunto da totalidade dos disparos, para alguma decisão a ser tomada pela rede (MAROM et al., 2009).

2.2 Pesquisa Bibliográfica dos Trabalhos a partir de 2010

O trabalho de Johnstone et al. refere-se a revisão sobre MEA para os iniciantes na tecnologia e para quem deseja se aprofundar no assunto. No estudo ele aborda vários aspectos inerentes a matriz de microeletrodos que são usadas intrinsecamente na observação de registros simultâneos dos potenciais de ação por um longo período, como uma plataforma de teste de neurotoxicidade do século 21 (JOHNSTONE et al., 2010).

Ito et al. publicaram um trabalho sobre a densidade mínima de neurônios para *bursts* sincronizados em uma cultura de neurônios corticais de ratos em MEA. Eles usaram cinco densidades de células (2500, 1000, 500, 250 e 100 células / mm^2) e notou-se que a longo prazo as culturas que exibiram *bursts* síncronos exigiam uma densidade de pelo menos 250 células/ mm^2 para o meio *Neuron Culture Medium* e 500 células/ mm^2 para o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM/soro). Também observaram por imunofluorescência que redes complexas exigia

a mesma densidade de células para *bursts* sincronizados. Concluíram que ao comparar os resultados do registro eletrofisiológico e observação imunocitoquímica que existe um limiar mínimo de densidade de neurônios para a observação de *bursts* síncronos (ITO et al., 2010).

Takeuchi et al. descreveram sobre um dispositivo MEA para fazer a co-cultura de neurônios e cardiomiócitos usando uma mini câmara com 2 compartimentos, 16 microeletrodos e 8 microcondutes. Os neurônios do gânglio cervical superior (SVG) foram semeados em um compartimento e os miócitos ventriculares (VM) no outro e, após três dias observaram uma relação entre eles através dos micro-condutores. Os neurônios SVG foram estimulados e respostas evocadas foram observadas em vários eletrodos. Por outro lado não se observou um aumento na taxa de batimento enquanto se administrava propranolol, um antagonista do receptor β -adrenérgico¹. Concluíram que o dispositivo de co-cultura pode ser utilizado para estudos de interações em nível de rede entre neurônios simpáticos e cardiomiócitos. (TAKEUCHI et al., 2011).

Frega et al. descreveram sobre culturas corticais em MEA, como uma nova abordagem para realizar testes de compostos neurotóxicos *in vitro*. São apresentados ambos: (a) resultado de aplicação após uma hora e (b) resultado após três dias, de transmissão de glutamato e NMDA e AMPA junto com *cyclothiazida-CTZ*. A conclusão foi de que modulação com baixa concentração de droga de transmissão sináptica excitatória é refletida em ativação eletrofisiológica da rede, enquanto que um excessivo uso de droga, resulta na extinção da atividade e eventualmente na morte celular (FREGA et al., 2012).

O trabalho de Einevoll et al. descreve sobre o registro de trem de *spikes* confiável de milhares de neurônios com a matriz de multieletrodos com intuito de contribuir numa melhor compreensão do cérebro humano objetivando a aplicação de próteses neurais. No estudo eles afirmam que algoritmos confiáveis, eficientes e validados são fundamentais na análise dos registros densos e classificação de trens de *spikes* (EINEVOLL et al., 2012).

Heim, Yvert e Kuhn descreveram sobre estratégias de nano-estruturação para melhorar o desempenho de uso de MEA para registro e estimulação de neurônios. Eles afirmam que diminuir o tamanho do microeletrodo em matrizes densas acarreta em um aumento significativo do ruído e baixa capacidade de injeção de carga, porém eles apresentam uma estratégia de nano-estruturação dos locais dos microeletrodos diminuindo a impedância entre os eletrodos. Os resultados são comparados com os microeletrodos convencionais e mostram que a proposta tem uma melhora significativa durante a gravação da atividade neuronal juntamente com uma maior eficiência nos estímulos induzidos (HEIM; YVERT; KUHN, 2012).

¹Receptor adrenérgico são fármacos específicos que atuam no sistema nervoso liberando o hormônio da adrenalina ou substância com ação semelhante.

Saito et al. descrevem uma proposta para simular as comunicações de neurônios em uma cultura *in vitro* baseada em MEA chamada Sim-MEA. Eles usam neurônios do modelo Izhi-keovich modificado levando em consideração as distâncias entre os neurônios com intuito de simular os eletrodos e seus sinais registrados (SAITO et al., 2013).

O trabalho de Koshimizu et al. refere-se à análise quantitativa de distribuição de terminais de axônios em neurônios de núcleo subtalâmico de ratos, usando visualização de um único neurônio com um vetor viral, uma ferramenta usada pelos biólogos para a introdução de materiais genéticos em células (KOSHIMIZU et al., 2013).

Odawara et al. publicaram um estudo sobre atividades eletrofisiológicas de longa duração e resposta de fármacos sobre uma co-cultura de neurônios do tronco cerebral e astrócitos de ratos com neurônios derivados de HiPSC (Célula tronco pluripotente humana induzida), do inglês (*Human induced pluripotent stem cell*). Foi observado em um longo período, mais de 3 meses, *bursts* síncronos devido a transmissão de sinapses dentro das redes neuronais. O estudo provou que o método seja viável para a triagem de drogas em células neuronais humanas (ODAWARA et al., 2014).

No trabalho de Mari et al. é descrito com detalhes procedimentos de visualização 2D e 3D e análise quantitativa de neurônios GRD (gânglios de raiz dorsal) de ratos Wistar, cultivados *in vitro* em MEA, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (MARI et al., 2015).

Maass mostra um estudo sobre a busca de princípios para a computação e aprendizagem cerebral em relação às restrições aos dados das atividades espontâneas registradas simultaneamente usando matriz de microeletrodos. Os modelos de computação neural e de plasticidade de rede subjacentes à percepção, cognição, comportamento e aprendizado apresentam limitações que são discutidas no trabalho. Atividade de rede recorrente inerente e propriedades dinâmicas heterogêneas de neurônios e sinapses, padrões estereotipados de atividade espaço-temporal em redes de neurônios, alta variabilidade de respostas de rede e estabilidade funcional são limitações abordadas no trabalho (MAASS, 2016).

A criticalidade auto-organizada é uma característica universal de sistemas neurais que produzem cascatas de atividades espontâneas tipicamente caracterizadas por distribuições de avalanches neurais. Yada et al. investigaram a variação do desenvolvimento de avalanches neuronais em neurônios corticais dissociados usando MEA de alta densidade. Eles observaram em uma fase de monitoração de 30 dias *in vitro* que enquanto as células eram imaturas elas apresentavam padrões de atividades espontâneas aleatórias. Os resultados mostram que a criticalidade auto-organizada emerge através do processo de integração que acompanha a avalanche

característica de grande escala e o processo de fragmentação associado a diversas avalanches de tamanho médio (YADA et al., 2017).

2.3 Síntese de Revisão Bibliográfica

Nota-se pelas pesquisas bibliográficas realizadas que o uso de MEA tem sido explorado ao longo do tempo, porém, muitos estudos ainda devem prosseguir. Na Tabela 2.1 é visto um resumo dessas pesquisas sobre MEA.

Tabela 2.1: Resumo das pesquisas usando matriz de microeletrodos.

Autor	Tema	Ano
Thomas et al.	Matriz de 30 microeletrodos de ouro com platina negra, sobre o substrato de vidro passivados ² por fotorresiste com intuito de reduzir a impedância. Os eletrodos eram dispostos em duas linhas de 50 μm , e a distância entre os eletrodos em cada linha, de 100 μm .	1972
Pine	Registro de sinais extracelulares de um grande número de células em uma MEA de 32 microeletrodos. Foram utilizadas células dissociadas da ganglia superior dorsal de ratos recém-nascidos.	1980
Jobling, Smith e Wheal	MEA de 9 eletrodos, de portas de transistores FET (<i>Field Effect Transistor</i>), transistores de efeito de campo com uma boa relação sinal-ruído.	1981
Droge et al.	Observaram sinais de células dissociadas da medula espinhal em 1982, e bons sinais de atividades espontâneas foram obtidos, que mostraram ser dependentes de uma temperatura de aproximadamente 30°C. <i>Bursts</i> periódicos e aperiódicos foram vistos.	1986
Wheeler e Novak	Atividades de fatia do hipocampo analisando a densidade das correntes de potenciais de campo. Primeiro trabalho a utilizar MEA no uso de estudos das reações a fármacos.	1986
Continua na próxima página...		

²Ação realizada para proteger a junção semicondutora do meio ambiente, principalmente contra impurezas, umidades e para manter a tensão suportada pelo componente o mais próximo do limite teórico de ruptura.

Tabela 2.1 – Continuação da página anterior

Autor	Tema	Ano
Meister, Pine e Baylor	Utilização do sistema MEA para investigar sinais de uma cultura de retina de salamandra estimulando-a com padrões luminosos de CRT (Tubos de Raios Catódicos)	1994
Rieke	Estimulação extracelular e monitoração de atividades elétricas tanto para células eletrogênicas, quanto para fatias de tecidos e culturas	1999
Chiappalone et al.	Interação entre os neurônios e reação a diferentes drogas ministradas em períodos diferentes, e justifica a vantagem da utilização da matriz de microeletrodos	2003
Schnitzer e Meister	Verificou que grupos de até 7 células ganglionares disparam de forma síncrona.	2003
Jimbo et al.	Estimulação em múltiplas posições programáveis MEA com baixa interferência onde módulos de circuitos de interface eram integrados aos amplificadores e dispositivos de comutação.	2003
Wagenaar, Pine e Potter	Melhoram a eficiência usando uma variedade de forma de pulso sob controle de tensão e corrente determinando intervalo de tempos ótimos para evitar danos através da eletroquímica.	2004
Soussou et al.	Desenvolvimento da MEA de 64 eletrodos para o registro de culturas dissociadas.	2004
Chiappalone et al.	Investigação da influência da duração dos <i>spikes</i> no comportamento da rede, computando a correlação cruzada no trem de <i>spikes</i> .	2006
Jimbo et al.	Características das respostas evocadas modificadas por estimulação elétrica sucessiva onde os potenciais de ação que são propagados espacialmente num único neurônio são evidenciados.	2006
Berdondini et al.	Divisão das células neuronais em <i>clusters</i> preservando um alto grau de conectividade nas sub-populações observadas. Utilizam um MEA de 60 canais interligadas através de microcanais de 800 μm de comprimento e 300 μm de largura.	2006
Continua na próxima página...		

Tabela 2.1 – Continuação da página anterior

Autor	Tema	Ano
Corner	<i>Bursts</i> espontâneos como variáveis dependentes e/ou independentes na maturação do tecido de córtex cerebral cultivado <i>in vitro</i> .	2008
Erickson et al.	Desenvolvimento de um novo tipo de MEA onde os neurônios são “enjaulados” individualmente permitindo uma investigação da conectividade da rede.	2008
Pasquale et al.	Auto-organização de avalanches neuronais em neurônios corticais dissociados. A variabilidade das avalanches neuronais é provada por parâmetros estatísticos que descrevem a atividade da rede.	2008
Berdondini et al.	Registros extracelulares usando, MEA de alta densidade onde observou <i>spikes</i> duplicados em microeletrodos próximos evidenciando conexões curtas e conexões longas.	2009
Davison et al.	Interface para simuladores de redes neurais compatíveis com outros simuladores disponíveis na literatura. A API desenvolvida fornece alto nível de abstração e facilidade de gerenciamento e visualização.	2009
Marom et al.	Uso da engenharia reversa em neurociência para o estudo do princípio do funcionamento do sistema neural de redes cultivadas biologicamente de neurônios corticais.	2009
Johnstone et al.	Realizam uma revisão da utilização e aplicações utilizando MEA em registros de potenciais de ação de longos períodos.	2010
Ito et al.	Densidade mínima para <i>bursts</i> síncronos de neurônios corticais. Na pesquisa foram utilizadas cinco densidades de revestimento e, foi observado que a ocorrência de <i>bursts</i> síncronos exigiam densidade de pelo menos 250 células/mm ² .	2010
Takeuchi et al.	Utilizam o dispositivo MEA para fazer co-cultura de neurônios usando mini câmeras de 2 compartimentos.	
Frega et al.	Observam o comportamento de compostos neurotóxicos <i>in vitro</i> , concluíram que a modulação com baixa concentração de droga é refletida em ativação eletrofisiológica.	2011
Continua na próxima página...		

Tabela 2.1 – Continuação da página anterior

Autor	Tema	Ano
Einevoll et al.	Para compreender melhor o comportamento do cérebro é utilizado registro de trem de <i>spikes</i> cujo intuito são aplicação de próteses neurais.	2012
Heim, Yvert e Kuhn	Propuseram estratégias de nano-estruturação para melhorar o desempenho da MEA diminuindo a impedância entre os eletrodos.	2012
Saito et al.	Simulação de eletrodos e sinais registrados usando um modelo baseado nos neurônios proposto por Izhikevic. No trabalho é detalhado o ambiente MEA para a simulação e os resultados são comparados com sinais reais.	2013
Koshimizu et al.	É observado em um único neurônio com um vetor viral uma análise quantitativa de distribuição de terminais de axônios de núcleo subtalâmico de ratos.	2013
Odawara et al.	Estudo sobre resposta a fármacos em co-cultura de neurônios do tronco cerebral e astrócitos de ratos com neurônios derivados de HiPSC.	2014
Mari et al.	Visualização 2D e 3D e análise quantitativa de neurônios GRD (gânglios de raiz dorsal) de ratos Wistar cultivados <i>in vitro</i> em MEA.	2015
Maass	Modelos computacionais utilizados em computação neural, plasticidade de rede subjacentes à percepção, cognição e comportamento e aprendizagem.	2016
Vassallo et al.	Avaliação multi-laboratório de medidas baseadas em MEA em tempo real em observação a reações para teste de neurotoxicidade.	2017
Yada et al.	Investigação sobre a variação do desenvolvimento de avalanches neuronais em neurônios corticais dissociados usando MEA de alta densidade	2017

Apesar da quantidade de trabalhos realizados em função de registros *in vitro* em MEA, raros trabalhos demonstram claramente o controle dos neurônios cultivados e medição dos seus

sinais, evocados com estímulos químicos como fármacos, ou com estímulos elétricos. Tentativas de enquadramento de neurônios individualmente em MEA modificado ocorreram, como o trabalho de Erickson et al.(2008). Um trabalho que demonstra os limites da engenharia reversa em neurociência (MAROM et al., 2009), merece atenção, pois o presente trabalho de doutorado proposto tem uma relação intrínseca com a engenharia reversa. A pouca quantidade de trabalhos relativos à visualização e quantificação de neurônios, como o trabalho de Mari et al., é observada.

2.4 Considerações Finais

Este capítulo foi dedicado às referências pertinentes aos trabalhos realizados em MEA ao longo dos anos. Os trabalhos citados aqui desempenharam o papel de alicerce para o desenvolvimento desta tese. Como disposto acima, foram mencionados trabalhos relacionados às pesquisas usando Matrizes de Microeletrodos, redes neurais e simulações de sinais, e, ao final, uma tabela onde são resumidos todos os trabalhos.

Capítulo 3

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Para o desenvolvimento desta tese foram necessários diversos estudos sobre uma variedade de temas visando explorar o conteúdo da melhor forma possível. O capítulo é iniciado com uma imersão na área biológica, de modo mais específico, células neuronais, posteriormente são introduzidos os conceitos mais relevantes acerca do tema de registros de sinais neurais, e logo em seguida contextualiza-se redes neurais artificiais e por fim, pré-processamento de sinais para filtragem.

3.1 Células Neurais

O processo de comunicação e processamento resultante de uma rede de neurônios é responsável pelo funcionamento de todos os órgãos dos animais, resultando em fatos como sentimentos diversos, pensamentos, respostas emocionais e motoras, aprendizagem e memória, assim como qualquer outra ação ou sensação do indivíduo animal. O neurônio é a unidade básica funcional do sistema nervoso central, em que a maioria das informações chegam por meio de numerosas projeções denominadas dendritos até o corpo celular, conhecido como soma. Os neurônios conectam-se uns com os outros através das sinapses que se situam nas terminações dos axônios e formam uma rede de neurônios. Os axônios se originam no corpo celular e se estendem até se aproximarem dos dendritos de outras células. Segundo Arlotta et al.(2005), a memória da rede está associada às transmissões de informações pelas sinapses. Na Figura 3.1 é ilustrado um exemplo de um neurônio biológico.

Basicamente as células do sistema nervoso podem ser resumidas em dois grupos: neurônios e células gliais. No encéfalo humano existem aproximadamente 100 bilhões de neurônios, os quais são responsáveis por diversas funções do corpo humano, sendo a principal delas a recepção e transmissão dos estímulos entre as células. Acredita-se que existam cerca de dez

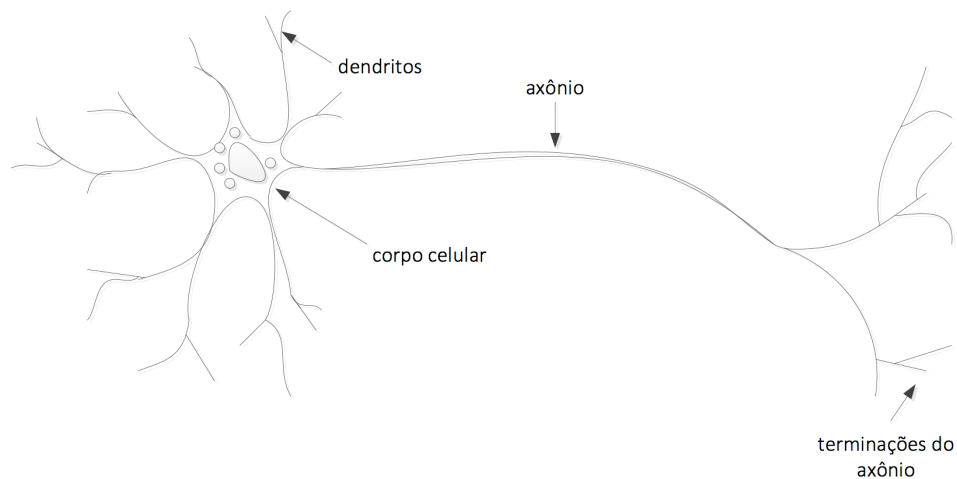


Figura 3.1: Ilustração de um Neurônio Biológico.

vezes mais células gliais no encéfalo em relação ao número de neurônios, que são responsáveis pela sustentação, isolamento e nutrição aos neurônios. Os neurônios possuem uma membrana contendo canais e bombas iônicas, que têm um papel importante na recepção, geração e transmissão dos impulsos nervosos, delimitando os fluidos externos, sendo semipermeável à passagem de alguns íons, tais como sódio, potássio, cálcio, cloro, dentre outros (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007).

Os canais iônicos na membrana têm a função de permitir ou reter o fluxo de íons a favor da concentração de modo seletivo, ou seja, cada canal é destinado objetivamente a um determinado íon. Por outro lado, as bombas iônicas constituem os mecanismos de transporte de íons através da membrana contra o gradiente da concentração (BARR; BRONZINO, 2000).

Por outro lado, é importante observar que estas diferenças de concentrações de íons são responsáveis pela transmissão do impulso nervoso, denominado de potencial de ação, que está associado a uma breve inversão do potencial de repouso da membrana. Estas funções serão abordadas de forma detalhada nos tópicos subsequentes.

3.1.1 Potencial de Ação

Bear, Connors e Paradiso(2007) definem potencial de repouso como sendo a situação na qual a membrana encontra-se no estado polarizado, ou seja, sem impulso nervoso, e geralmente o valor do potencial de repouso é aproximadamente observado em $-65mV$. Na situação de potencial de repouso, a concentração relativa interna ao neurônio é na maioria de íons de potássio, K^+ , e a concentração relativa externa é na maioria de sódio, Na^+ . Durante a despolarização, os canais iônicos de sódio se abrem e permitem a entrada de íons de sódio na célula, fazendo com

que o potencial de membrana aumente para um valor de algumas dezenas de mV, quando ocorre o potencial de ação. Esse potencial passa a decrescer novamente em função da abertura de canais iônicos de potássio, que fazem que os íons de potássio saiam da célula. Após esse processo, a concentração de potássio é maior externamente à célula, enquanto que a concentração de sódio seja maior internamente. Essa situação é revertida pela bomba de íons, que faz a introdução de íons de potássio para dentro da célula, e a retirada de íons de sódio para fora, voltando para a situação original de potencial de repouso (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007).

Quando o interior da membrana torna-se positivamente carregado em relação ao exterior, um pico, ou potencial de ação, é produzido. Em outras palavras, este pico é uma inversão rápida do potencial de repouso. Naturalmente é possível observar que esta reação é desencadeada pela abertura dos canais de sódio, permitindo o influxo de íons Na^+ fazendo com que a membrana seja menos negativa.

Este comportamento elétrico é derivado de uma despolarização que alcança ou ultrapassa um limite crítico, também conhecido como potencial limiar excitatório ou limiar de despolarização. Após a despolarização aplicada a um neurônio, este não causará potencial de ação a menos que seu limiar seja atingido e este processo é conhecido como *all-or-none-response*, efeito tudo ou nada (ASSIS; MIRANDA; CAVALVANTE, 2010). Caso a despolarização permaneça em estado contínuo, é então gerada uma sequência de disparos. A frequência de disparos é determinada pela intensidade do estímulo despolarizante. Além da despolarização causada pelos mecanismos biológicos, também é possível aplicar uma corrente elétrica de modo que a intensidade desta corrente aplicada seja o suficiente para atingir o limiar excitatório (PURVES et al., 2010).

O comportamento elétrico da membrana, potencial de ação em função do tempo, pode ser observado na Figura 3.2.

Como descrito no Capítulo 1, existem diversos estudos focados no comportamento do cérebro por meio de dispositivos *in vivo*, onde os experimentos são realizados direto ou no tecido vivo de um organismo (ARLOTTA et al., 2005; HOLTMAAT et al., 2005; BOCK et al., 2011). Por outro lado, uma variedade de estudos mostra uma diversidade de técnicas e métodos para a análise daqueles comportamentos sendo realizados *in vitro*. Neste tipo de análise, os neurônios são extraídos do corpo e postos sobre um substrato de vidro que contém eletrodos dispostos na forma matricial que são responsáveis pelo registro das atividades elétricas produzidas pelos neurônios (JIMBO et al., 2003, 2000; BLAU, 2013). Este dispositivo é comumente conhecido como matriz de multieletrodos, ou microeletrodos, MEA, que na próxima seção será abordado com maiores detalhes.

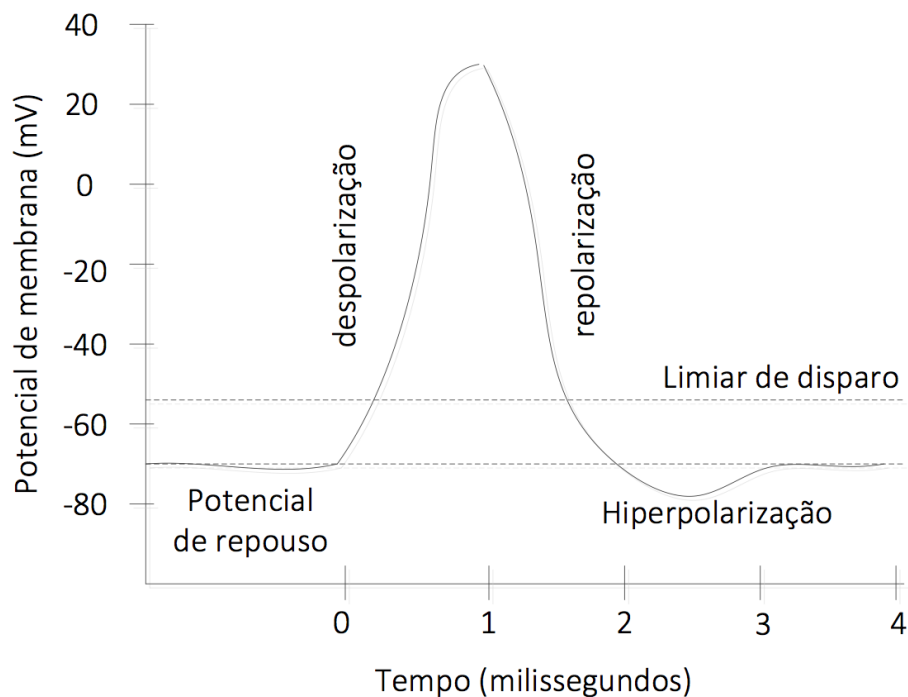


Figura 3.2: Potencial de Membrana em Função do Tempo.

3.2 Matriz de Microeletrodos (MEA) para Registro de Sinais Eletrofisiológicos

Como foi mencionado, captar e registrar atividades espontâneas de cultura de neurônios extracelular *in vitro* é possível por meio de um dispositivo compacto denominado MEA. Este dispositivo tem sido muito usado no meio científico e acadêmico durante os últimos anos. Apesar da possibilidade de registro de sinais produzidos por fatias de tecidos cerebrais reais, a maioria dos registros são de sinais produzidos pelos neurônios dissociados cultivados *in vitro* sobre a MEA, e permite a gravação de atividades elétricas simultaneamente em vários eletrodos em alta resolução temporal. MEAs representam uma ferramenta importante para estudar a dinâmica em redes neurais, avaliar o comportamento das células neurais na administração de fármacos, dentre outras aplicações (POTTER; WAGENAAR; DEMARSE, 2006; BONTORIN et al., 2007; CHAO; BAKKUM; POTTER, 2007).

MEAs são construídos com a mesma tecnologia em nanoescala dos circuitos integrados e são capazes de registrar atividades elétricas de células neuronais cultivadas sob determinadas condições por um longo período de tempo. Permitem a gravação de atividades elétricas simultaneamente de vários eletrodos, e representam uma importante ferramenta no estudo de redes neurais (POTTER; WAGENAAR; DEMARSE, 2006; ROLSTON; GROSS; POTTER, 2010). O estudo de neurônios dissociados é uma técnica bem utilizada para a investigação do

crescimento axonal, de formação de sinapses entre neurônios através dos sinais registrados. Além da técnica de dissociação existem as técnicas de reagregação e organotípicas (POTTER; DEMARSE, 2001), porém a técnica mais utilizada para a avaliação do crescimento axonal e formação de sinapses entre os neurônios é a dissociação.

A Figura 3.3, obtida do artigo de Pine 1980, representa uma micrografia de $5\ \mu\text{m}$ de uma pequena fatia "espumosa" denominada de platinum black que é depositada para formar um microeletrodo.

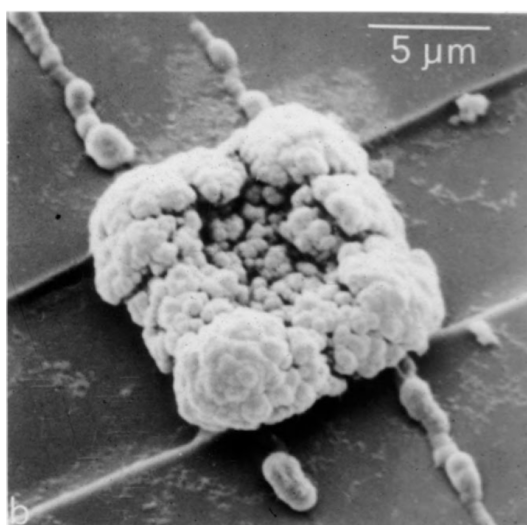


Figura 3.3: Micrografia de um Microeletrodo de MEA.
Fonte: (PINE, 1980).

Investigar atividades eletrofisiológicas espontâneas de células neuronais durante seu desenvolvimento tem sido importante para entender o comportamento do processo de maturação, conectividade entre neurônios biológicos, plasticidade e adaptabilidade da rede. Quando os neurônios começam a se conectarem, durante a fase de maturação da cultura, as células apresentam um padrão de conexão sináptica e padrões de atividades bastante primitivas (BEN-ARI, 2001).

O *biochip* MEA comercial mais utilizado em pesquisas é o modelo composto de uma grade de 8×8 ou 6×10 eletrodos produzidos com materiais bastante específicos como, nitreto de titânio, ouro, óxido de índio, estanho, com espaçamento variando de 50 a $500\ \mu\text{m}$, uma camada de passivação e um anel de vidro, conhecido como câmara da cultura de $1.5\ \text{ml}$, sobre um substrato de vidro de tamanho $5 \times 5\ \text{cm}^2$ (Multichannel System, 2014; FRIEDMAN, 2002; MESI et al., 2012; FEJTL et al., 2006).

A Figura 3.4 mostra um exemplo de MEA onde à esquerda, Figura 3.4(a), é visto o substrato de vidro que, ao centro está localizado o reservatório circular onde as células são cultivadas; à

direita, Figura 3.4(b), é vista a forma matricial ampliada da matriz de microeletrodos, onde os pontos terminais são os eletrodos e as linhas são condutores de sinais que interligam aos circuitos amplificadores.

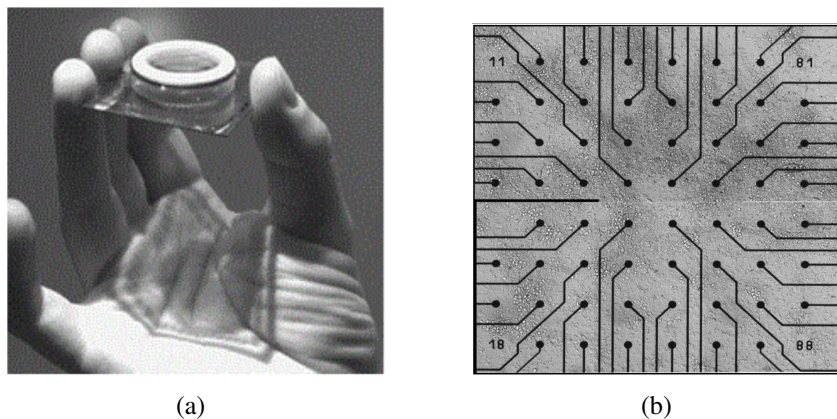


Figura 3.4: MEA de 60 canais: (a) MEA, Fonte: Potter, Wagenaar e DeMarse (2006), (b) imagem da região central ampliada.

É importante ressaltar que as superfícies da MEA e dos eletrodos são isoladas com poliamida ou óxido/nitreto de silício cujo objetivo é evitar curto-circuitos com o banho eletrolítico. Além disso, essa camada isolante é revestida de moléculas adesivas como polilisina e laminina para que sirva de aderente para os neurônios. Para que os estímulos externos sejam emitidos, a baixa impedância dos eletrodos e a escolha do intervalo de tensão devem ser cuidadosamente definidas, o que evita a geração de complexos redox neurotóxicos. Redox tem o significado da composição de redução e oxidação, onde redução indica ganho de elétrons ou decréscimo em estado de oxidação por uma molécula, e oxidação indica perda de elétrons ou aumento no estado de oxidação.

3.2.1 Estímulo e Gravação de Dados

As atividades eletrofisiológicas dos neurônios são registradas conforme o eletrodo de referência localizado na solução. O substrato é feito de um material transparente para possibilitar a fotografia por microscópios invertidos, de fluorescência, confocal ou de varredura dupla (POTTER; DEMARSE, 2001). Os dispositivos MEA tem uma característica bastante peculiar que é permitir a troca de informação do mundo biológico com o eletrônico, onde as células são cultivadas sobre um microcircuito (RUTTEN et al., 2001). Esse processo permite o registro das atividades espontâneas ou estimuladas por um período de dias podendo chegar a semanas dependendo do manejo e cultivo das células, todavia essa situação só é possível a partir de moléculas de adesão conhecidas (CLAVEROL-TINTURE et al., 2005). Na Figura 3.5 é

ilustrada uma fatia de tecido sobre a MEA e o esquema de registro de atividades.

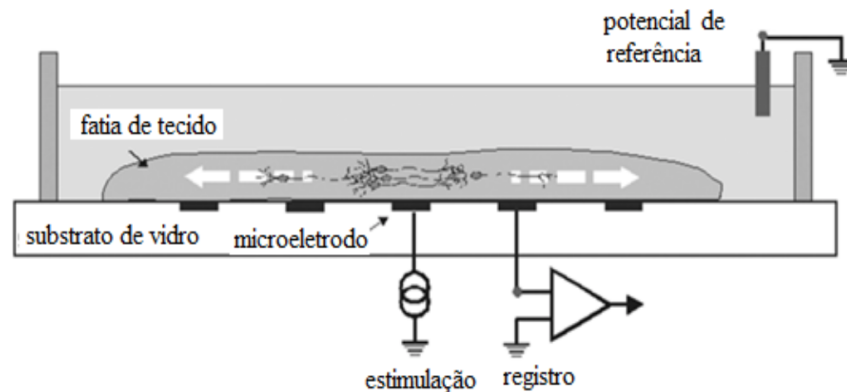


Figura 3.5: O tecido cerebral disposto sobre o substrato de vidro aderido à superfície sobre os eletrodos planares usado tanto para estímulo quanto para registro das atividades eletrofisiológicas. Figura adaptada do artigo de (RUTTEN et al., 2001).

Além da função de registro das atividades utilizando-se de circuitos amplificadores, os eletrodos também são usados para aplicar pulsos de estímulos à cultura de neurônios. Para a aplicação de estímulos, o amplificador é substituído por uma fonte de estimulação, e quanto mais efetivo for a corrente injetada, melhor a eficácia dentro da interface eletrodo-tecido. Cabe lembrar que a corrente deve ser significativamente pequena para que não cause uma reação eletroquímica irreversível na interface. Normalmente, o diâmetro dos eletrodos são de até 30 μm e podem registrar sinais de um único neurônio ou de vários neurônios sobre cada eletrodo. Geralmente, um eletrodo captura atividades de vários neurônios visto que as células também são de escalas micrométricas. Para que haja um sinal de qualidade, uma parte substancial das células precisam estar em contato com a superfície do eletrodo (PELT et al., 2004; STETT et al., 2003). Para maximizar a vida útil da cultura, o manejo é um item crucial. A cultura deve ser mantida em uma incubadora fora do período de gravação, o que evita a contaminação por organismos patogênicos, e aumento da pressão osmótica causada pela evaporação. Visando aumentar a eficiência na utilização da cultura, um novo utensílio foi desenvolvido para reduzir os efeitos dos fatores supracitados pela equipe de Potter (POTTER; DEMARSE, 2001). Para não permitir a degradação e contaminação, uma tampa foi inserida de forma a vedar a cultura, evitando que outros gases tenham contato, incorporando uma membrana hidrofóbica transparente seletivamente permeável ao oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2), e relativamente impermeável ao vapor de água. O *setup* para o registro de atividades utilizando o sistema MEA é apresentado a seguir, a Figura 3.6 mostra graficamente os equipamentos eletrônicos.

Os componentes apresentados na Figura 3.6 são compostos de:

a) interface MEA de 60 canais, onde a região central é destacada mostrando os eletrodos

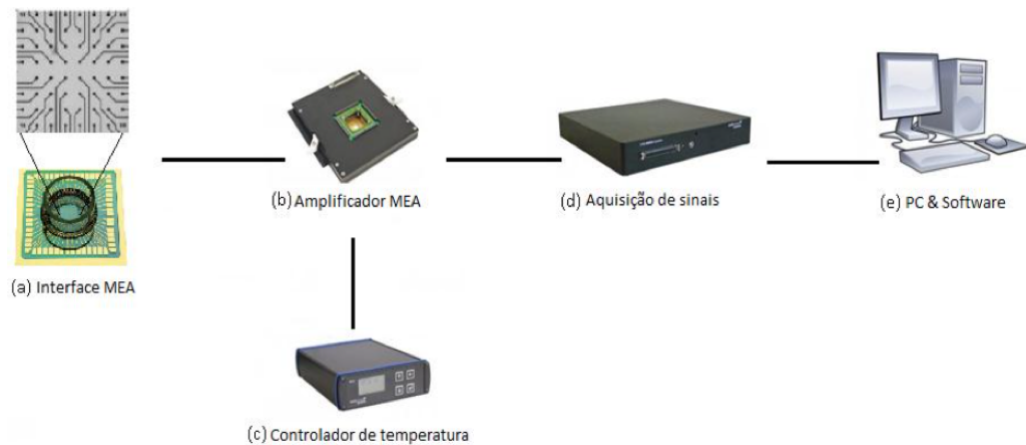


Figura 3.6: Configuração básica para experimentos utilizando sistema MEA com 60 canais.

(terminais) e as trilhas para transmissão dos sinais, isoladas eletricamente para possibilitar a condução dos sinais captados até a extremidade da borda, ligados a um sistema de amplificação de sinal.

- b) amplificador para registro multieletrodo que encapsula a interface MEA, que possibilita eliminar os cabos e manter o estágio de amplificação muito próximo à fonte do sinal.
- c) controlador de temperatura que usa uma tecnologia semelhante a Proporcional Integral Derivativo (PID).
- d) conversor A/D que converte o sinal recebido pelo amplificador em sinal digital para ser enviado ao computador.
- e) Computador para armazenar os sinais registrados.

3.2.2 Definição, Quantificação e Detecção de *Spikes*

O método mais comum para medir e analisar sinais eletrofisiológicos de células neuronais é a detecção de picos de atividades, também conhecidos como *spikes* (MASSOBRIO; MARTINOIA, 2008) que são resultantes dos potenciais de ação. Existem diversos métodos para mensurar essas atividades na literatura. Para que um pico, ou *spike*, seja identificado, normalmente é usado um limiar fixo, no entanto, também são encontrados, na literatura, vários métodos sofisticados baseados em classificadores de sinais, porém, ambos tem produzido bons resultados, e a escolha de um ou de outro é dependente da aplicação (MAROM; SHAHAF, 2002; DEMARSE et al., 2001). *Spike* é uma parte do sinal que a amplitude supera um limiar estabelecido. Este método é conhecido como SDDT (*Spike Detection Differential Threshold*) que

consiste em estabelecer um valor de limiar (*threshold*), geralmente definido como um múltiplo do desvio padrão do sinal. Na Equação 3.1 é apresentado o cálculo para o limiar de detecção, *threshold*:

$$threshold = f * dp \quad (3.1)$$

onde f é o fator de multiplicação que, geralmente é um valor variante de 5 a 8 e dp é o desvio padrão (JIMBO; TATENO; ROBINSON, 1999). De maneira mais objetiva um *spike* é a alteração abrupta na amplitude e no espectro de frequências no sinal da atividade eletrofisiológica que ultrapassa o *threshold*. A Figura 3.7 mostra uma amostra com duração de 10.000 *ms* de um sinal observado sobre um determinado microeletrodo, onde é possível observar os picos que foram maiores que o limiar estabelecido.

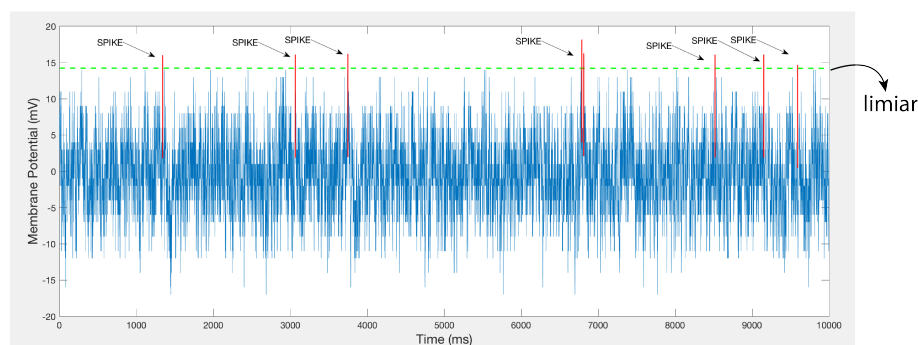


Figura 3.7: Sinal eletrofisiológico de 10.000 ms e a linha de limiar destacada.

Naturalmente a identificação de um *spike* é feita pelo deslocamento de uma janela ao longo do sinal observado, de modo que, apenas um único *spike* seja detectado no espaço de tempo observado, geralmente o tamanho da janela é de 2 ms. Uma outra medida para caracterizar o nível da atividade eletrofisiológica da rede é a taxa média de disparo, do inglês *Mean Firing Rate* (MFR), dada pela razão entre o número de *spikes* e o intervalo temporal (T) da janela do sinal observado, obtido pela Equação 3.2,

$$MFR = \frac{n}{T} \quad (3.2)$$

onde n é o número de *spikes* identificados no intervalo de tempo T . Quando a MFR é menor que 0,2 *spike/s* ela é considerada inativa e pode não ser usada para o estudo. A distribuição de intervalos entre *spikes*, também, é um parâmetro muito utilizado para medir a probabilidade de disparo para um *spike* subsequente.

3.2.3 Definição, Quantificação e Detecção de *Bursts*

Burst é um conjunto de *spikes* consecutivos. Num *burst* é medido o intervalo entre os *spikes*, *Inter Spike Interval* (ISI). E quando se tem vários *bursts* em um sinal registrado, pode-se medir o intervalo entre os *bursts*, *Inter Burst Interval* (IBI). O número de *spikes* consecutivos que determina um *burst* pode variar de acordo com o algoritmo, podendo ser três, quatro ou dez *spikes* em sequência (RUTISHAUSER; SCHUMAN; MAMELAK, 2006). Um outro fator bastante importante é a duração de cada *burst*, geralmente adotado pela soma dos intervalos entre *spikes*. A Figura 3.8 mostra a ideia central sobre ISI e IBI.

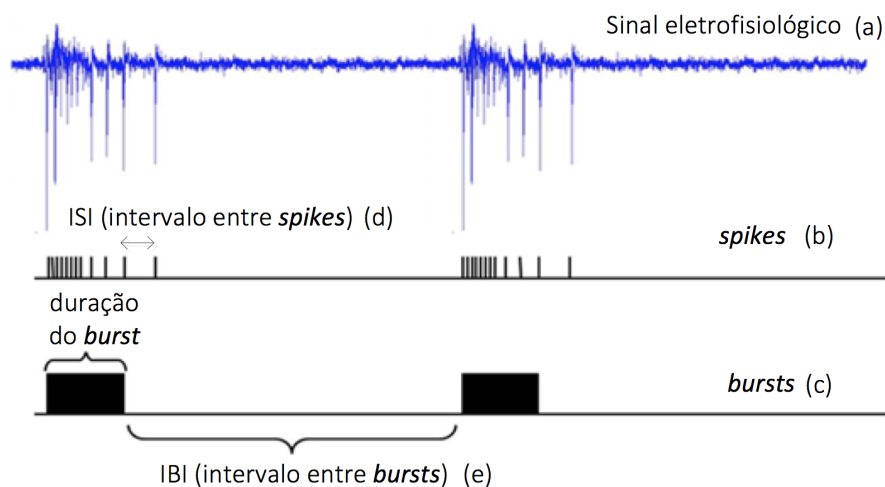


Figura 3.8: (a) Amostra de um sinal registrado pela MEA; (b) *spikes* detectados; (c) identificação de *bursts*; (d) Intervalo entre *spikes* e (e) Intervalo entre *bursts*.

Sabendo-se que um *burst* é determinado pela sequência de *spikes* próximos entre si, uma constante é definida para determinar se um *spike* é pertencente a um *burst*, da mesma maneira, uma constante é especificada para estipular o que determina dois *bursts* consecutivos.

É possível determinar o número de células envolvidas na formação de um *burst*, bem como distinguir os *spikes* gerados por cada neurônio utilizando algoritmos conhecidos como *spike sorting*. A taxa média de *bursts*, *Mean Bursting Rate* (MBR) é definida pela Equação 3.3, cuja principal função é estimar o número de *bursts* por minuto.

$$MBR = \frac{M}{T} \quad (3.3)$$

sendo M o número de *bursts* e T a janela temporal do sinal observado. Além disso, também é possível determinar o intervalo entre os *bursts*, parâmetro comumente usado na literatura para classificação e extração de características.

3.3 Imageamento óptico das células cultivadas *in-vitro*

Uma das principais formas de se obter informações complementares sobre a cultura sob o substrato de vidro da MEA é realizar o imageamento óptico. É possível obter as medidas morfológicas de cada célula como diâmetro, área da superfície, distribuição espacial, além da topologia dos neurônios na MEA. Além disso, o imageamento é frequentemente usado para obter a densidade de neurônios em uma determinada região da cultura.

Por outro lado, existem uma série de pontos negativos associados a essa técnica que pode acabar prejudicando a leitura dos sinais, e quando a cultura é exposta por um grande período de tempo para obter as imagens, ela sofre com o fenômeno conhecido como fototoxicidade (GIUGLIANO; MARTINOIA, 2006).

3.3.1 Microscopia Confocal de Fluorescência

A informação de como os neurônios na MEA estão distribuídos é um tema de grande valia no estudo das células cultivadas *in vitro*. A técnica de microscopia tridimensional permite obter informações dos modelos imageados por meio de um processo conhecido como seccionamento óptico. Para obter imagens tridimensionais do modelo é utilizado um microscópio *wide-field*, confocais e multifótons. Basicamente o resultado é obtido através de seções ópticas em diferentes planos focais ao longo do eixo z da cultura, onde cada seção óptica pode ser representada como uma imagem de duas dimensão (2D) (OKOSHI, 2012). A Figura 3.9 apresenta o processo de aquisição de imagem tridimensional por seccionamento óptico.

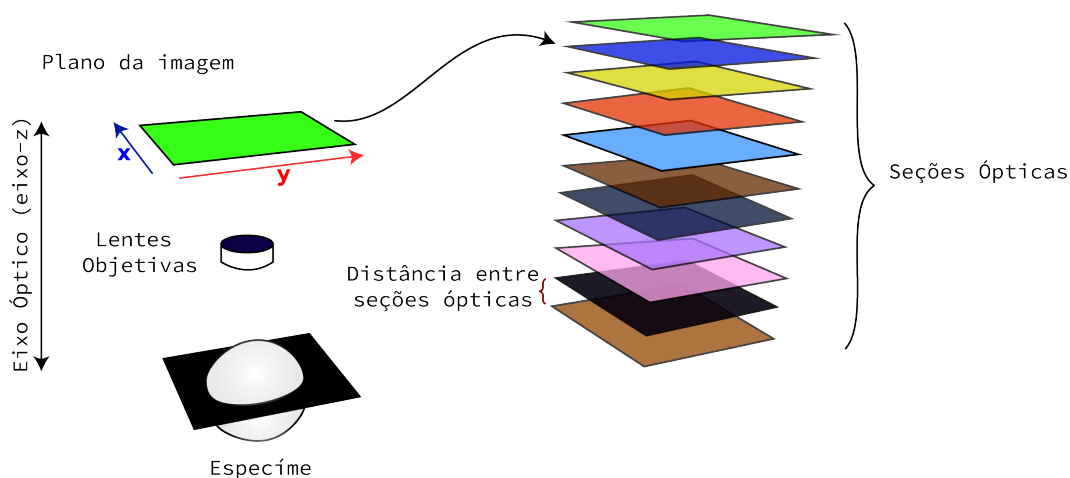


Figura 3.9: Imageamento 3D por seccionamento óptico.

O processo de formação da imagem 3D por microscopia é fundamental para uma análise mais detalhada da cultura. O conjunto óptico do microscópio é capaz de aumentar o diâmetro de abertura para que seja admitida uma quantidade maior de luz, tanto abaixo quanto a cima do plano focal (JEROME; PRICE, 2018).

No processo de microscopia óptica convencional a cultura seria toda coberta pela luz, impedindo a observação de regiões específicas como por exemplo o núcleo de uma célula, terminações dos dendritos. Sendo assim, é necessário utilizar técnicas específicas para que isso seja possível. Neste contexto, é utilizada a técnica de fluorescência associada à propriedade das moléculas que quando excitadas por uma fonte de luz de comprimento de onda específica, sendo este feixe de luz o responsável em permitir a sua identificação. Essa técnica tem sido usada para imagear regiões específicas provocando um efeito semelhante a um corante fluorescente quando ligadas a estruturas celulares (WU; MERCHANT; CASTLEMAN, 2010).

3.3.2 Processamento das Imagens de Microscopia

Imagens são representações computacionais que são compostas por uma matriz de pixel. Considerando uma imagem na escala de cinza, cada pixel possui um atributo representando sua intensidade, também chamada de luminescência. Já em imagens coloridas o esquema que determina a intensidade dos pixels são tuplas de atributos escalares onde seguem algum esquema de codificação, como por exemplo o RGB, CMYK entre outros.

No processo de análise das imagens obtidas por microscopia óptica são necessários uma variedade de filtros e equalizações para que possam ser identificados e extraídos os artefatos. Alguns dos métodos para tratamento das imagens são descritos abaixo.

- a. Filtragem espacial: Para que uma imagem fique melhorada é possível o uso de uma máscara especial para realçar suas características. Normalmente filtros passa-alta atenuam os componentes de baixa frequência e tornam as bordas mais evidentes. Por outro lado filtros passa-baixa atenuam os elementos de alta frequência, e geralmente são usados para redução do ruído;
- b. Suavização Gaussiana: O uso de uma função Gaussiana como suavização produz a redução do ruído de alta frequência convoluindo a imagem por $G(i, j)$, definida pela Equação 3.4:

$$G(i, j) = \exp\left(-\frac{i^2 + j^2}{2\alpha^2}\right) \quad (3.4)$$

onde α é o desvio padrão da Gaussiana. À medida que o desvio padrão aumenta, maior é o efeito da função Gaussiana causando a suavização na imagem (COSTA; JR, 2000).

- c. Melhoria do contraste e Equalização de Histograma: O processo de normalização e equalização de histograma melhora o contraste. A Figura 3.10 mostra uma imagem obtida através da normalização e equalização do histograma.

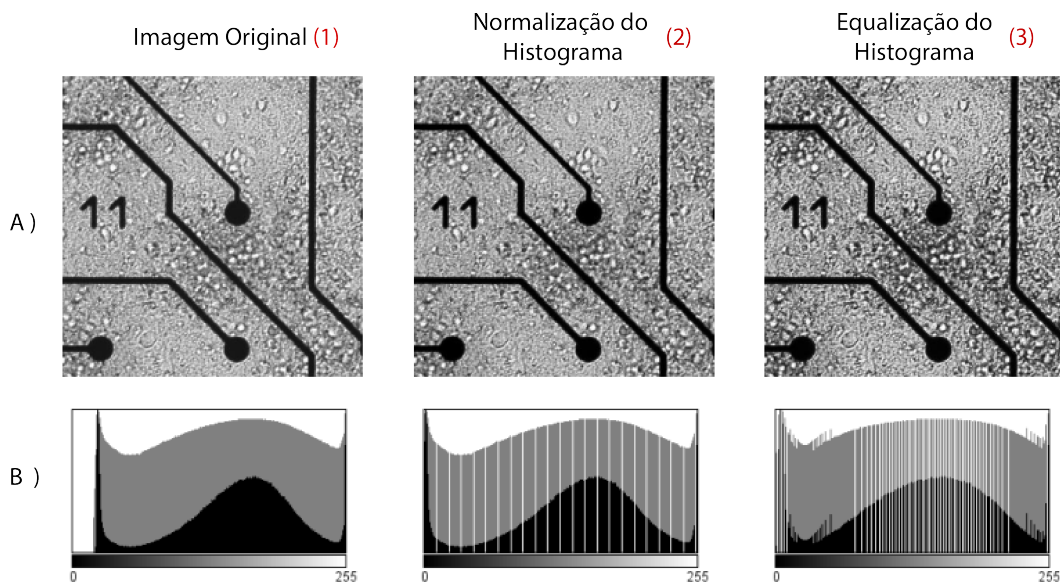


Figura 3.10: A) Representação da imagem original (1), com normalização do histograma (2), e com equalização do histograma. B) Respectivos histogramas. Adaptado de Mary (2015).

3.4 Redes Neurais Artificiais

Pesquisas iniciais sobre os neurônios artificiais foram propostas por dois cientistas, Warren McCulloch e Walter Pitts, no início dos anos 1940, com o objetivo de mostrar como o cérebro poderia realizar funções lógicas, criando um neurônio com uma saída, que era uma função da soma de valor de suas diversas entradas (MCCULLOCH; PITTS, 1990). Em 1949, Hebb propôs um sistema de aprendizado por correlação dos neurônios, dando origem à regra de aprendizagem de Hebb (CAPORALE; DAN, 2008), que implica que a ativação simultânea de duas células interconectadas leva ao crescimento da força sináptica entre elas. Por volta do ano 1950, os cientistas Hebert Simon e Allen Newell na Universidade de Carnegie Mellon desenvolveram um programa conhecido como *Logic Theorist* cujo objetivo era resolver problemas aritméticos usando inteligência artificial (NEWELL; SIMON et al., 1972). Em 1958, Rosenblatt, desenvolveu a rede neural conhecida como *perceptron*, usando uma camada de neurônios criados por McCulloch e Pitts e demonstrou que essa rede era capaz de ser treinada, em um certo número limitado de passos, e reconhecer padrões em classes linearmente separáveis (ROSENBLATT,

1958). A não aplicação da rede em classes não-linearmente separáveis, no entanto, fez com que as pesquisas em redes neurais artificiais do tipo *perceptron* fossem reduzidas até meados da década de 1980, quando Rumelhart, Hinton e Williams, publicaram o algoritmo de treinamento *backpropagation*, para o treinamento de *perceptrons* multicamadas, que permite a solução para o reconhecimento de padrões em classes não linearmente separáveis (WERBOS, 1990). Após esse evento, as pesquisas em redes neurais artificiais teve um forte avanço em diversas áreas e, principalmente na proposição de métodos que incrementaram uma melhora significativa relacionada ao treinamento da rede (RUMELHART; HINTON; WILLIAMS, 1986).

Substancialmente, Redes Neurais Artificiais (RNA) são modelos matemáticos baseados no sistema nervoso biológico com a finalidade de atribuir inteligência a mecanismos autônomos. As RNAs tem sido aplicados em diversas áreas de conhecimento, como no processamento da linguagem com programas capazes de compreender a linguagem natural (interpretação) e geração de textos (GOLDBERG, 2016). As RNAs servem como sistemas capazes de reconhecer figuras, objetos e até mesmo textos (KRIZHEVSKY; SUTSKEVER; HINTON, 2012); e em visão computacional, apresentam aplicações relacionadas à visão bidimensional e tridimensional (JI et al., 2013). Outras aplicações de RNAs podem ser vistas em previsões meteorológicas, econômicas, jogos de entreterimento, na robótica (MNIH et al., 2013). Existem uma motivação muito grande para o uso de RNA, em que podem-se citar:

- Capacidade de aprender em ambientes que se pretende modelar através de dados observados (KANTARDZIC, 2011);
- Aproximações em mapeamentos dinâmicos não lineares e multidimensionais (NARENDRA; PARTHASARATHY, 1991);
- Memória associativas para resolução de problemas combinatórios em busca do ponto de equilíbrio (HOPFIELD, 1982);
- Redes auto-organizáveis e treinamento sem supervisão (KOHONEN, 2012).

Diversas arquiteturas de RNA foram desenvolvidas ao longo do tempo, porém as que mais se destacaram foram as redes de camada única e multicamada. No primeiro caso, os neurônios recebem a entrada e produz uma saída. Este tipo de rede é mais adequada para tarefas auto-associativas, tais como de reconhecimento de padrões. Já no segundo caso, os neurônios são dispostos em várias camadas ou níveis e geralmente obedecem a um certo padrão de conexão entre si. É comum encontrar na literatura redes com três ou mais camadas, conhecidas como *multilayer*. No caso de três camadas, a primeira camada é conhecida como receptora de sinais,

ou camada de entrada, que tem como finalidade receber a entrada da rede. A segunda camada, conhecida como camada oculta geralmente realiza o mapeamento de classes ou regressão de dados, e por fim, a última camada, camada de saída, gera o resultado do processamento realizado na camada oculta, e nos casos de auto-associação são responsáveis pelo processamento de associação.

Além disso, a dinâmica da rede pode apresentar dois tipos:

1. *Feedforward* - Onde o sentido da propagação das conexões são à frente, um exemplo é a rede *MLP, MultiLayer-Perceptron*. Na Figura 3.11 é apresentado o diagrama deste tipo de rede.

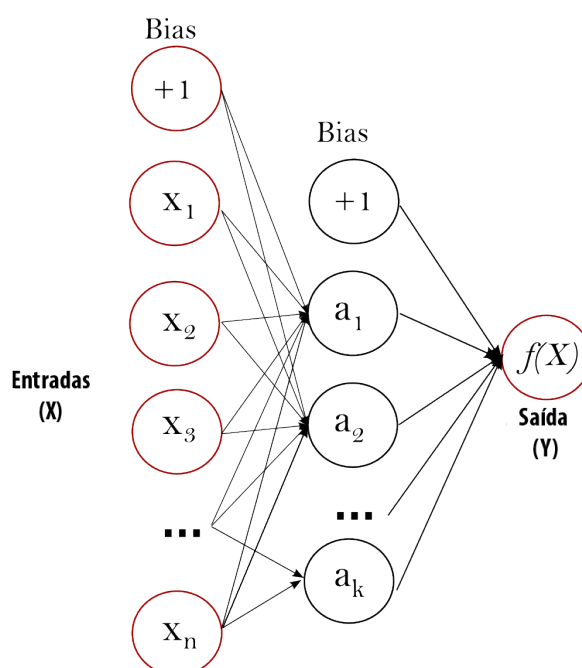


Figura 3.11: Rede *Feedforward Multilayer Perceptron*.

2. *Feedforward/feedback* - Neste caso os sentidos da propagação das conexões são à frente e retroalimentado, sentido contrário. Aqui pode-se citar as redes recorrentes.

3.4.1 Métodos de Aprendizagem/Treinamento

A aprendizagem de uma RNA consiste num processo de atualização iterativa dos seus pesos até que estejam em sintonia com a função que se deseja aproximar ou em condições de reconhecer padrões. Para uma aprendizagem supervisionada isso é feito por meio da apresentação de um conjunto de amostras à entrada da rede e associadas às respectivas saídas desejadas. Quanto maior for o conjunto de amostras apresentado à rede, melhor a capacidade de desempenhar a função atribuída ao sistema como um todo (SILVA; SPATTI; FLAUZINO, 2010). A seguir serão descritos os principais paradigmas de aprendizagem/treinamento.

3.4.1.1 Paradigmas de Aprendizado/Treinamento

- a) Supervisionado - Este tipo de treinamento é definido por meio de um supervisor que determina a resposta que a rede deverá produzir de acordo com a entrada apresentada. Este mecanismo geralmente está associado a redes do tipo heteros-associativas. Assim, o supervisor tem a função de observar a resposta da rede cujo intuito é certificar que a saída esteja correta, e caso a resposta não esteja correta os pesos das conexões são ajustados visando minimizar a diferença. Os ajustes dos pesos podem ser realizados por correção de erro ou por reforço.
- i. Ajuste por correção do erro: os ajustes dos pesos são realizados de modo a reduzir o erro cometido, em outras palavras, minimizar a diferença entre a saída obtida pela saída desejada. O algoritmo mais conhecido relacionado a este tipo de aprendizagem é o *backpropagation* (RUMELHART; MCCLELLAND, 1986; WERBOS, 1974).
 - ii. Ajuste por reforço: este tipo de aprendizagem não dispõe de um exemplo completo para o mapeamento do problema ou comportamento desejado, sendo assim o ajuste conta com um grau menor de supervisão. Esta forma de treinamento não minimiza o erro, apenas fornece um certo grau de acerto ou erro associado a uma sequência de ações da RNA (BARTO; ANANDAN, 1985).
- b) Não-supervisionado - Também conhecido como auto-supervisionado, este tipo de treinamento não necessita de um professor para arbitrar a saída fazendo com que os indicativos de comportamento não sejam requeridos. O processo de ajuste dos pesos sinápticos são naturalmente auto-organizáveis, e geralmente, este tipo de paradigma está associado a redes auto-associativas, onde são usados os seguintes algoritmos bastante difundidos no meio científico: a regra Hebbiana e modelos competitivo/cooperativo.
- i. Hebbiano: as conexões sinápticas associadas aos neurônios são fortalecidas à medida que vários deles se encontrem simultaneamente ativos, por outro lado as conexões são enfraquecidas quando se observa ativações descorrelacionadas no tempo (HEBB, 1949).
 - ii. Cooperativo: nesta forma de paradigma os neurônios competem entre si e aqueles que vencerem a competição têm os seus pesos sinápticos ajustados, de forma incremental, assim como seus neurônios vizinhos, entretanto estes recebem ajustes com menor intensidade.

3.4.2 Redes Auto Organizáveis (*Self-Organizing Map - SOM*)

Pesquisas associadas ao córtex cerebral têm mostrado que as células neurais dos mamíferos se organizam de maneira relativamente estruturada em suas funções, tornando-as especialistas no processamento sensorial de sinais como: visão, audição, motor etc. (HULLE, 2000; KOHONEN, 2012). É evidente que os neurônios são estimulados por sinais e podem reagir de forma excitatória ou não. A explicação plausível para isso é que existe uma separação dos canais nervosos ligando o cérebro aos órgãos sensoriais. Foi notado que os sinais percebidos pelos órgãos sensoriais tendem a se projetar no córtex cerebral em períodos bem definidos (HULLE, 2000). Examinando o córtex de forma analítica, nota-se uma organização abstrata e conseqüentemente complexa. Os neurônios tendem a se organizarem fisicamente próximos entre si de acordo com uma ordem topológica bem específica.

Com uma forte evidência notada na auto-organização dos neurônios proposta por Kohonen em 1982, e na rede neural de aprendizado não-supervisionada (*Self-Organizing Map - SOM*) a comunidade acadêmica tem pesquisado o processo de formação topológica dos neurônios com a criação de vários modelos. Os mapas topológicos são os mais pesquisados e são baseados no processo de competição WTA (*winner-takes-all*), ou seja, o vencedor leva tudo. Este processo é baseado na metodologia onde o vencedor (aquele com melhor desempenho) consegue captar a maior parte da recompensa, e os outros, por outro lado, ficam com uma parte que diminui com a distância em relação ao vencedor (KASKI; KOHONEN, 1994).

Evidências biológicas mostram que os neurônios do córtex cerebral tendem a se organizar de forma estruturada resultando em funções como audição, visão, controle motor etc. (KOHO-NEN, 1997).

Na rede SOM de Kohonen pode-se observar as seguintes fases:

- Como entrada, esta rede recebe um elemento de um conjunto de dados do espaço R^n , que atua sobre um arranjo em que os neurônios de saída se competem;
- Para cada vetor de entrada apresentado à rede, haverá uma competição entre todos os neurônios de saída de modo que quem obtiver o maior valor será o escolhido para representar o vetor de entrada, e esta competição é baseada em alguma métrica previamente estabelecida, a mais comum sendo a distância Euclidiana.
- O neurônio vencedor é então rotulado como sendo o BMU (*best matching unit*);
- O vetor de pesos associado ao BMU é então atualizado de modo a representar uma aproximação ainda maior ao vetor de entrada, e isso se justifica para que a probabilidade desse

neurônio vencer novamente caso uma mesma entrada ou alguma similar seja apresentada novamente à camada de entrada. Além disso, é importante ressaltar que neurônios próximos ao BMU também terão seus pesos atualizados, porém, quanto mais distantes do BMU menor será a intensidade do reajuste.

A relação de distância permite a fundamentação da ideia de que neurônios próximos representam valores próximos entre si possibilitando um agrupamento topológico dos dados.

Com isso, os mapas de Kohonen tendem a manter a topologia do espaço dos dados originais dentro do possível, em um arranjo de neurônios em um espaço de menor dimensão.

No modelo tradicional da rede SOM cada neurônio da camada de entrada é associado usando um vetor de pesos sinápticos a todos os neurônios na grade. Na Figura 3.12 é ilustrado a camada de entrada conectada aos neurônios da malha.

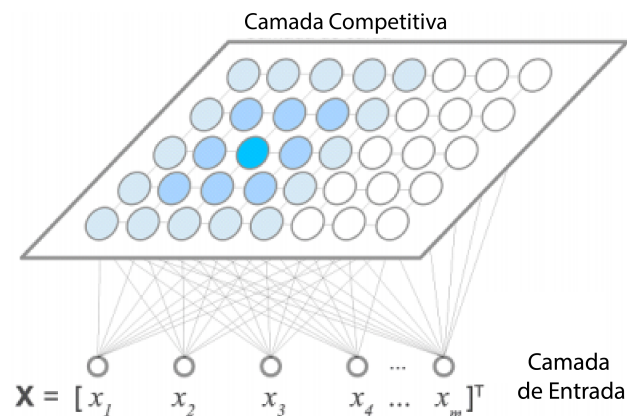


Figura 3.12: Modelo topológico do mapa de Kohonen - Adaptado de Bassani e Araújo (2012).

A cada iteração do treinamento é selecionado um vetor de entradas que é apresentado à rede, e todos os neurônios da camada competitiva receberão a mesma entrada. Dessa forma calcula-se a similaridade do vetor de pesos w_i de cada neurônio i da camada competitiva ao vetor v_n de entrada seguindo alguma métrica. A distância é uma métrica mais utilizada no SOM, e a equação 3.5 refere-se o cálculo da distância Euclidiana, onde N é o número de elementos do vetor de entrada.

$$d(w_i, v_n) = \|w_i, v_n\| = \sqrt{\sum_{j=1}^N |w_{ij} - v_{nj}|^2} \quad (3.5)$$

Uma vez calculadas todas as distâncias, o neurônio com a menor distância é eleito a ser o BMU de índice b na equação 3.6:

$$b = \operatorname{argmin} \|w_i, v_n\| \quad (3.6)$$

A ideia central do aprendizado competitivo é que o neurônio vencedor influencie todos ao seu redor para que possa melhor representar o sinal de entrada. Isso possibilita uma integração local entre seus vizinhos para que, o neurônio vencedor tenha seus pesos ajustados juntamente com seus vizinhos, que por sua vez receberam ajustes com uma menor intensidade. Ao final desse processo a rede terá uma organização geral do mapa. A equação 3.7 mostra a atualização do valor do peso sináptico do i -ésimo neurônio no instante de tempo $t + 1$ (KOHONEN, 1990).

$$w_i(t + 1) = w_i(t) + \alpha(t) \cdot h_{bi}(t) \cdot [w_i(t) - v_n(t)] \quad (3.7)$$

sendo $t = 0, 1, 2, \dots, n$, o valor discreto do instante de tempo t , $\alpha(t)$ a taxa de aprendizagem, $h_{bi}(t)$ é a função da vizinhança efetiva que, define o grau de interação e adaptação do neurônio BMU. Para que haja uma melhor adaptação da rede, a função de vizinhança deve decair com o passar do tempo para que o mapa possa convergir (KOHONEN, 1997).

A escolha da função de vizinha é um processo que deve ser realizado com bastante critério, e normalmente uma regra para a função de vizinhança diz que quanto maior a distância entre os neurônios menor será h_{bi} , reduzindo de forma exponencial. O controle da flexibilidade fica em função da forma e do raio de h_{bi} (KOHONEN, 1997). No entanto, esta função quando aplicada em mineração de dados é geralmente uma gaussiana escrita na forma da equação 3.8, onde r_b e r_i são as posições de b e i na grade SOM:

$$h_{bi} = \exp\left(-\frac{\|r_b, r_i\|^2}{2\alpha^2(t)}\right) \quad (3.8)$$

sendo o parâmetro α quem define a largura da vizinhança. Na Figura 3.13, é mostrada a influência do parâmetro da taxa de aprendizagem em relação à vizinhança.

A Figura 3.13 refere-se à influência da taxa de aprendizagem dos neurônios vizinhos ao neurônio BMU. Percebe-se que o neurônio vencedor tende a atrair os neurônios vizinhos na direção do objeto apresentado na qual é controlado pela Gaussiana h_{bi} . Isso faz com que à medida que o algoritmo vai iterando, isto é, aprendendo, estímulos semelhantes vão em direção aos neurônios próximos entre si fazendo com que promova a ordenação topológica na rede de neurônios em relação aos dados no espaço de entrada.

A rede neural proposta por Kohonen pode ser comparada a uma grade elástica onde os neurônios são ligados entre si através das conexões e, onde podem esticar, comprimir ou até

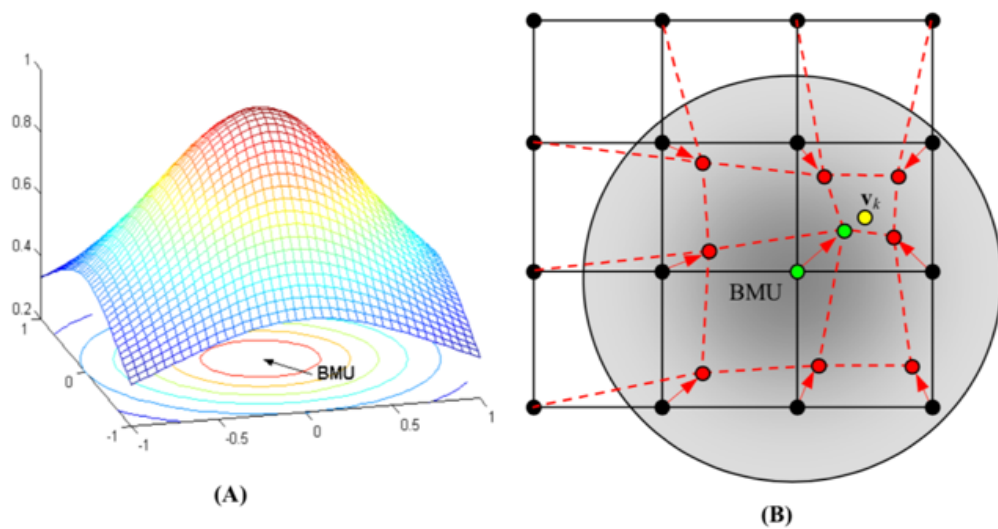


Figura 3.13: Ajuste dos pesos da vizinhança do BMU e aproximação dos neurônios. Em (A) pode-se notar a projeção do efeito da função de vizinhança, em (B) o efeito da adaptação dos neurônios em relação a suas distâncias do neurônio vencedor. O neurônio BMU recebe a maior taxa de adaptação - Fonte Zuchini et al. (2003).

mesmo dobrar a grade de modo que melhor se adapte ao conjunto de dados originais apresentados na entrada da rede. Na Figura 3.14 é mostrado uma visão da grade elástica do SOM com inicialização linear do vetor de pesos onde os pontos vermelhos, verdes e azuis são pesos referentes às suas características.

3.4.3 Treinamento do algoritmo SOM

Existem basicamente dois tipos de treinamento para a rede SOM:

1. **Algoritmo em lote:** A atualização dos pesos é aplicada somente após todos os elementos do conjunto de treinamento ser apresentado à rede;
2. **Algoritmo incremental:** Neste tipo de treinamento, os pesos sinápticos dos neurônios são atualizados toda vez que um item de dados é apresentado na camada de entrada. Este algoritmo é adequado em casos onde o conjunto de dados não está disponível em sua totalidade, ou seja, os dados são apresentados logo após serem coletados. Sua implementação é considerada computacionalmente de custo baixo e exige um menor espaço de memória para sua execução.

O Algoritmo 1 é descrito a seguir em sua forma mais usual, consiste no treinamento do SOM incremental.

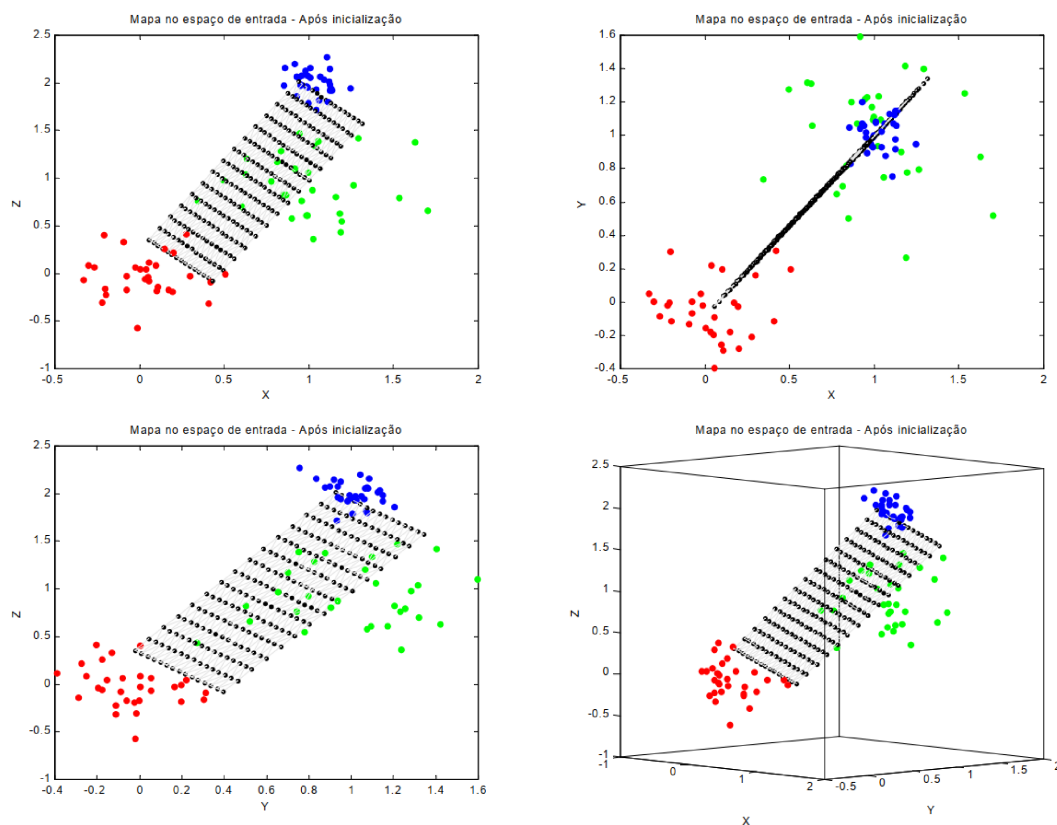


Figura 3.14: Inicialização linear do vetor de pesos dos neurônios - Fonte Zuchini et al. (2003).

Algoritmo 1 - Treinamento SOM

1. Iniciar o vetor de pesos w_i do neurônio i por alguma das seguintes estratégias: a) aleatoriamente, b) utilizando elementos do conjunto de dados apresentado e c) linearmente.
2. Selecionar um vetor de dados e aplicar à entrada. Essa etapa deve ser menos custosa possível, e um critério bastante comum é utilizar os dados na ordem de armazenamento por exemplo;
3. Calcular o neurônio vencedor BMU utilizando a distância Euclidiana como métrica, descrita na equação 3.5;
4. Atualizar os pesos do neurônio BMU e seus vizinhos conforme a equação 3.7
5. Atualizar a função de vizinhança g e a taxa de aprendizagem α .

Repetir o passo 2 para cada um dos vetores do conjunto de treinamento até que a rede atinja

algum critério de parada, normalmente um número de épocas estimado ou quando não houver mais atualizações significativas nos pesos.

3.4.4 Interpretação do mapa produzido pelo SOM

Muito embora a ideia principal do algoritmo SOM seja uma aproximação forte do mapeamento de funções neurais do cérebro biológico, que sugere a construções de arranjos bidimensionais, é possível redimensionar e adaptar o algoritmo SOM para que sejam possíveis outras interpretações do resultado.

A escolha da melhor forma de visualização dos mapas depende da aplicação e do modelo mapeado. Alguns dos métodos mais usuais são apresentados a seguir:

3.4.4.1 Arranjos Unidimensionais

Embora seja pouco explorado na prática, o Arranjo Unidimensional (AU) tem sido usado basicamente para demonstrações do comportamento do algoritmo SOM (ERWIN; OBERMAYER; SCHULTEN, 1992). O algoritmo unidimensional mais conhecido é o KNIES (*Kohonen Network Incorporating Explicit Statistics*). A ideia básica do algoritmo é iniciar os neurônios em forma de um "anel", geralmente formado por poucos neurônios, colocados próximos ao centro de massa, onde o processamento é realizado em duas etapas: a fase de atração e repulsão. A primeira é caracterizada por atrair os seus vizinhos próximos ao sinal apresentado. Já na segunda, os neurônios que não estão na área do neurônios BMU são afastados mantendo a variância e média constantes.

3.4.4.2 Arranjos Bidimensionais, Cilíndricos e Toroidais

Outra forma de representar a saída SOM é por arranjos bidimensionais. Estes são representados por uma estrutura de vizinhança planar ou hexagonal, visto nas Figura 3.15(a) e (b) respectivamente. Além disso, também existem outras formas de representar os dados, que são vistos nas Figuras 3.15(c) cilíndrico e (d) Toroidais. No trabalho de Vesanto, Alhoniemi et al. (2000) são apresentados estes modelos com maiores detalhes.

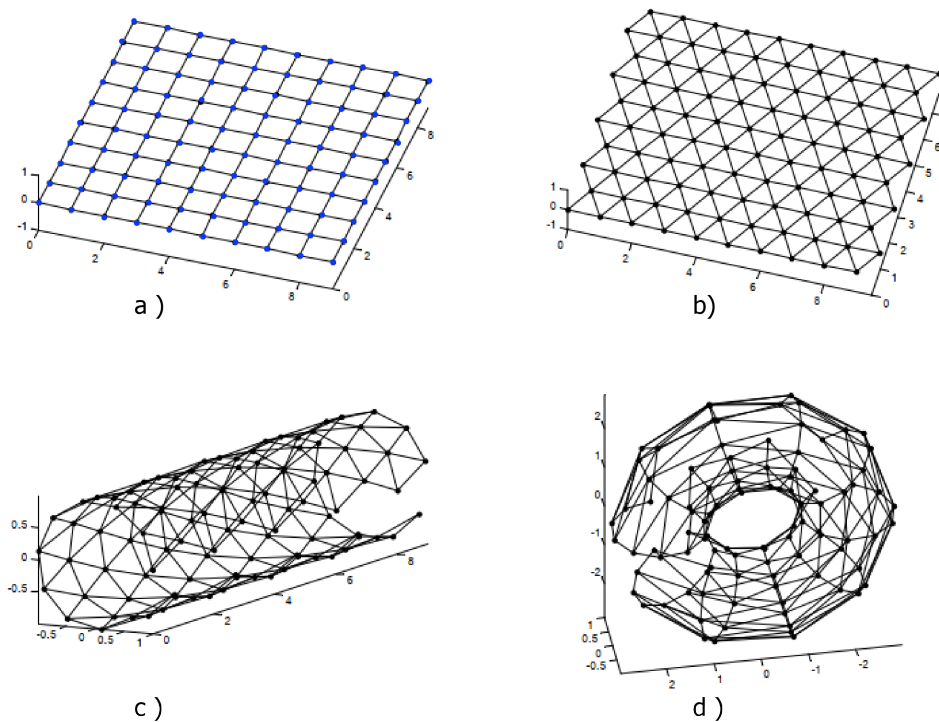


Figura 3.15: Diferentes formatos para arranjos SOM.

3.5 Técnicas de Filtragem

Para que o processo de identificação e classificação de *spikes* seja realizada com êxito é recomendável que o sinal seja processado afim de realizar melhorias e otimização.

Um sinal pode ser filtrado de forma analógica ou digital. O propósito de qualquer filtro é selecionar componentes de sinal. Isso está associado ao processo da passagem do sinal em bandas de frequências específicas, denominada banda de passagem, e rejeitar a banda de frequência indesejada, denominada banda de rejeição. Um sinal pode ser filtrado tanto na forma analógica quanto na digital (SADIKU; ALEXANDER; MUSA, 2014). A grande diferença entre estas duas técnicas é que os sinais analógicos são processados de forma contínua, já na forma digital o sinal é amostrado e quantizado, ou seja, toda a informação do sinal é obtida em intervalos de tempo iguais e digitalizada.

A classificação dos filtros pode ser descritas como: passa-baixa, passa-alta, passa-faixa e rejeita-faixa.

Um filtro passa-baixa rejeita componentes de alta frequência e permite a passagem de baixas frequências. De modo contrário, o filtro passa alta rejeita as componentes de baixa frequência e permite as de alta frequência. O filtro passa-faixa, ou também conhecido como

passa-banda permite a passagem de uma faixa específica do sinal, geralmente intermediária. O filtro rejeita-faixa permite a passagem das frequências fora da banda de rejeição. Normalmente as frequências que separam a banda de passagem da banda de rejeição é chamada de frequência de corte.

Em alguns casos os filtros reais normalmente apresentam algumas ondulações que são denominadas de *ripples*, na banda de passagem e na banda de rejeição. Isso normalmente está diretamente associada à ordem do filtro que influencia diretamente sobre os aspectos tal que, quanto maior à ordem do filtro melhor é a resposta em frequência (WIDMANN; SCHRÖGER; MAESS, 2015). Outra opção de classificação dos filtros é em função da resposta e tecnologia adotada. As funções mais conhecidas estão ilustradas na Figura 3.16 onde são apresentadas as curvas-respostas dessas aproximações.

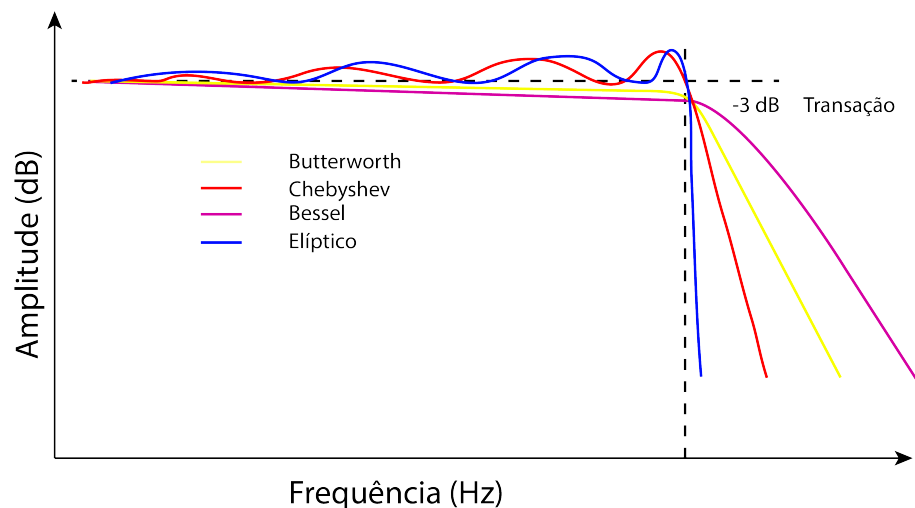


Figura 3.16: Curvas de respostas dos filtros Butterworth, Chebyshev, Bessel e Elíptico.

O filtro Butterworth é frequentemente usado nos casos onde se deseja obter uma curva com atenuação uniforme e uma curva plana da banda de passagem, no entanto frequências fora dessa banda não serão atenuadas. Já o filtro elíptico, também conhecido como filtro de Cauer, tende a manter oscilações na banda de passagem e na banda de corte, porém com uma atenuação acentuada fora da banda de passagem. O filtro de Chebyshev mantém um decaimento acentuado, alta atenuação na banda de passagem e na banda de corte. E o filtro de Bessel possui ondulações na banda de passagem, porém com menor atenuação na banda de corte (WIDMANN; SCHRÖGER; MAESS, 2015).

Para que um sinal seja amostrado de forma adequada, é necessário que tenha amplitude suficiente e frequência máxima de duas vezes a frequência de amostragem. São diversas técnicas para a filtragem de sinais, seja analógico ou digital.

3.5.1 Filtragem Digital

Basicamente a filtragem digital pode ser feita de duas maneiras, baseadas em respostas ao impulso infinitas (IIR - *Infinite Impulse Response*) ou por respostas ao impulso finitas (FIR - *Finite Impulse Response*).

A escolha do tipo de filtro a ser usado irá depender da aplicação, e as características sempre devem ser levadas em consideração uma vez que, filtros FIR apresentam memória finita, sempre apresentará execução estável e qualquer transitório terá efeito limitado. Por outro lado, este tipo de filtro necessita de vários coeficientes, exigindo um maior custo computacional e consequentemente um tempo de processamento maior. Já filtros IIR tem um menor tempo de processamento e menor custo computacional, porém apresentam características de corte de frequência acentuado com um filtro de baixa ordem (ANTONIOU, 2016).

3.5.1.1 Filtros IIR

Também conhecido como filtros recursivos, que, apresentam realimentação na saída, são filtros que tem sua execução rápida e não tem necessidade de convolução, por isso sua resposta a uma entrada impulso não é finita (ANTONIOU, 2016). Usualmente filtros IIR podem ser escritos da forma da Equação 3.9:

$$y(n) = \sum_{i=0}^{L-1} b_i x(n-i) - \sum_{m=0}^{M-1} a_m x(n-m), \quad (3.9)$$

onde os coeficientes b_i e a_m determinam a resposta do filtro.

3.5.1.2 Filtros FIR

Filtros de respostas ao impulso finitas têm uma estrutura bastante regular na qual são implementados por meio de equações diferenciais que não contenham termos recursivos. O filtro FIR tem resposta de fase linear implicando em não distorção de fase no resultado final filtrado. Esse tipo de filtro apresenta erros de quantização e efeitos de precisão finita menores. De uma maneira geral, filtros FIR podem ser escritos da forma da Equação 3.10:

$$y(n) = \sum_{i=0}^{L-1} d_i x(n-i), \quad (3.10)$$

d_i são os coeficientes do filtro, l é a ordem do filtro, x_n é o sinal de entrada do filtro e $y(n)$ a

saída do filtro.

3.6 Técnicas para redução de dimensionalidade dos dados e atributos

Diferentes abordagens podem ser encontradas em relação à redução de dimensionalidade de atributos, e normalmente são classificadas em duas abordagens: técnicas de seleção e de transformação de características.

3.6.1 Técnicas de Seleção

O processo de seleção é fundamentado em quatro partes essenciais: geração, avaliação, critério de parada e validação de resultado de cada subconjunto. A etapa de geração prevê a criação dos subconjuntos baseando-se em algum critério específico de pesquisa onde, os melhores subconjuntos anteriores são usados para avaliação dos subconjuntos gerados. Assim, deve-se definir a priori uma estratégia de avaliação. Caso os novos subconjuntos sejam melhores aos anteriores, estes serão substituídos. Este processo se repete até atingir algum critério de parada previamente estabelecido. Sendo assim, quando o melhor subconjunto é então selecionado, este por sua vez precisa passar por uma validação utilizando um conjunto de dados teste e um algoritmo de classificação. Se um algoritmo indutivo for utilizado, a classificação de característica é classificada em duas técnicas, filtragem e *wrapper*. O primeiro usa características intrínseca dos dados para avaliar a adequabilidade do subconjunto, sendo que este método geralmente não tem um custo alto em sua implementação, visto que utilizam algoritmos de indução em sua implementação (LIU; YU, 2005). Já o segundo, tem uma implementação com um custo um pouco mais alto uma vez que, algoritmos de mineração são usados (agrupamento, classificação, entre outros). Este método seleciona características mais condizentes à mineração quando comparado aos métodos de filtragem (SILVA et al., 2011).

3.6.1.1 Seleção de atributos por Filtragem

Está técnica tem como objetivo eliminar os atributos irrelevantes segundo algum critério antes de iniciar o treinamento. A ideia geral do algoritmo é considerar algumas características gerais do conjunto de treinamento para selecionar alguns atributos relevantes e desconsiderar os outros.

Sendo assim, para algoritmos de aprendizagem de máquina (AM), os métodos de filtragem

são considerados independentes uma vez que os algoritmos de AM receberão apenas exemplos contendo atributos que tenha significância para o problema a ser processado.

A Figura 3.17 apresenta um fluxograma do funcionamento do algoritmo.

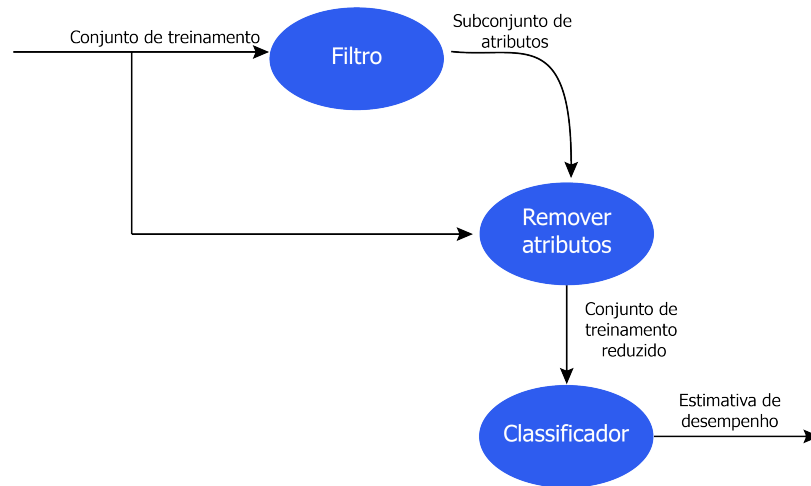


Figura 3.17: Fluxograma da seleção de atributos pelo método da filtragem.

3.6.1.2 Seleção de atributos por Wrapper

Nesta técnica o algoritmo de classificação é executado para cada subconjunto de atributos, e a avaliação é feita com base na acurácia preditiva do algoritmo. O subconjunto com o melhor desempenho de aprendizagem é definido como o melhor subconjunto de atributos. Estes algoritmos possuem critérios de parada e seleção de busca distintos (LIU; MOTODA, 2007). A abordagem wrapper pode ser vista na Figura 3.18.

3.6.2 Técnicas de Transformação

Também conhecida como técnicas de extração ou redução de características, esse método é baseado na criação de um subconjunto totalmente novo, alterando seu espaço inicial de característica para representar os dados. É um método bastante difundido no meio científico onde sua metodologia é baseada na extração de componentes importantes presentes nos dados originais, normalmente utilizada em formação de clusters. A PCA (*Principal Component Analysis*) é uma das abordagens mais clássicas desse método, sendo sua funcionalidade relacionada à combinação linear de um conjunto de vetores que melhor descreve a variância dos dados (XU, 2005). Além disso, é considerado um dos principais métodos não supervisionados para redução de dimensionalidade fornecendo aproximações lineares para um determinado conjunto de dados.

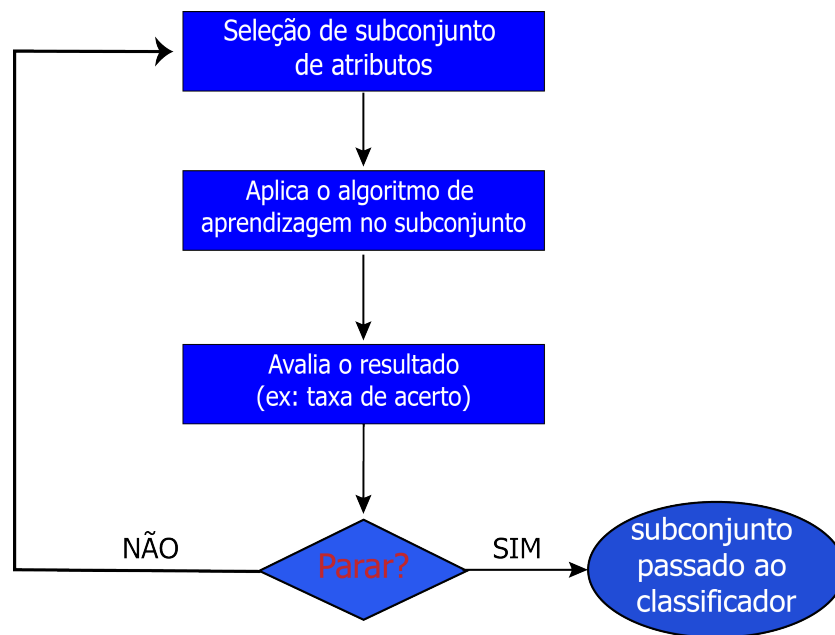


Figura 3.18: Fluxograma da seleção de atributos pelo método da Wrapper.

3.7 Considerações Finais

Neste capítulo foi apresentada a contextualização relativa ao tema de pesquisa desta tese, redes neurais artificiais e técnicas para transformações de dados. No próximo capítulo será descrita a metodologia adotada nesta tese onde será abordada a obtenção dos dados reais das culturas de neurônios, transformação dos dados, o processo de estimacão dos neurônios sobre os microeletrodos, além da identificação dos tipos de neurônios e o *framework* desenvolvido para a visualização dos dados.

Capítulo 4

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os principais métodos utilizados no desenvolvimento desta tese. Inicialmente na Seção 4.1 é descrito sucintamente a estrutura do sistema desenvolvido através do diagrama de blocos. Na Seção 4.2 é descrita a cultura de neurônios in vitro realizada na Universidade de Gênova, Itália, que possibilitou a obtenção dos dados utilizados ao longo dos experimentos realizados nesta tese. Na Seção 4.3, são mostradas as principais partes do framework desenvolvido. Na Seção 4.4 é descrito o método para a análise dos sinais e aplicação do mapeamento para a obtenção de uma figura bidimensional de distribuição associada à cultura de neurônios em MEA. Na Seção 4.5 é descrito o método utilizado para a classificação dos neurônios mapeados em função da morfologia dos respectivos spikes. Em seguida são apresentadas as considerações finais na Seção 4.6.

4.1 Estrutura do Sistema Desenvolvido

Existem na literatura uma grande variedade de softwares que são utilizados para o pós-processamento dos dados observados em registros utilizando MEAs, no entanto estes nem sempre são acessíveis por serem de alto custo. Além disso, eles podem apresentar uma complexidade bastante alta no manuseio, leitura dos dados e conseqüentemente na análise. Nesta tese optou-se pelo desenvolvimento de um *framework* para análise de dados observados na matriz de microeletrodos com objetivo bastante específico de estimar a distribuição neurônios. As funcionalidades implementadas são funções mais procuradas quando se trata de software para análise de registros eletrofisiológicos.

A estimação da distribuição de neurônios é uma tarefa bastante complexa que exige um alto custo computacional. Uma forma convencional de se visualizar a distribuição de neurônios sobre a MEA é o uso de imageamento fotográfico da microscopia, porém, para a obtenção das

imagens fotográficas são necessários cuidados para que a cultura não se degrade e assim, impossibilite a leitura dos sinais emitidos pelos neurônios. Sabe-se que, diversos fatores influenciam na vida da cultura tais como, pH do meio, temperatura, entre outras.

Considerando-se a importância da estimativa dos neurônios sobre a MEA, foi proposto o desenvolvimento de um *framework* capaz de suprir a necessidade da microscopia externa fazendo uma análise dos sinais captados para a detecção de *spikes* e inferir um número proporcional de neurônios bastante próximo da cultura. Esses neurônios são aleatoriamente distribuídos numa superfície 2D e posteriormente auto-organizados.

O sistema desenvolvido é descrito com o uso do diagrama de blocos da Figura 4.1, que ilustra as principais etapas da metodologia. No canto esquerdo superior é ilustrada a entrada de dados de uma cultura de neurônios *in vitro* em MEA. Logo em seguida, os dados são pré-processados utilizando-se de uma técnica denominada de *fast-ICA* (HYVÄRINEN; OJA, 2000), que permite modificar os sinais originais de forma que os sinais referentes aos eletrodos de MEA sejam independentes entre si. Em seguida, todos os sinais são filtrados para a remoção de ruídos. Essa etapa é necessária para que na etapa seguinte, de detecção de *spikes*, sejam evitados falsos positivos.

Após essa filtragem ocorre o processo de identificação de *spikes* sendo essa escolha opcional. Após a detecção dos *spikes*, resulta uma sequência de *bits* por eletrodo, como codificação de existência (*bit 1*), ou não (*bit 0*), de *spikes* a cada instante discreto do tempo. Essa codificação é utilizada na estimativa da topologia da distribuição dos neurônios, realizada com a aplicação da rede neural SOM, cujo resultado é visualizado em um mapa bidimensional contendo a posição dos eletrodos e dos neurônios virtuais estimados.

Em paralelo ao procedimento da estimativa da topologia da distribuição dos neurônios, o procedimento de classificação de *spikes* emitidos pelos neurônios é realizado, conforme ilustrado no lado direito da figura. Neste caso, nos mapas da distribuição de neurônios estimados são mostrados os neurônios em classes distintas de forma diferenciada.

4.2 Base de Dados: Cultura de Neurônios *in vitro* Utilizada

Os materiais usados nos experimentos da tese foram obtidos em culturas *in vitro* de neurônios corticais do hipocampo de ratos Wistar após 18 dias de desenvolvimento, extraídas após anestesia, realizados na Universidade de Gênova, Itália. Ressalta-se que os experimentos realizados para a aquisição dos sinais seguiram rigorosamente as orientações e aprovação do conselho de ética da Universidade de Gênova. Os procedimentos para o sacrifício e extração das células

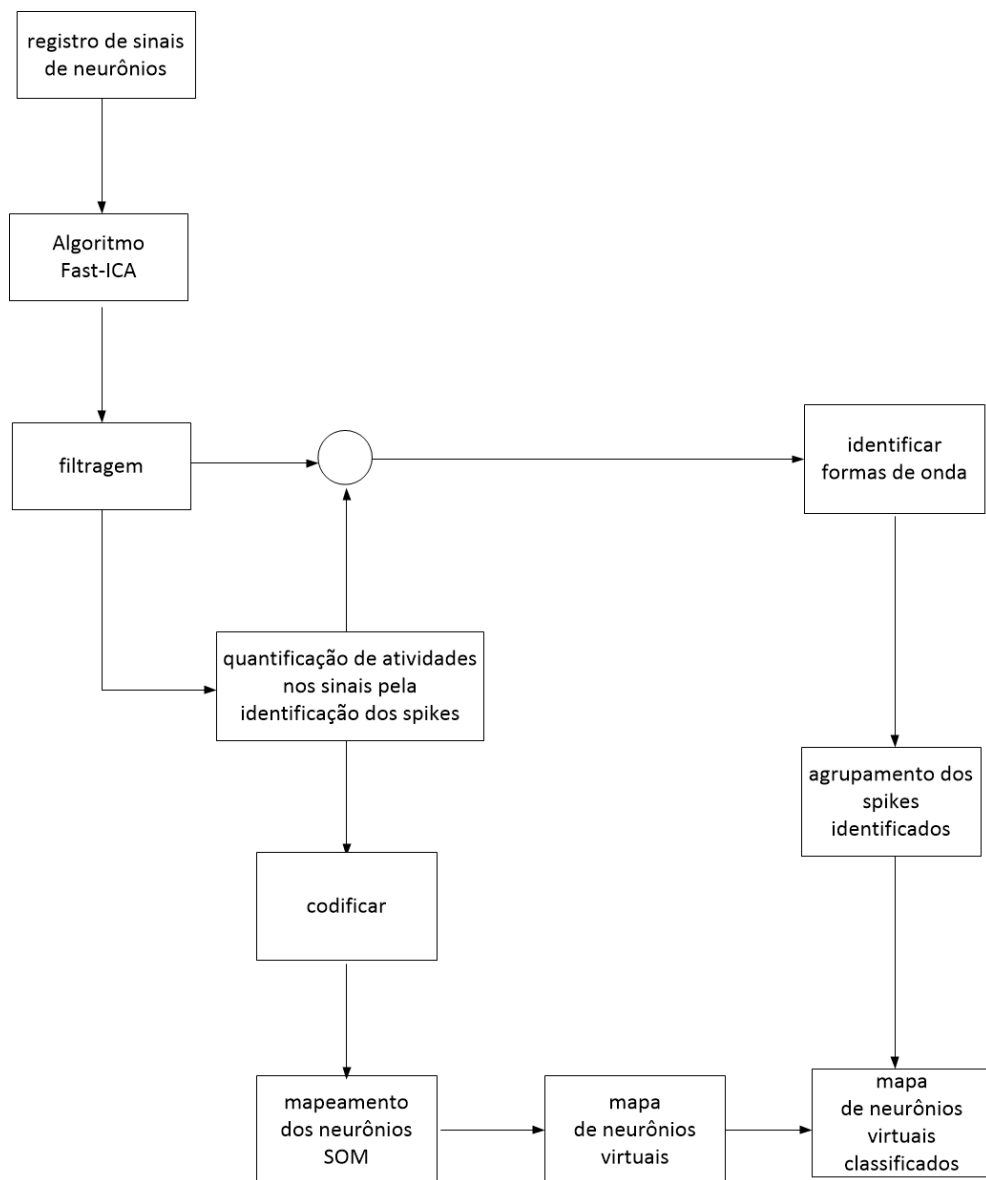


Figura 4.1: Ilustração de todo o processo para quantificar, estimar e classificar os neurônios ao redor dos microeletrodos através dos registros de atividades espontâneas.

podem ser consultadas em (NOVELLINO et al., 2003). O uso destes dados foi possível por meio de uma parceira com o grupo de pesquisa com a Universidade Federal de Uberlândia - MG, onde eles cederam os dados para a pesquisa.

As MEAs usadas continham 60 eletrodos, em grade 8x8, sem os eletrodos dos cantos, e o eletrodo 15 usado como aterramento, e confeccionados pela empresa Multichannel Systems, na Alemanha. O sistema de registro utilizado é denominado de MEA60. O registro das atividades fisiológicas utilizando a MEA60 ocorre da seguinte forma: a MEA com os neurônios cultivados *in vitro* é conectada a um banco de 59 amplificadores, cada um associado a um microeletrodo da MEA, sendo o ganho obtido pelos amplificadores de 1200.

O aparato de medição é também acrescido de um sistema de controle de temperatura, um microscópio invertido, uma mesa anti-vibração e uma gaiola de Faraday¹.

Para o registro dos sinais eletrofisiológicos, a cultura foi manuseada conforme as seguintes especificações em cada dia de registro de sinais: a cultura era removida de uma incubadora com CO₂ e colocada sobre o aparato de aquisição de sinais, MEA60. Após a espera de 20 minutos do posicionamento das células, tempo suficiente para as mesmas se adaptarem ao novo ambiente, as medidas eram iniciadas.

Após o registro, a cultura retornava novamente à incubadora. A cultura foi identificada como 371, e os registros ocorreram nos DIV's 25, 29, 32, 36, 39, 43 e 46, onde DIV significa dias *in vitro*. A duração do registro de cada DIV foi de 20 minutos.

No DIV38 foi realizado um procedimento de imageamento fotográfico de microscopia da cultura. Foi utilizado um microscópio convencional Olympus BV51M, com câmera CAMEDIA C-7070, com resolução de 3,1 megapixels. Foram tomadas seis imagens de diferentes regiões de grupos de microeletrodos, usando lentes objetivas com zoom de 10 vezes. Posteriormente essas imagens foram compostas numa única imagem conforme Figura 4.2 e realizado o processamento de determinação dos neurônios e posições dos microeletrodos, resultado na Figura 4.3.

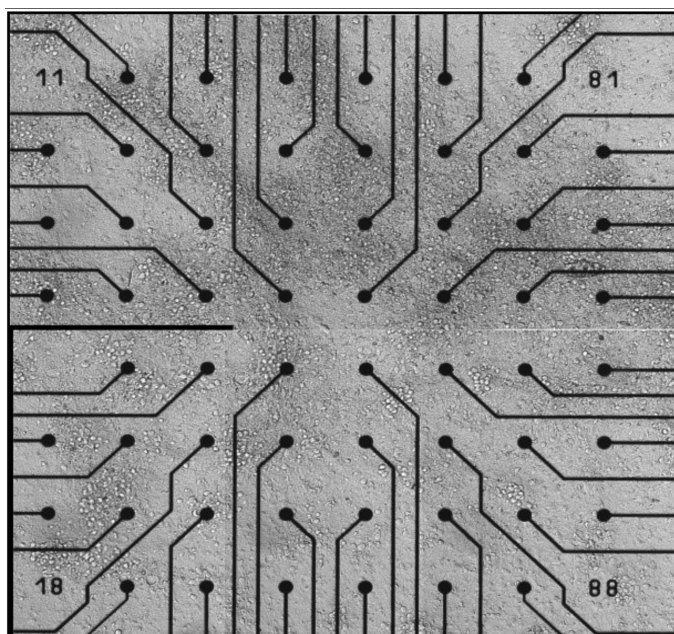


Figura 4.2: Registro fotográfico da Microscopia do DIV38 após a junção das seis imagens.

Os neurônios são vistos em pequenos círculos vermelhos 4.3 e os eletrodos em pontos

¹Um campo elétrico externo faz com que as cargas se rearranjam, cancelando o campo interno, uma blindagem eletrostática.

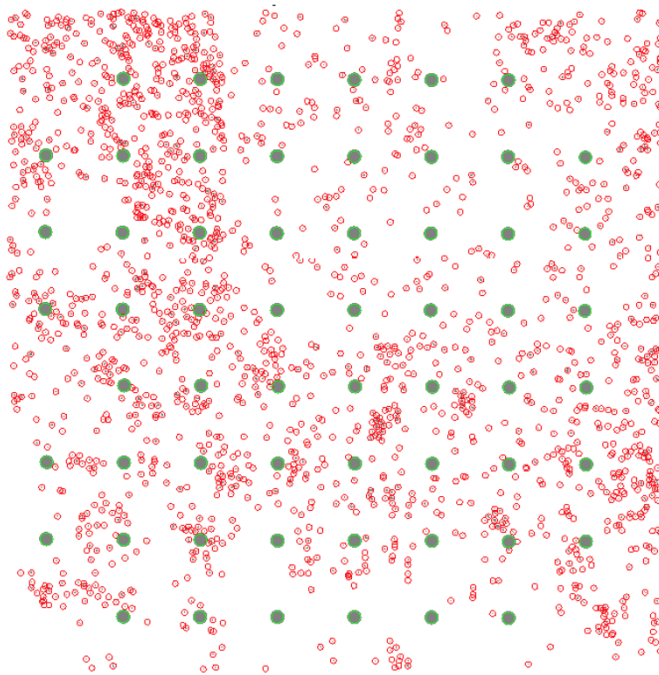


Figura 4.3: Resultado do processamento para determinar as posições dos neurônios e dos microeletrodos do registro fotográfico do DIV38.

escuros em grade 8x8. Esse processamento fotográfico foi realizado por João Fernando Mari, conforme descrito por Saito (SAITO et al., 2013).

4.2.1 Identificação dos microeletrodos na MEA

Afim de de identificar os microeletrodos na MEA utilizada na Cultura 371, a seguinte regra de notação é considerada:

1. um microeletrodo, ou simplesmente eletrodo, é identificado por dois dígitos decimais;
2. o dígito da esquerda representa o número da coluna na grade 8x8, sendo que o número 1 é a primeira coluna da esquerda para a direita;
3. o dígito da direita representa o número da linha, sendo que o número 1 é a primeira linha de cima para baixo e;
4. as notações 11, 18, 81 e 88 são portanto correspondentes às posições dos cantos da grade 8x8 e não são utilizadas, e o eletrodo 15 é utilizado para aterramento da MEA.

4.2.2 Filtragem dos Sinais

Como visto na Seção 3.5, foram apresentadas algumas técnicas de filtragem. Nesta tese foi utilizado, na etapa de pré-processamento dos sinais, o filtro passa banda Butterworth (F_1 de 400Hz e F_2 de 2450 Hz) que apresenta uma resposta em frequência plana na banda passante, conforme observado na Figura 4.4.

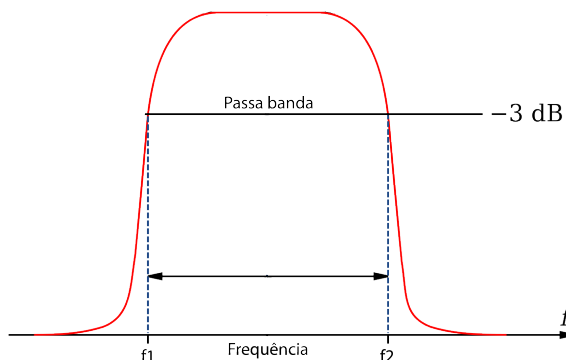


Figura 4.4: Espectro de amplitude da resposta de um filtro Butterworth.

Utilizando o pacote Scipy do Python, foi implementado para a fase de pré-processamento dos dados o filtro passa banda de Butterworth com intuito de reduzir a quantidade de ruído experimental do registro dos sinais dos neurônios. A Figura 4.5 refere-se a uma amostra do sinal do microeletrodo 44 do DIV 25 da Cultura 371, antes e depois da filtragem, em azul e vermelho respectivamente. A primeira etapa ao processar dados contínuos é aplicar um filtro de passagem de banda para evitar atividades de baixa frequência e visualizar os picos, esta abordagem foi seguida conforme o trabalho de Quiroga, Nadasdy e Ben-Shaul(2004). Visivelmente percebe-se uma redução do ruído presente no sinal, que deve proporcionar um cálculo de *threshold* (limiar) mais apropriado na identificação dos *spikes* como mostra o trabalho de Quiroga, Nadasdy e Ben-Shaul (2004). A Figura ?? é referente a uma amostra do sinal do eletrodo 12 do DIV39 e a Figura ?? do eletrodo 67, DIV46.

4.3 Framework: Estrutura do Software para Análise de Sinais

O *framework* desenvolvido nesta tese foi projetado baseando-se nas técnicas de projeto de engenharia de software. Estas técnicas permitem o desenvolvimento de softwares com funcionalidades adaptáveis, flexíveis e reutilizáveis. A Figura 4.6 refere-se ao diagrama de classes do *framework* desenvolvido para a organização das informações a serem manipuladas.

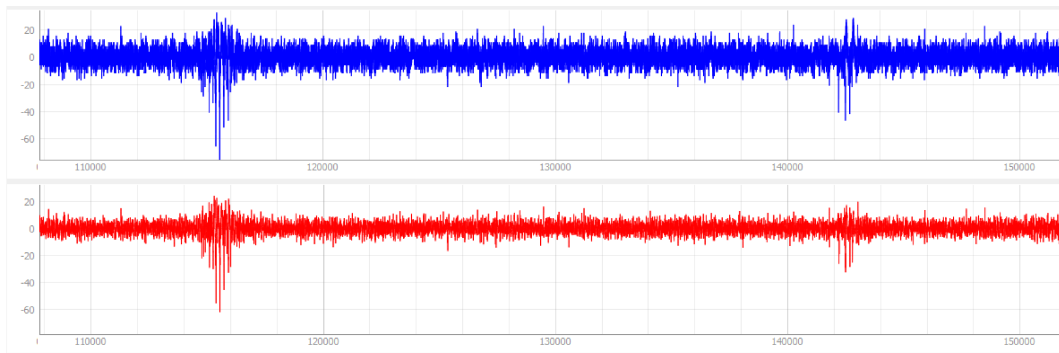


Figura 4.5: Amostra do sinal original sem filtro (azul) e sinal filtrado com filtro passa-banda Butterworth (vermelho) do microeletrodo 44 do DIV25.

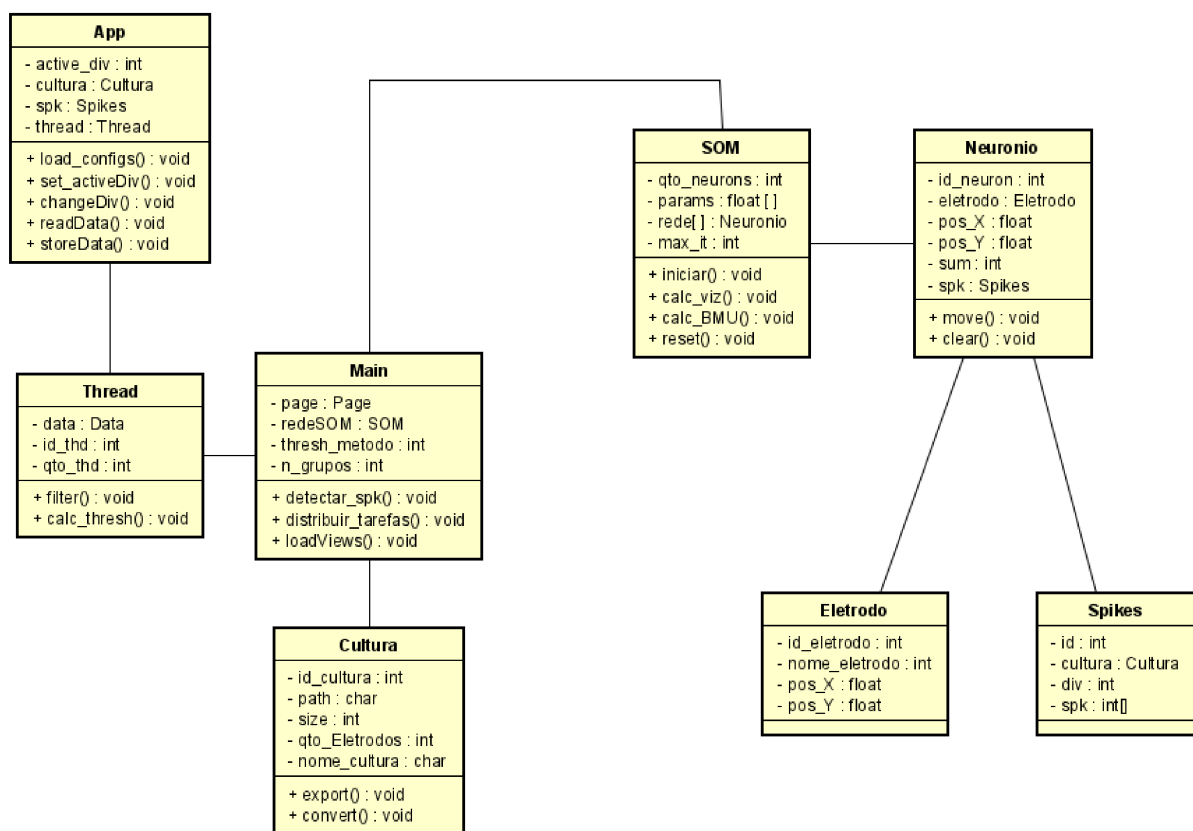


Figura 4.6: Diagrama de classes do *framework* para o pós-processamento dos sinais eletrofisiológicos registrados em MEA.

4.3.1 Padrões de Desenvolvimento

A arquitetura adotada na criação do framework foi baseada no padrão de arquitetura MVC, do inglês *Model, View, Controller* ((KRASNER; POPE et al., 1988). Neste padrão, o software é basicamente dividido em três camadas:

1. Modelo, que representa a lógica específica da aplicação para manipulação dos dados;

2. Visão, responsável por renderizar o conteúdo planejado no modelo, permitindo o acesso aos seus estados e assim, podendo, definir como serão apresentados;
3. Controle, responsável por processar as requisições e enviá-las à camada modelo. Além disso, ela também é responsável por selecionar as classes da camada de visão que serão apresentadas.

Este padrão de projeto provê um desenvolvimento organizado fazendo com que o software se torne reutilizável, de fácil manutenção visto que os códigos podem ser modificados de forma individual. Além do padrão MVC, também foi utilizado o padrão *FrontController* que associa os padrões definidos na tecnologia J2EE, usado como organização interna do framework (ALUR et al., 2003). A finalidade deste padrão de desenvolvimento é evitar que várias requisições sejam replicadas na camada da lógica de controle do núcleo, direcionando essas requisições para um ponto central do sistema, evitando inconsistência na aplicação. Originalmente, o padrão foi desenvolvido para softwares que utilizam a plataforma de desenvolvimento J2EE (*Java 2 Enterprise Edition*), no entanto o mesmo também pode ser aplicado em outras tecnologias, como no caso desta tese que foi utilizada a linguagem Python 3.7 com as bibliotecas Pandas, Scipy, Scikit-learn, Keras, Numpy entre outras.

O padrão *Composite View*, também usado nesta tese, sugere que o software disponha de uma visão principal, ou seja, uma visão mais geral do sistema e separe as interfaces da aplicação em múltiplos *frames* onde cada um deles fica responsável pela apresentação de um conteúdo específico dentro da aplicação, conforme a requisição enviada pelo usuário. Vale lembrar que este padrão é frequentemente utilizado em diversos softwares uma vez que ele permite a modificação parcial dos *layouts* sem a necessidade da reorganização geral do software, evitando problemas na camada de visualização (ALUR et al., 2003). Na Figura 4.7, pode-se observar um diagrama de sequências no envio de uma requisição para os módulos internos do *framework*, onde os principais elementos podem ser observados.

Como pode ser observado na Figura 4.7, o padrão *FrontController* é explícito pelo controlador principal que processa todas as requisições enviadas pela camada de visualização. Logo a seguir é visto o controlador dos módulos que é responsável pelo processamento das funcionalidades disponíveis como: detectar *spikes*, processar a filtragem dos dados, desenhar os histogramas, e mapas da estimativa dos neurônios sobre os microeletrodos. Uma vez recebida uma requisição, o processador de módulo faz a chamada aos componentes de negócio, podendo este chamar outros componentes ou não. Após o recebimento dos dados dos componentes é então chamada a camada para visualização dos resultados e/ou armazenamento deles.

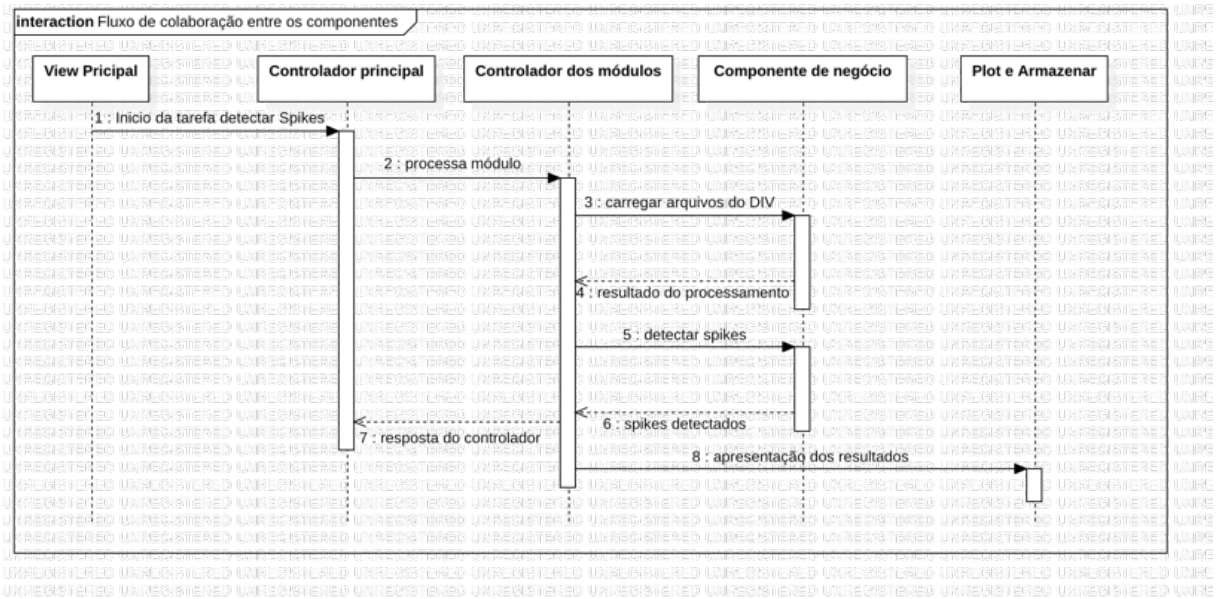


Figura 4.7: Diagrama de sequência de uma requisição de identificação de *spikes*.

4.3.2 Interfaces Gráficas

Nesta seção serão apresentadas as principais funcionalidades do *framework* que serão descritas a seguir.

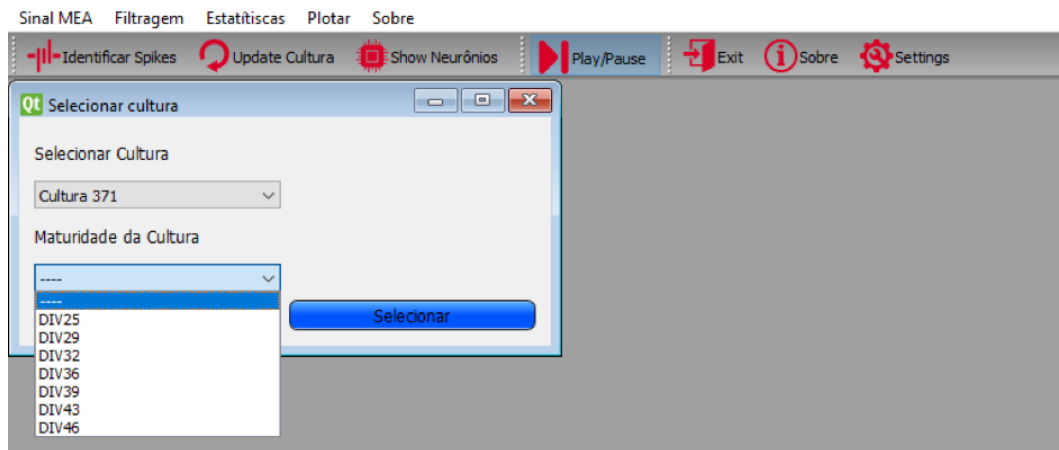


Figura 4.8: Interface de usuário para seleção da cultura e DIV na qual se deseja analisar. Aqui é possível selecionar as culturas pré-carregadas ou importar novos dados de outras culturas no formato *.mat*.

Para o pré-processamento dos dados é necessária a escolha prévia da cultura e de qual DIV o usuário decidirá trabalhar, como pode-se observar na Figura 4.8. Também é possível carregar dados de culturas que não estão armazenados nos arquivos de configurações do *framework*.

Na interface da Figura 4.9 observa-se as configurações do limiar de identificação dos *spikes*, a quantidade de *spikes* que formam um *burst* e qual filtro será aplicado no pré-processamento

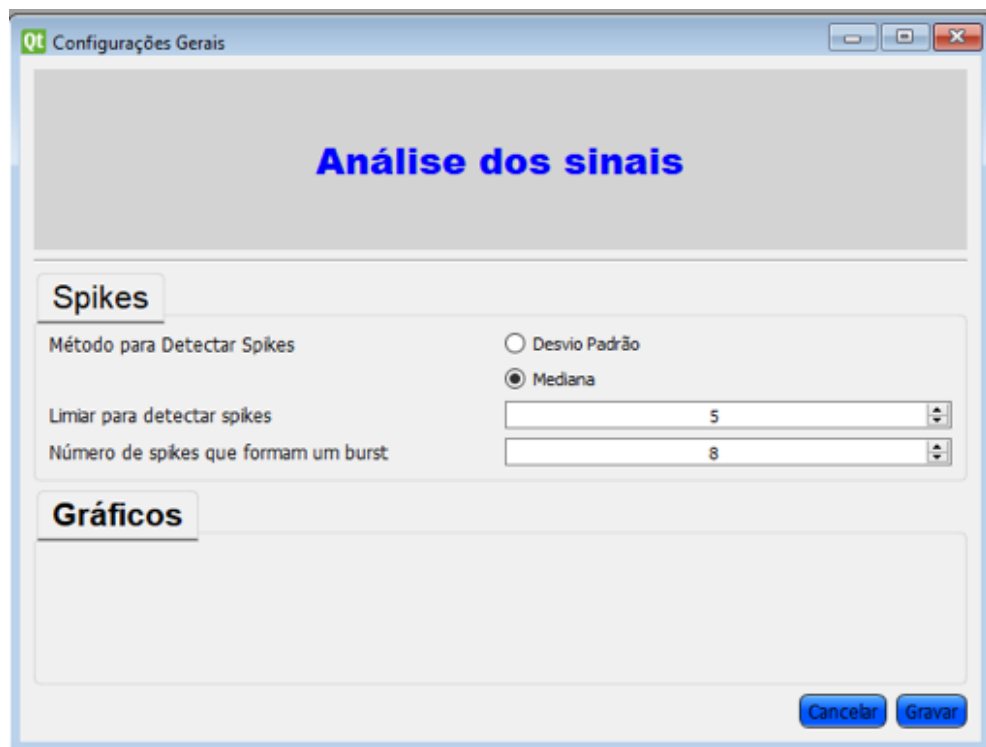


Figura 4.9: Configurações gerais da aplicação onde é possível especificar método de detecção dos spikes, limiar e número de *spikes* que foram um *burst*.

dos dados para a identificação dos *spikes*.

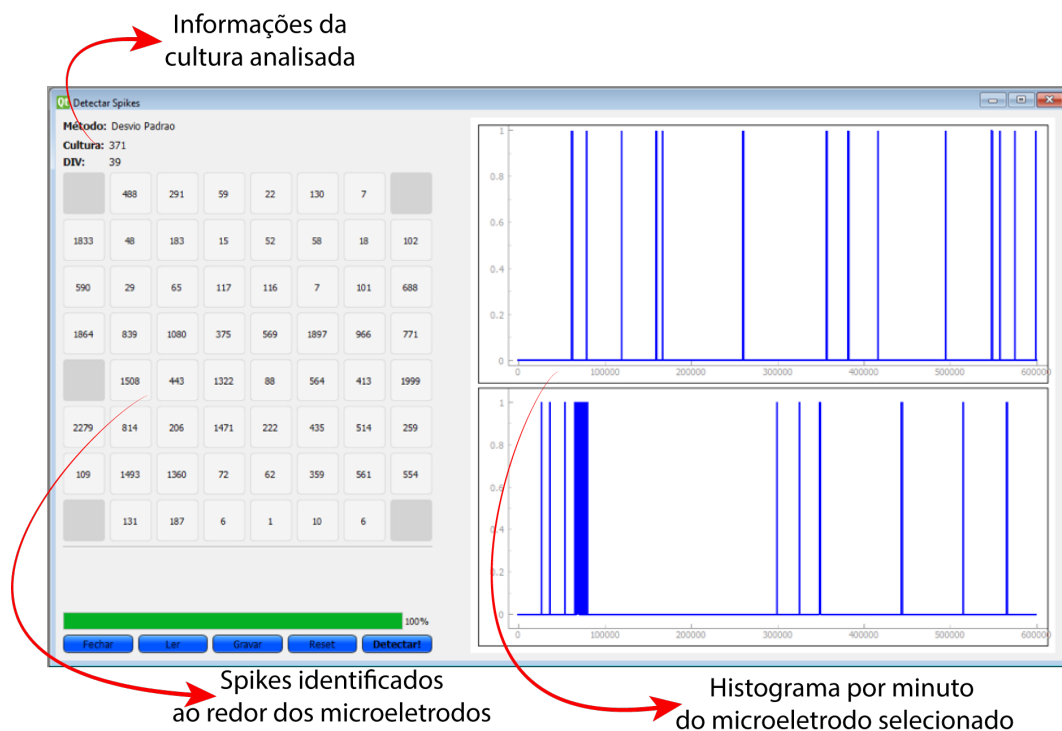


Figura 4.10: Interface para visualização e identificação dos *spikes* em cada microeletrodo. É possível importar e gravar a identificação em arquivo, no formato txt, csv e mat.

Após o processamento da filtragem e identificação dos *spikes*, o usuário poderá verificar os resultados por eletrodo, como pode ser observado na Figura 4.10. Além disso, caso o usuário deseje verificar o tempo no qual o *spike* ocorreu, basta o usuário selecionar a posição do eletrodo no qual ele deseja analisar e verificar o resultado na lateral direita da Figura 4.10.

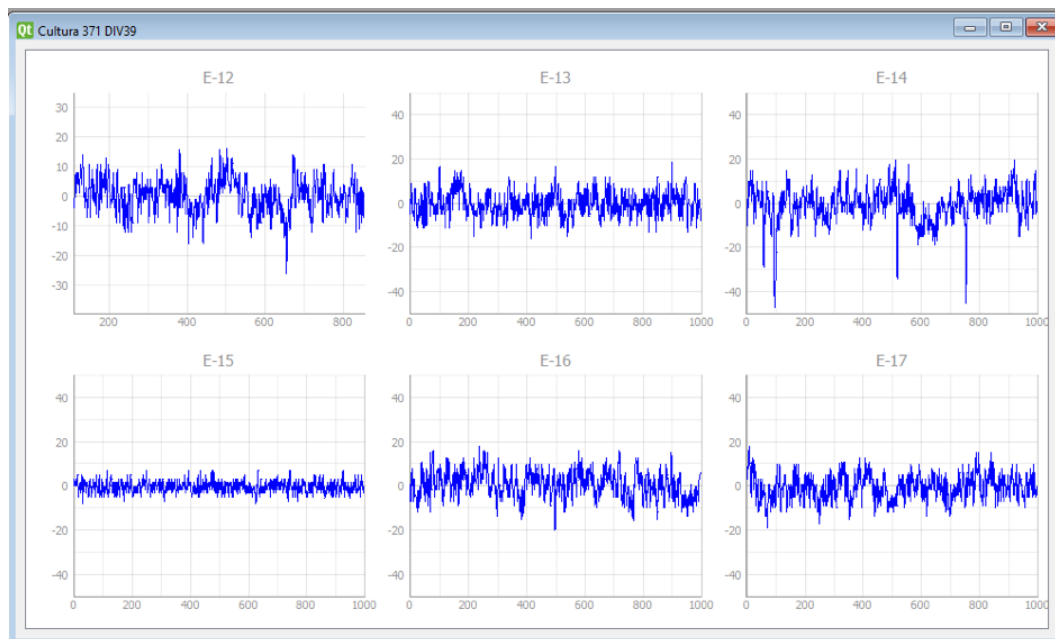


Figura 4.11: Visualização dos dados da cultura selecionada. É possível escolher dados antes da filtragem, pós filtragem e plot com as marcações dos *spikes* com ou sem agrupamento por forma de onda.

O *framework* dispõe de uma funcionalidade para análise visual do sinal sem nenhum pré-processamento. Essa funcionalidade é útil para acompanhar o sinal na forma que foi registrado sem aplicação de nenhum filtro. É possível selecionar um zoom de até 100x no sinal. Na Figura 4.11 é mostrada essa funcionalidade onde os sinais por eletrodo são plotados.

A Figura 4.12 referencia-se a interface da principal funcionalidade do *software* desenvolvido nessa tese onde as configurações e acompanhamento em tempo real do processo de estimação do número de neurônios sobre os microeletrodos na MEA é visto. A interface é composta por um menu lateral onde são introduzidas as configurações, e ao lado direito é possível ver uma malha em forma de matriz, forma análoga a uma matriz de microeletrodos. No menu lateral na parte superior o usuário tem como parâmetros os dados da cultura a ser processada que são: seleção da cultura, qual dia será analisado e caso deseje é possível selecionar um intervalo de tempo entre 1 a 20 minutos. Logo abaixo, são apresentados os parâmetros da rede SOM. Aqui o parâmetro de aprendizagem, nomeado para taxa de aproximação e largura da vizinhança, ambos serão detalhados na Seção 4.6. E por fim, no canto esquerdo inferior são configurações de apresentação do mapa (Plot) que são: tamanho da circunferência que representa o neurônio,

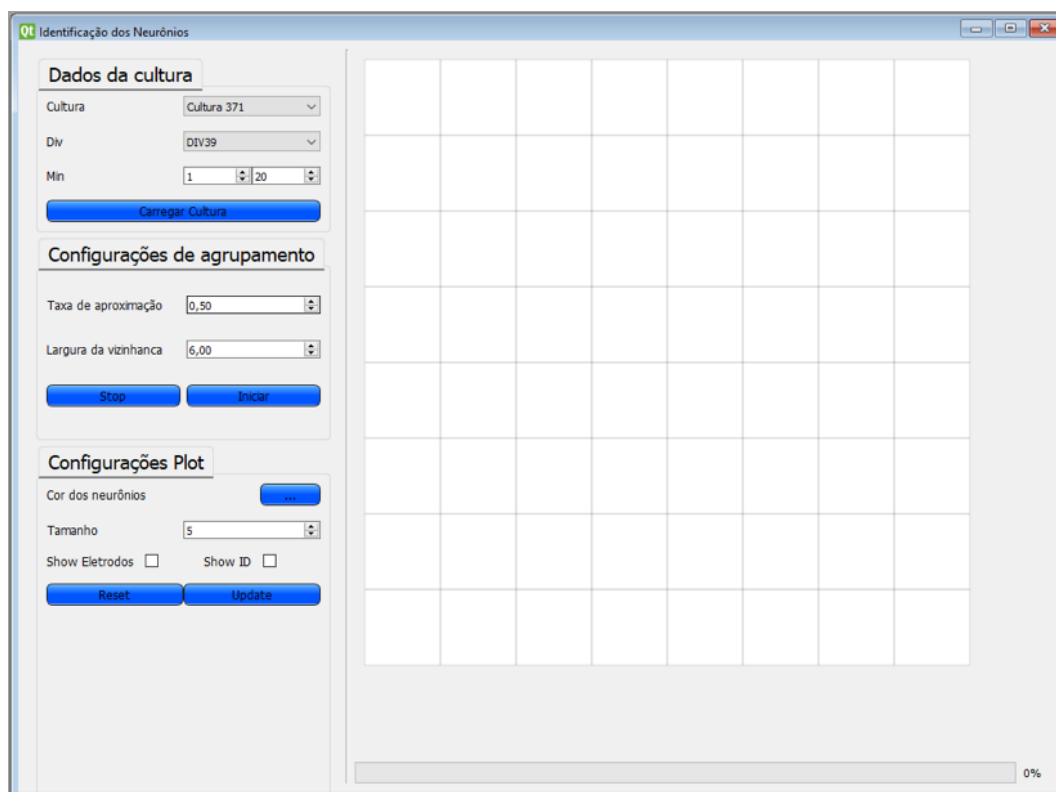


Figura 4.12: Interface onde toda a configuração da estimativa de neurônios é inserida. Existem três grupos de configuração: a) dados da cultura – seleção da cultura e DIV que se deseja estimar, é possível especificar intervalo por minutos. b) configuração da estimativa – taxa de aproximação e largura efetiva da vizinhança. c) configurações de visualização – tamanho e cor dos neurônios virtuais, exibir os neurônios e identificação.

cor, exibição dos microeletrodos e suas referências matriciais.

4.4 Detecção de *Spikes* e Mapeamento Topológico dos Neurônios Virtuais

Nesta seção é descrito como os sinais registrados da Cultura 371 serão processados para a obtenção do mapeamento topológico dos neurônios virtuais. Inicialmente, descreve-se as técnicas de identificação dos *spikes* e em seguida, os procedimentos para a codificação dos dados resultantes para ser utilizado no procedimento do mapeamento topológico.

4.4.1 Identificação de *Spikes*

O item mais investigado no estudo de sinais neurológicos é a identificação de picos (*spikes*), isso porque eles representam a ocorrência de potenciais de ação. Sendo assim é de suma importância uma identificação que seja confiável. É encontrado na literatura diversos trabalhos

que utilizam um limiar fixo como normalmente é feito em sistemas de detecção on-line de *spikes*. Sendo assim, é importante lembrar que detectar essas atividades é um compromisso entre determinar um limiar que não seja um valor muito alto, pois isso levaria o sistema a não detectar vários *spikes* e um limiar muito baixo fazendo com que o sistema identifique muitos falsos positivos, incluindo possivelmente elevações na amplitude causadas pelo ruído.

Frequentemente é adotado um limiar automático que, geralmente é um múltiplo do desvio padrão (POUZAT; MAZOR; LAURENT, 2002). Porém, em alguns casos o desvio padrão pode definir um limiar muito alto, principalmente em sistemas com altas taxas de disparo e uma grande amplitude de pico. Para contornar este problema nesta tese foi definido um limiar definido por Quiroga, Nadasdy e Ben-Shaul, (2004), Equação 4.1.

$$Thr = 5\alpha_n \quad \alpha_n = \text{mediana}(|x|)/0,6745 \quad (4.1)$$

onde, Thr é o valor do limiar, α_n é uma estimativa da mediana do ruído de fundo dos 20 minutos de registro e x é o sinal filtrado. Observa-se que o uso da estimativa baseada na mediana evita a interferência causada pelos picos, isso se justifica pelo fato de que picos equivalem a uma pequena fração do total de amostras. A Figura 4.13 refere-se a um experimento onde foi simulado 10 segundos de sinal de ruído de fundo, onde o desvio padrão é unitário.

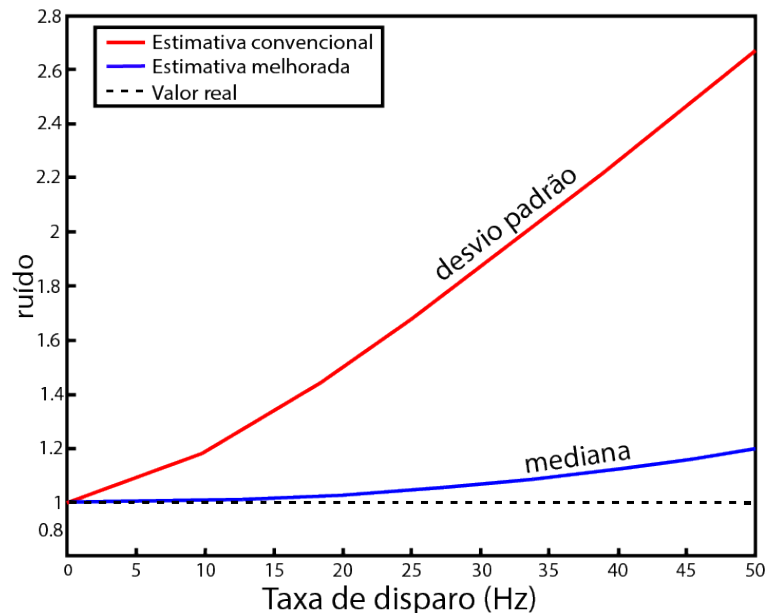


Figura 4.13: Comparação entre o método convencional e o proposto por Quiroga para identificar *spikes*.

Ao decorrer do tempo, foram adicionados picos de um neurônio simulado aumentando gradativamente a taxa de disparo. É notado que quanto maior a taxa de disparo, mais a estimativa

baseada no desvio padrão aumenta o nível de ruído, enquanto que a estimativa baseada na mediana permanece próxima do valor real.

A Figura 4.14 referencia-se a alguns instantes de registro da Cultura 371 no DIV39 capturada pelo eletrodo 12. Note que é possível observar um limiar alto quando utilizado um múltiplo do desvio padrão fazendo com que um pico não seja identificado, gerando um falso negativo, por outro lado é possível notar que o método baseado na estimativa proposta por Quiroga identifica corretamente os *spikes*.

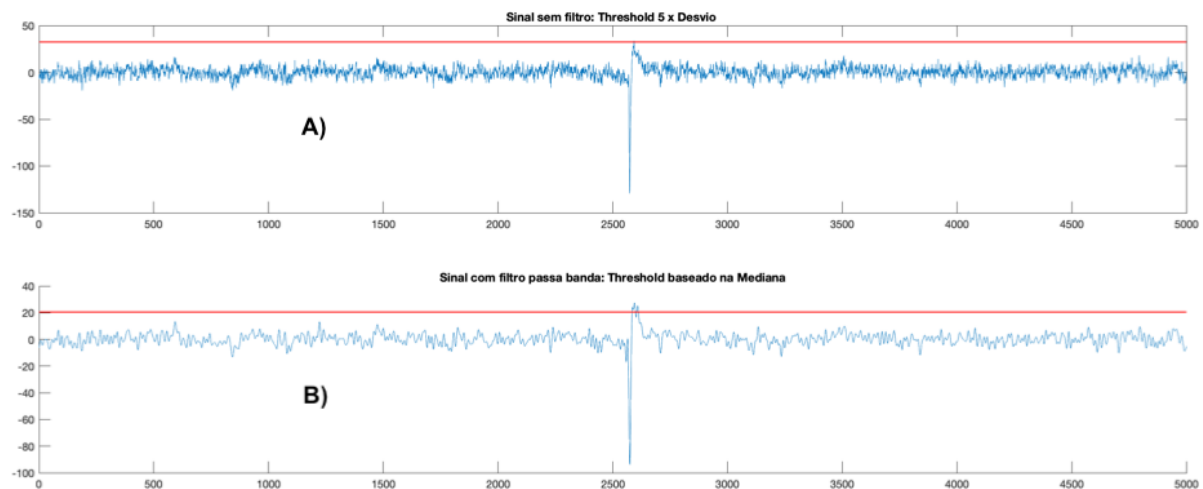


Figura 4.14: Sinal do canal 12 da Cultura 371 do DIV39, em (A) pode-se observar o sinal sem a utilização do filtro e com limiar definido em 5x o desvio padrão. Em (B) o sinal está filtrado com banda de passagem e limiar baseado na mediana.

Antes do processo de identificação e contagem do número de *spikes* um filtro do tipo não causal é aplicado em cada sinal com intuito de reduzir ao máximo os ruídos presentes dos registros.

Este processo é de fato uma das principais etapas em direção à contagem correta de *spikes* uma vez que, após a filtragem, o cálculo do limiar é definido. Matematicamente, o limiar é calculado através do método proposto por Quiroga, Nadasdy e Ben-Shaul, (2004), quando se leva em conta o múltiplo da mediana calculado sobre o ruído biológico, conforme Equação 4.1

Após a detecção dos *spikes*, os seguintes parâmetros são extraídos:

- a) Número total de *spikes*;
- b) Quantidade de *spikes* que formam um *burst* (número de *bursts*);
- c) Amplitude dos *spikes*;
- d) Frequência média de *spikes* em um *burst* (*spikes/s*)

Estes parâmetros serão melhor avaliados no Capítulo 5 onde é visto separadamente, para cada eletrodo, uma análise estatística do número de neurônios estimado em relação aos tipos de *spikes* identificados, intensidade do pulso, número de *spikes* gerados e a frequência na qual eles acontecem.

4.4.2 Codificação dos *Spikes* para Redução de Dimensionalidade dos Dados de Entrada

A codificação dos *spikes* para a redução da dimensionalidade dos dados em função do tamanho total das amostras de cada eletrodo, ou seja, para cada eletrodo há 20 minutos de registro (um vetor de aproximadamente 12.000.000 de amostras).

Processar dados com essa dimensionalidade é uma tarefa que exigiria muito recurso computacional, e a redução de dimensionalidade tem como objetivo extrair características que melhor represente um conjunto de dados suficientemente grande em um conjunto de dados menor. Limitar o conjunto de dados em representações mais relevantes simplifica a representação e, consequentemente, faz com que o processamento seja mais rápido e exija menos memória (JAIN, 2000).

Um método para representar os dados foi desenvolvido visando a extração de características intrínsecas à análise de dados cujo registro tenha sido realizado de forma extracelular, ou seja, por microeletrodos presentes na MEA. Neste contexto o que se pretende buscar é o número de disparos detectados pelo processamento de identificação de *spikes*. Visto que a entrada do método desenvolvido é baseada em pulsos, ou seja, em *spikes* identificados, uma codificação foi proposta para que o processo de estimativa de neurônios pudesse ser executado. O processo de codificação é bastante simples, e basicamente consiste em remover a coluna relativa ao tempo onde nenhuma atividade foi identificada. Em outras palavras, no processo de identificação de *spikes*, foi desenvolvida uma matriz de entrada em que na direção horizontal o tempo aumenta da esquerda para a direita, e na direção vertical cada linha representa um microeletrodo. Onde é inserido o número 1 indica a existência de um *spike*, caso contrário, 0.

Na Figura 4.15 é ilustrado o processo de codificação do vetor de spike. Em (A) observa-se os sinais registrados pelos microeletrodos no experimento 371, e já filtrados; No item (B) é visto o armazenamento do resultado da identificação dos *spikes*, onde em cada linha, o vetor resultado, que forma uma linha da matriz, é igual ao tamanho do vetor do registro dos dados, onde 1 significa atividade neural e 0 sem atividade. Observa-se pelas colunas 1, 2, 3, 12 e 15 não existem *spikes*. No item (C) são retiradas essas colunas onde nenhum eletrodo captou atividade, e posteriormente, (D) é a matriz já codificada e com sua dimensão reduzida.

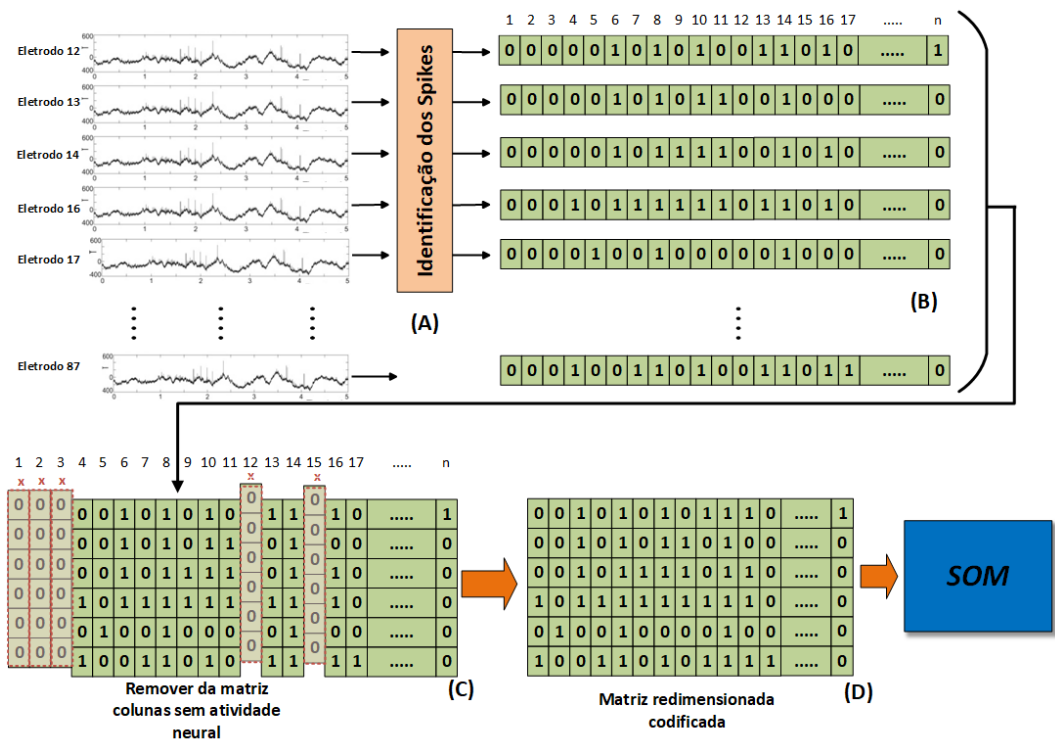


Figura 4.15: Ilustração do redimensionamento da matriz de atributos e codificação para a entrada na rede neural SOM.

4.4.3 Mapeamento para a obtenção dos neurônios virtuais usando SOM

Várias propostas tem sido desenvolvidas baseadas no algoritmo dos mapas auto organizáveis. Nesta tese foi desenvolvido um método que possibilita a geração de mapas otimizados da estimativa do número de neurônios ao redor dos eletrodos em função dos *spikes* registrados, neurônios denotados aqui como virtuais utilizando como entrada os *spikes* identificados em cada canal da MEA. Os neurônios virtuais são representados por suas coordenadas x , y , respectivamente, no espaço cartesiano.

Sendo assim, o funcionamento do algoritmo de mapeamento é bastante similar à concepção original do algoritmo SOM proposto por Kohonen, porém, algumas modificações foram inseridas no modelo para se adequar ao ambiente baseado em medidas de sinais elétricos em MEA. A princípio uma grade de entrada SOM é criada baseada em uma estrutura MEA, ou seja, cada entrada SOM está associada a um microeletrodo da MEA, onde, a rede SOM terá 59 neurônios em uma grade 8×8 , lembrando que os vértices das extremidades não são considerados e o eletrodo 15 é utilizado como referência. Isso possibilitará a analogia com a medida de sinal nos experimentos de registro eletrofisiológicos utilizando MEA.

Naturalmente, cada elemento de entrada é associado a um neurônio, assim como no algoritmo SOM. A principal modificação está na medida de similaridade, sendo que, aqui ao

invés de se utilizar a distância Euclidiana é utilizada a codificação de *spikes* onde a escolha do neurônio BMU é em função de qual neurônio de saída, ou neurônio virtual, captou um número maior de pulsos e aplicar uma aproximação linear em direção aos neurônios de entrada que geraram a atividade.

A escolha do neurônio BMU, Equação 4.2, é realizada pelo somatório (*pot*) dos pulsos da vizinhança de cada neurônio de saída.

$$pot_j = \sum_i^n n_i \Rightarrow BMU = argmax_{j=1..N}[pot_j] \quad (4.2)$$

onde n_i indica a codificação relativa à existência do *spike* no neurônio de entrada i . Sendo $n_i = 1$ indicando a existência de *spike* e $n_i = 0$, caso contrário; n é o número de neurônios considerados na vizinhança. O BMU é identificado como aquele neurônio que obteve o maior somatório de pulsos de entrada, dentre todos os N neurônios de saída. No caso de empate de neurônios BMU em posições distantes, o algoritmo considera como vencedor os dois fazendo com que o processo atualize os seus pesos e vizinhança normalmente. Entende-se como posição distante, aquela em que as vizinhanças não se interceptam. O processo de estimativa dos neurônios virtuais é feito conforme os passos do Algoritmo 1:

Algoritmo 1: Estimativa de Neurônios Virtuais

Dados: $M \leftarrow$ matriz de entrada
Resultado: $S \leftarrow$ Estimativa da distribuição de neurônios virtuais

- 1 Iniciar os parâmetros λ e σ ;
- 2 Distribuir aleatoriamente um número N de neurônios virtuais no espaço S ;
- 3 **enquanto** não houver mais modificações significativas nos neurônios virtuais ou até o fim do vetor de entrada **faça**
- 4 Aplicar uma coluna da matriz M na entrada da rede;
- 5 Calcular o neurônio BMU;
- 6 Atualizar os pesos da BMU e seus vizinhos;
- 7 Atualizar a largura efetiva da vizinhança;
- 8 **fim**

Os neurônios virtuais representam uma estimativa do número de neurônios presentes na MEA. A Figura 4.16 refere-se as fases do método proposto nesta tese, onde é possível perceber que a organização dos neurônios virtuais é feita utilizando uma aproximação do neurônio BMU ao neurônio de entrada.

O parâmetro σ é referente ao tamanho da vizinhança efetiva inicial. Este parâmetro decai ao longo das iterações do algoritmo. A taxa de aprendizagem λ , especifica a velocidade na qual os pesos dos neurônios virtuais contidos dentro da vizinhança Gaussiana do neurônio BMU se

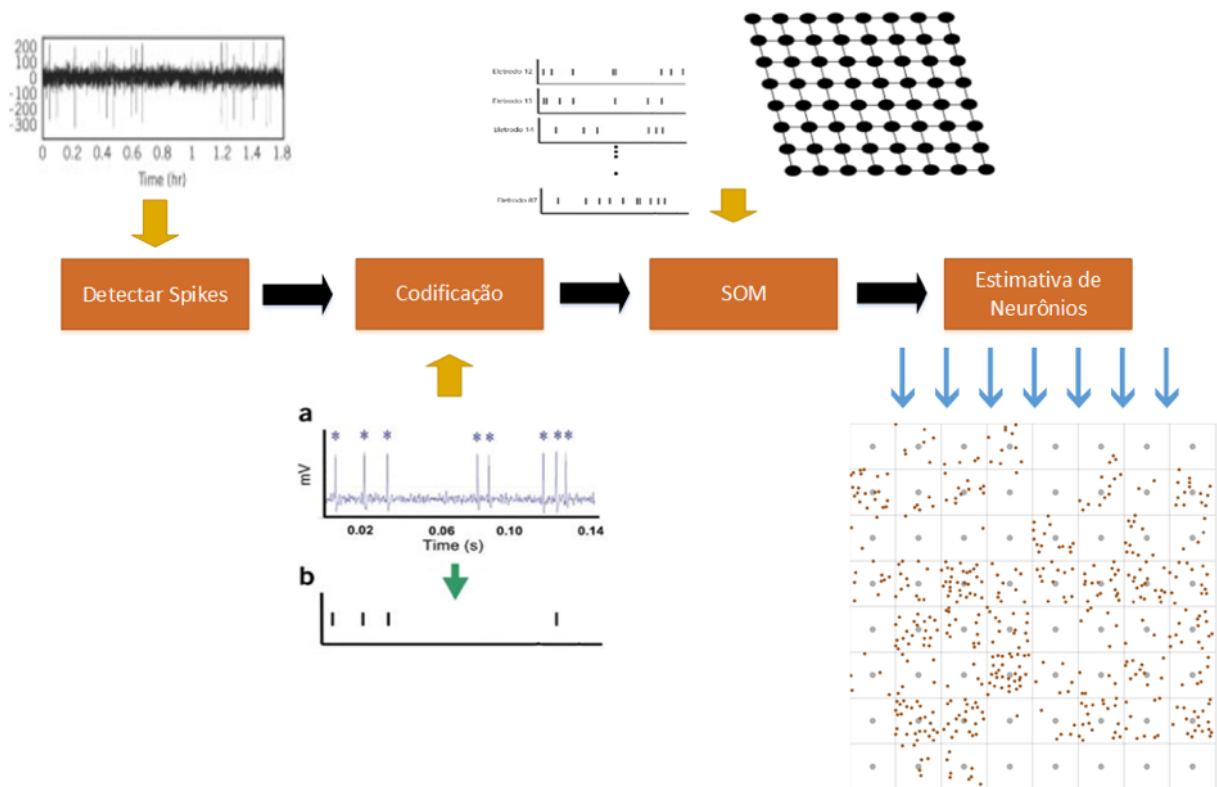


Figura 4.16: Método para estimar a densidade populacional dos neurônios virtuais sobre os microeletrodos na MEA.

aproximam da entrada. Esta aproximação leva em consideração a distância efetiva, ou seja, é calculada a distância Euclidiana de cada neurônio virtual em relação ao BMU, quanto mais próximo do neurônio BMU maior será o efeito da aproximação, por outro lado, quanto mais distante, menor será o efeito da atração. Isso porque, para um *spike* captado por um eletrodo x , menor é a probabilidade de neurônios distantes terem influenciado o mesmo. A escolha deste parâmetro é baseada na média da soma dos potenciais de ação normalizados. Um valor muito próximo de 1 faz com que o algoritmo aproxime os neurônios em poucos passos, fazendo com que o algoritmo superestime a localização dos neurônios, por outro lado um número próximo a 0 faz exatamente o contrário, fazendo com que o algoritmo não modifique o posicionamento dos neurônios ao longo do tempo. Evidentemente a média é um bom valor para o início do algoritmo. Este parâmetro também decai com o tempo fazendo com que os neurônios não caiam em mínimos locais.

Alguns cuidados devem ser tomados ao processar o algoritmo de aproximação. O principal fator que pode levar a uma estimativa inadequada dos neurônios é escolher o tamanho da grade de neurônios SOM diferente do experimento, em outras palavras, caso seja utilizada uma MEA de 60 eletrodos nos experimentos é fundamental que a matriz SOM seja uma malha 8x8. Além disso, é importante que os dados sejam filtrados antes do processo de detecção dos *spikes*, visto

que este processo tem como principal atributo o tempo e amplitude do *spikes*. Isso possibilita identificar que, no tempo t o microeletrodo capturou um *spikes*.

Após a identificação do BMU, são aplicadas as Eq. 4.3 e 4.4 para a aproximação dos neurônios vizinhos em direção ao neurônio BMU, sendo n_x e n_y as coordenadas cartesianas do neurônio vizinho, λ é o fator de aprendizagem, $dist$ a distância entre o neurônio vizinho ao BMU. A direção da aproximação do neurônio vizinho é dada pela Eq. 4.5, onde bmu_x e bmu_y são as coordenadas do BMU.

$$n_x = n_x + \cos(dir) \times (-\lambda/dist) \quad (4.3)$$

$$n_y = n_y + \text{sen}(dir) \times (-\lambda/dist) \quad (4.4)$$

$$dir = \arctan(n_y - bmu_y, n_x - bmu_x) \quad (4.5)$$

Na Figura 4.17 é ilustrado o processo sistêmico para a aproximação dos neurônios.

Com as iterações do algoritmo, a tendência do mapa é se auto-organizar mostrando ao término do processo uma estimativa da distribuição dos neurônios naturais, sobre a grade 8x8, correspondente aos microeletrodos da MEA, baseada nas atividades eletrofisiológicas dos neurônios.

De fato, o processo deveria considerar a distribuição aleatórias dos neurônios excitatórios e inibitórios com proporções de 4:1 conforme descrito por Izhikevich (2003). Basicamente a função dos neurônios excitatórios é estimular seu potencial de ação para que um pulso seja gerado, por outro lado os neurônios inibitórios tem o efeito oposto, ou seja, eles tendem a manter o potencial de membrana do neurônio pós sináptico abaixo do limiar. Estes neurônios desempenham uma função importante que é anular ou neutralizar o efeito excitatório, isso acontece na membrana pós-sináptica que possui canais iônicos de cloro, que são controlados quimicamente, causando o efeito da hiperpolarização da membrana diminuindo a probabilidade de gerar um potencial de ação.

Como a existência de neurônios inibitórios não está sendo considerada neste mapeamento proposto, o resultado obtido pode diferir do real na proporção de 25% que é a relação de neurônios inibitórios e excitatórios.

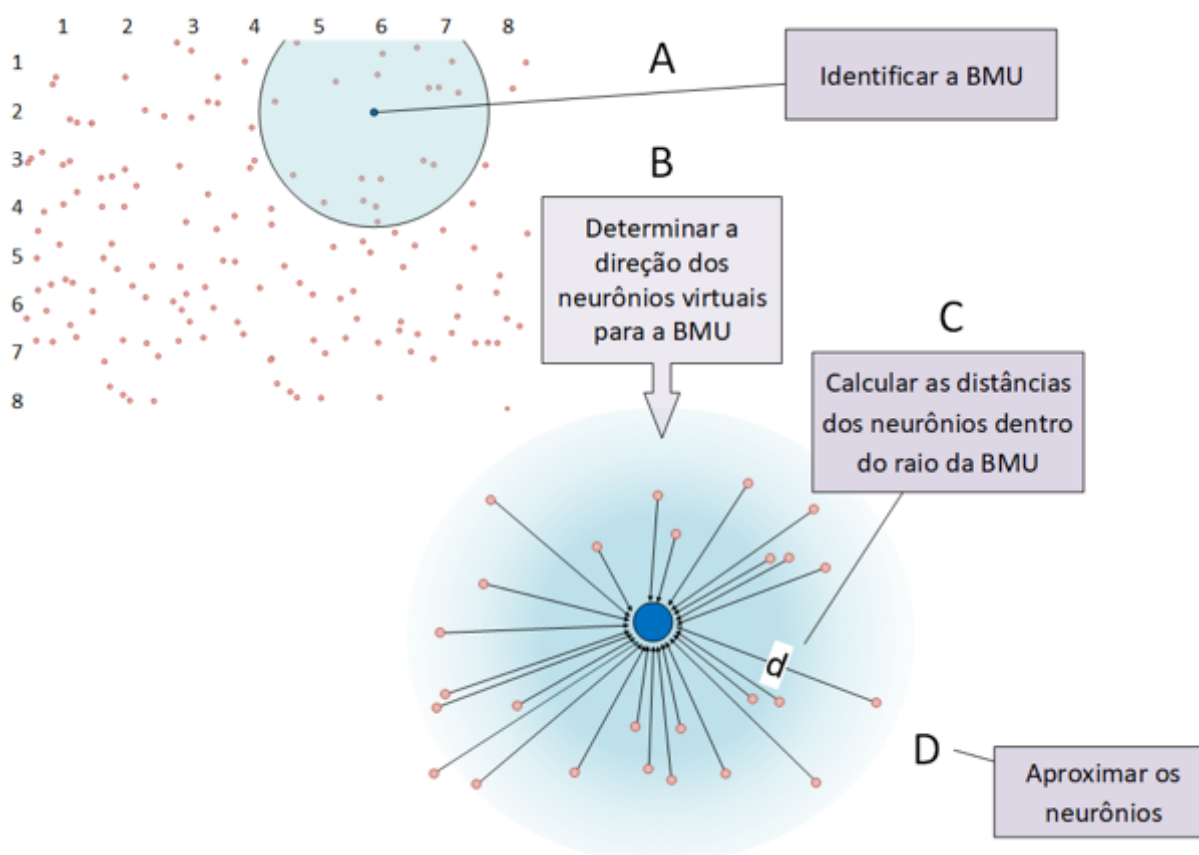


Figura 4.17: Processo de identificação da BMU (A), calcular o número de neurônios e direção para a BMU (B), calcular a distância euclidiana (C) e Aproximar os neurônios que se encontram dentro da vizinhança efetiva (D).

4.5 Agrupamento dos Spikes

Analisar os registros dos dispositivos MEA é uma tarefa complexa porque o processo capta ruídos de fundo e também pelo fato de um microeletrodo captar sinais de mais de um neurônio. O objetivo de agrupar os *spikes* é a sua associação a neurônios específicos. Diversas abordagens tem sido exploradas no agrupamento de *spikes*, e em muitas vezes o processo é baseado em três estágios: (1) detecção de picos, (2) extração de características dos *spikes* e (3) agrupamento das características dos *spikes* identificados (SEGEV et al., 2004; ZHANG, 2003). Neurônios frequentemente produzem picos com características peculiares em sua forma de onda (LEWICKI, 1998). Na Figura 4.18 é ilustrado o formato geométrico de um *spike* identificado em um determinado tempo t .

Rutishauser (2006) mostra em seu trabalho que para um melhor entendimento das funções neurais é preciso conhecer as atividades elétricas, de maneira individual, de vários neurônios e, atribuir cada *spike* a um neurônio em particular. O processo de identificação de todos os impulsos elétricos que representam a atividade de um mesmo neurônio é conhecido como "Spike

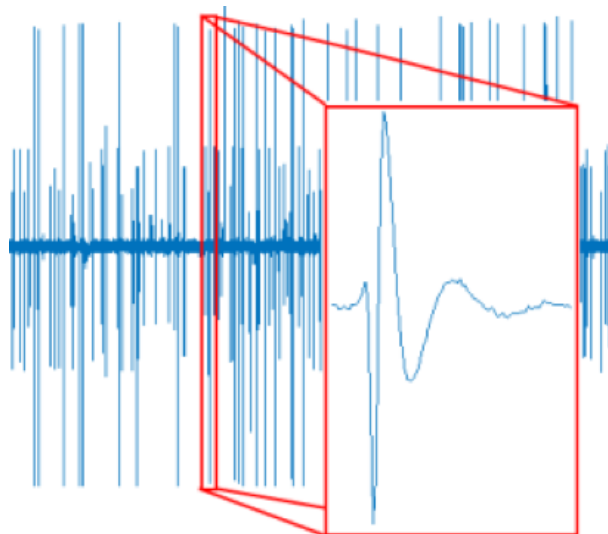


Figura 4.18: Janela de 2 ms de um spike no registro filtrado da cultura 371, DIV 39.

Sorting”(RUTISHAUSER; MAMELAK; SCHUMAN, 2006).

É importante destacar que um mesmo neurônio gera sempre forma única de *spike* com um aspecto bem específico, e uma maneira de qualificar a característica desse pico é o uso de *templates* de *spikes* (WHEELER; HEETDERKS, 1982). Em princípio, a forma de um *spike* registrado de forma extracelular varia dependendo da propriedade morfológica das células, bem como da posição relativa ao eletrodo.

4.5.1 Extração do formato de onda dos *spikes*

A análise de componentes principais, (PCA – *Principal Components Analysis*) é usado normalmente para extração de características principais para o uso em classificadores (LEWICKI, 1998). A ideia principal da aplicação do PCA nesta tese é computar um conjunto ordenado de vetores na base ortogonal que podem ser linearmente combinados para identificar a forma de cada spike detectado. O uso da PCA tem sido bem explorado na extração de características e, basicamente é uma das técnicas mais eficientes nesta tarefa. O método converte um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas num conjunto de valores de variáveis linearmente não correlacionadas, chamadas de componentes principais (LEWICKI, 1998).

Na prática, geralmente as três primeiras componentes principais são usadas para representar a distribuição das características no agrupamento. Normalmente elas são responsáveis por aproximadamente 80% da variação dos dados, os outros 20% mostram a variação nos picos devido ao ruído de fundo provocado no instante do registro (QUIROGA; NADASDY; BEN-SHAUL, 2004). O resultado da execução da PCA do eletrodo 12 na DIV 39 é mostrado na Figura 4.19.

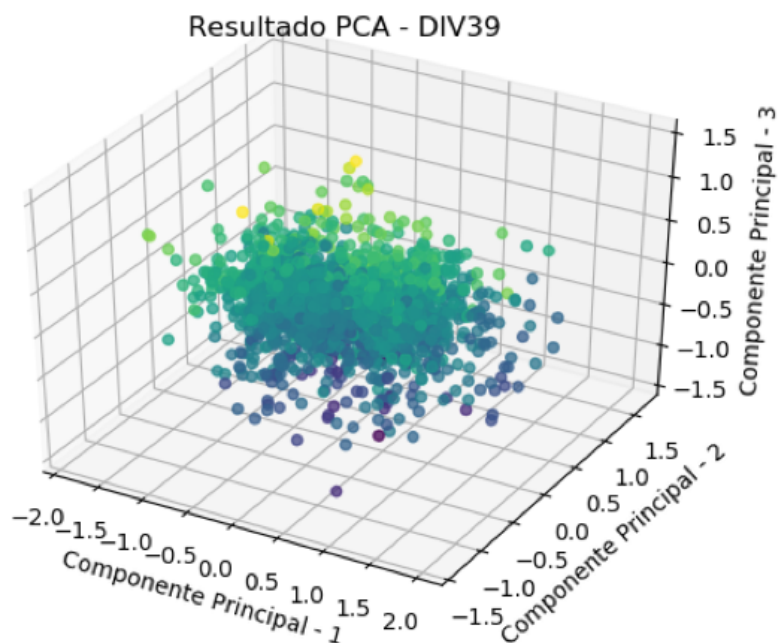


Figura 4.19: Resultado do algoritmo da análise das componentes principais para as amostras extraídas na identificação dos *spikes*.

O uso da PCA pode não ser tão efetivo quando aplicado a sinais originalmente obtidos de matrizes multieletrodos, isso porque é possível que um eletrodo registre sinais de mais de um neurônio ou dois eletrodos registrem sinais de um único neurônio criando grupos distintos, pois as amplitudes podem variar conforme a distância. Entretanto nesta tese é aplicado a técnica de separação cega de fontes (ICA – *Independent Component Analysis*) para evitar *outliers* durante o processo de agrupamento (TAKAHASHI; ANZAI; SAKURAI, 2003; BROWN; YAMADA; SEJNOWSKI, 2001). A técnica de ICA assume que as misturas contidas em um sinal são uma combinação linear dos sinais da fonte de origem. O funcionamento do algoritmo é semelhante à separação cega de fontes, ou seja, ela recupera n sinais independentes que foram misturados por n canais (MITIANOUDIS; DAVIES, 2004). Com a aplicação da ICA o problema da sobreposição de sinais captados por um microeletrodo (*overlapping*) é então suavizado e conseqüentemente torna os resultados do algoritmo PCA mais eficiente. Na Figura 4.20 é referenciado um exemplo de sinais gravados pela MEA onde vários neurônios pulsam ao redor de alguns eletrodos, fazendo com que estes registrem o mesmo sinal, no entanto sabe-se que quanto maior a distância menor a amplitude do sinal. Nota-se que a cor azul é referente a um eletrodo e a vermelha a outro.

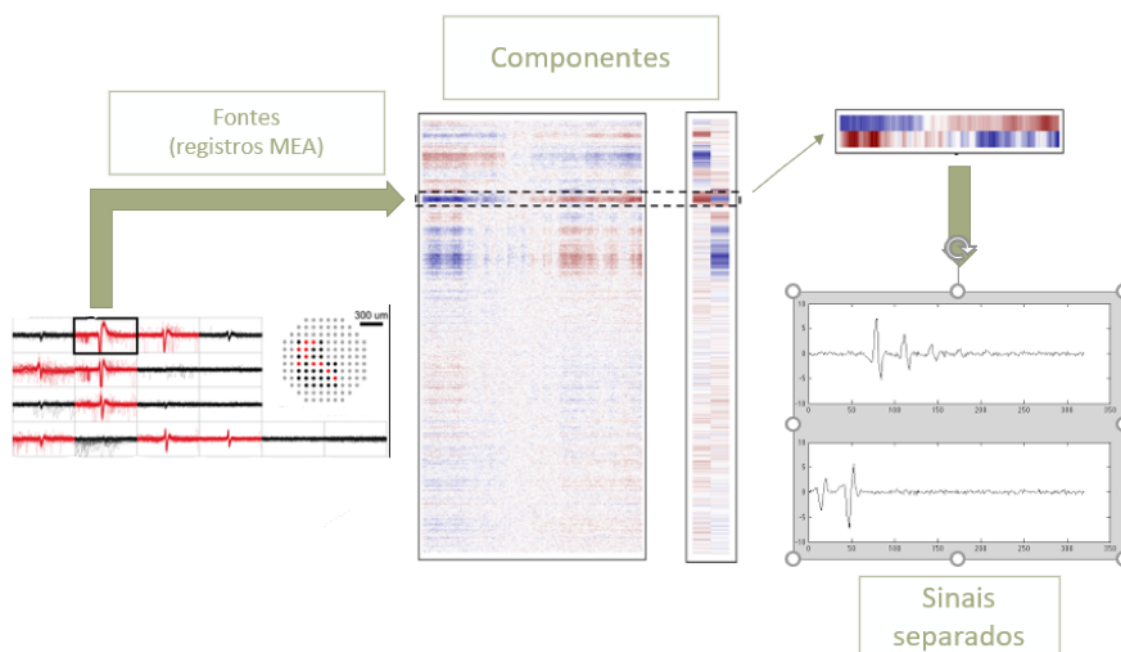


Figura 4.20: Funcionamento do algoritmo ICA. N fontes desconhecidas são misturadas linearmente por um processo desconhecido. Após o processamento do algoritmo, as N misturas são transformadas em N sinais independentes.

4.5.2 Algoritmo K-Means no agrupamento dos *Spikes*

A etapa final é agrupar os *spikes* com formas de onda semelhantes como se fossem do mesmo neurônio. A aplicação da PCA é necessária para revelar grupos que são relevantes para serem usados no agrupamento. Isso se faz necessário uma vez que, ao usar um algoritmo de agrupamento como K-Means, encontrar um grupo em um conjunto de dados multidimensionais é uma tarefa que exige um custo computacional excessivamente elevado, tornando a classificação inviável.

K-Means é um algoritmo que agrupa os dados em K -grupos definidos pelo usuário. Todavia, uma análise eficaz no uso deste tipo de algoritmo é usar um método que seja capaz de determinar um número correto de grupos. Nesta tese foi utilizado o método Elbow (KETCHEN; SHOOK, 1996) para a interpretação e validação de consistência dentro da análise de agrupamentos. O método de Elbow é conhecido por ajudar a projetar o número adequado de clusters em um conjunto de dados onde a sua principal ideia é executar o agrupamento K-Means no conjunto de dados para um intervalo de K valores, normalmente entre 10 a 15 grupos e, para cada grupo calcular a soma dos erros quadráticos. A Figura 4.21 refere-se ao resultado da distância média entre os grupos da Cultura 371, DIV39.

Observe que depois de executar K-Means para agrupamentos de 1 a 15 tem-se uma distância

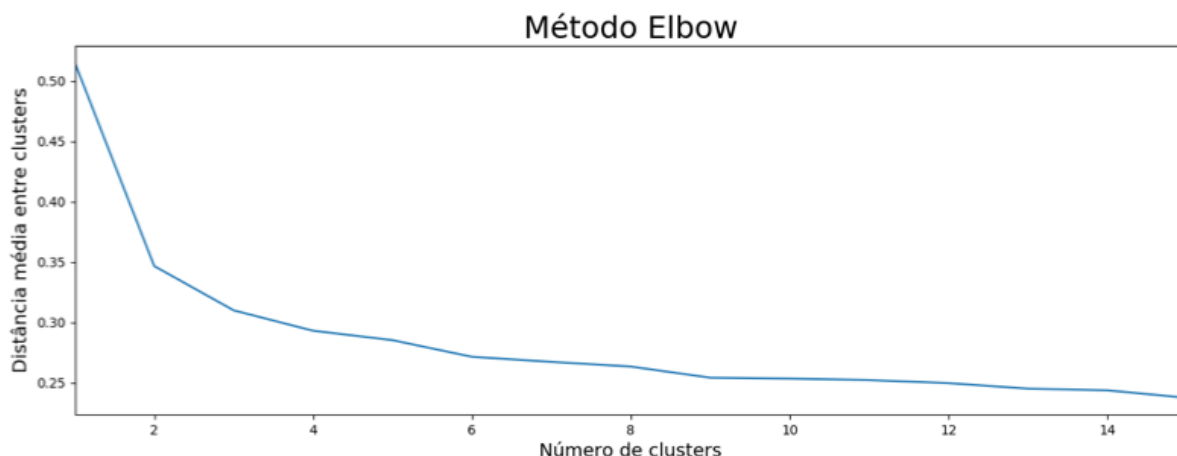


Figura 4.21: Análise de consistência utilizando o método Elbow.

média de aproximadamente 0.35. Após $K=4$, os grupos tendem a manter uma distância média com uma baixa variação, isso por que os clusters estão muito próximos, ou seja, é possível que os grupos estejam bastante próximos do seu espaço de característica, portanto, conclui-se que são características da mesma forma de onda.

Existem uma variedade de métodos para agrupamento. Gray propôs um método baseado em polígonos onde são desenhados manualmente ao redor das características extraídas pelo método da PCA (GRAY et al., 1995). Isso pode ser eficaz quando apenas um único canal é processado, por outro lado, fazer todo o processo manualmente pode se tornar uma tarefa pouco eficiente e demorada e, além disso, o agrupamento manual pode conter erros causados pela limitação do espaço de corte e viés humano. Em diversos casos a escolha manual de grupos é prejudicada pela sobreposição dos mesmos além da subjetividade (HARRIS et al., 2000).

Uma abordagem que tem sido utilizada na fase de agrupamento dos *spikes* é o algoritmo K-Means. Este método considera que os centróides dos clusters são definidos através da média dos dados dentro dos clusters. Matematicamente, um *spike* é atribuído a um cluster que tenha a média mais próxima usando a distância Euclidiana em relação aos centroides. Todavia, um número K de grupos é escolhido aleatoriamente e nem sempre o número é suficiente, seja pela quantidade insuficiente de grupos ou exagero de grupos (LEWICKI, 1998). Na Figura 4.22 é ilustrado uma separação de dados baseada no K-Means. Foi escolhido $k = 3$ pois no método de Elbow fica evidente que a partir de 3 os grupos são semelhantes.

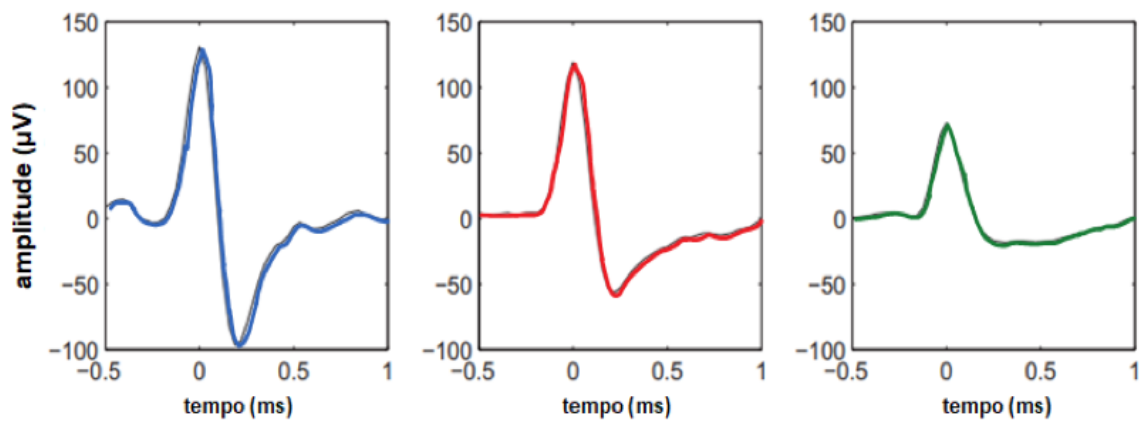


Figura 4.22: Três formas de ondas de *spikes* classificadas com K-Means. Figura adaptada de Lewicki.

4.5.3 Alinhamento e classificação dos *spikes*

Usando o método de limiarização proposto por Quiroga, Nadasdy e Ben-Shaul (2004), para extrair os *spikes*, após a suavização nas formas de ondas pelo filtro FIR passa banda, um conjunto de 81 amostras de cada *spike* foi separado para análise, 40 amostras antes do tempo t do pico e 40 amostras após, sendo a taxa de amostragem de 10kHz. Por isso, todas as amostras foram alinhadas pelo máximo valor da amplitude do pico, de modo que a extração de características seja processada pela PCA. Isso se faz necessário para a redução da dimensão dos dados para as 3 principais componentes já que analisar um gráfico de dimensão 50 é bastante caro, e é claro, inviável para esta aplicação, dado que serão analisados aproximadamente dois mil picos por canal. Erros potenciais associados a este método de extração de picos são discutidos em detalhes em Quiroga, Nadasdy e Ben-Shaul, 2004. Na Figura 4.23 é referenciado o fluxograma para a identificação do formato de onda dos *spikes* identificados (A). Em (B) é mostrado o sinal logo após o registro dos neurônios na MEA sem nenhum pré-processamento, logo em seguida em (C) é apresentado o sinal após a filtragem e o processamento da técnica de ICA. Com os sinais já filtrados os *spikes* são identificados em todos os canais e logo em seguida são alinhados, como mostrado em (E). Depois que os *spikes* são alinhados pela máxima amplitude é executado o algoritmo PCA e o resultado é visto em (F) e em seguida os *spikes* são classificados pelo algoritmo *k-means*.

Após estimar o número de neurônios próximos a cada microeletrodo pelo algoritmo SOM, o processo de identificação dos neurônios é aplicado aos sinais da Cultura 371, onde, cada *spike* é rotulado a um grupo de tipo de neurônios.

Isso possibilita a proposta principal desta tese, estimar os neurônios por meio do mapeamento de auto-organização (SOM) e identificar a quantidade aproximada de neurônios diferen-

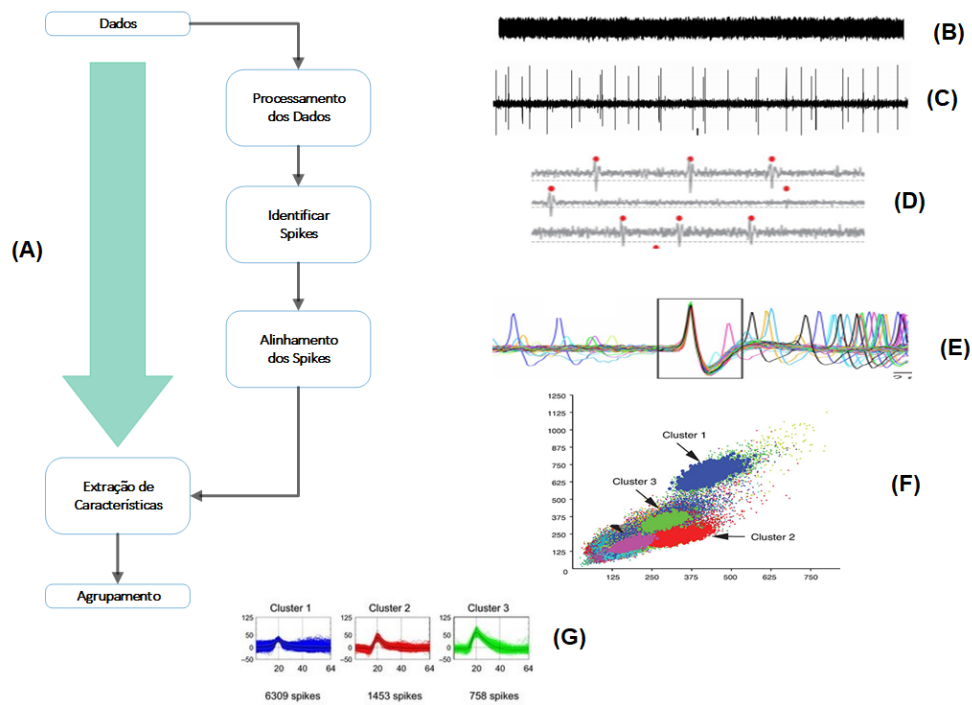


Figura 4.23: À esquerda o fluxograma do reconhecimento do número de neurônios baseado na forma de ondas identificadas em cada microeletrodo. À direita imagens ilustrativas referentes a cada etapa do processo.

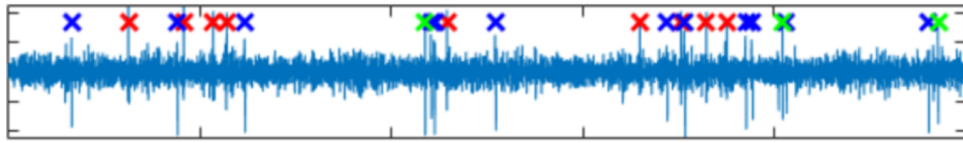
tes em cada microeletrodo. As Figuras 4.24(a) e 4.24(b) referenciam os *spikes* identificados rotulados e a quantidade de neurônios estimados em cada eletrodo da MEA. Cabe ressaltar que o processo de escolha do número de neurônios estimados é diretamente proporcional às atividades identificadas, ou seja, ao número total de *spikes* que cada tipo de neurônio disparou um *spike* durante o período de observação.

A associação dos neurônios estimados à cada grupo é dada pela Equação 4.6.

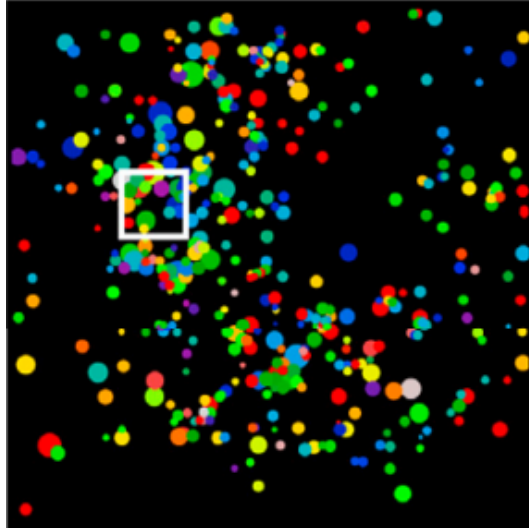
$$N_i = \frac{T_n \cdot Q_{c_{spk}}}{T_{spk}} \quad (4.6)$$

sendo N_i o número de neurônios da classe i , T_n o total de neurônios estimados, $Q_{c_{spk}}$ a quantidade de *spikes* classificados na classe i e T_{spk} a quantidade total de *spikes*.

É visto na Figura 4.24 a distribuição espacial dos neurônios virtuais onde o tamanho do raio de cada círculo é referente a quantidade de vezes que o neurônio virtual foi escolhido a BMU, e as cores foi uma escolha aleatória antes do agrupamento para uma melhor visualização.



(a) Amostra do sinal já processado e *spikes* rotulados conforme o agrupamento e classificação das ondas dos *spikes*.



(b) Amostra de uma MEA virtual já com os neurônios estimados e classificados por eletrodo.

Figura 4.24: Classificação dos neurônios estimados

4.6 Considerações Finais

Neste capítulo foram apresentados os métodos utilizados para o desenvolvimento deste tese. Iniciou-se com a apresentação do modelo e registro dos sinais da Cultura 371. Posteriormente foram apresentados o *framework* desenvolvido para auxiliar na análise, pré-processamento e pós-processamento dos registros da cultura. Por fim, foram apresentados o método proposto para o mapeamento dos neurônios virtuais e a classificação dos *spikes* identificados. Na próxima seção serão apresentados os resultados e validação da proposta.

Capítulo 5

RESULTADOS E VALIDAÇÃO

Neste Capítulo são apresentados os experimentos realizados sobre a base de dados da Cultura 371 aplicando os métodos descritos no Capítulo 4. No final os resultados obtidos na estimativa da distribuição de neurônios para um dos experimentos serão comparados com a distribuição de neurônios real, obtida por imageamento fotográfico de microscopia, para validação. São também descritos os experimentos para a classificação dos spikes em função da morfologia.

5.1 Experimentos e Resultados do Mapeamento dos Neurônios da Cultura 371

Os experimentos apresentados foram realizados de modo a avaliar o método para criar mapas topológicos da distribuição dos neurônios, com as seguintes configurações:

- Os parâmetros ($\lambda = 0.45$ e $\sigma = 8$) do algoritmo SOM com decaimento gaussiano;
- Distribuição aleatória dos neurônios virtuais no espaço S de tamanho 400x400 pixels;
- Número de neurônios virtuais estimados em função da contagem de neurônios reais numa imagem fotográfica por microscopia, obtida no DIV38.
- Atenuação dos sinais pelo filtro passa banda Butterworth;
- Método de identificação dos *spikes* pela mediana, Seção (4.4.1);
- Critério de convergência do mapa quando não houver mais modificações significativas no mapa ou número máximo de 10.000 iterações;

Foram estimados mapas topológicos virtuais para todos os dias de medição da Cultura 371 onde, cada canal de registro continha aproximadamente 12 milhões de pontos, sendo 59 canais de registro, totalizando 708 milhões de dados para cada dia de análise da cultura. Os resultados foram comparados com uma microscopia feita no dia DIV38 da mesma cultura, em função da contagem dos neurônios reais dessa imagem fotográfica.

O *framework* desenvolvido nesta tese foi implementado utilizando a linguagem Python e testado em dois computadores diferentes, um PC com processador Intel I3 com 8 Gb de RAM rodando o sistema operacional Windows e um Macbook pro Intel I7 com 16Gb de RAM rodando o sistema operacional OSX Mojave.

O SOM foi treinado com 10.000 iterações do conjunto de treinamento já filtrado e redimensionado através do algoritmo descrito na Seção 4.4.2, através da seleção de entradas linear, que pode convergir o algoritmo mais rapidamente quando comparado com o algoritmo randômico. Quando foi aumentado o número máximo de iterações, os mapas não apresentaram nenhuma modificação relevante no posicionamento dos neurônios virtuais. Por outro lado, o tempo de processamento aumenta significativamente. Em alguns testes foram realizados treinamentos com um número menor de iterações, e os resultados piorou em determinados dias de amostragem, e em resposta a isso, foi definido como padrão 10.000 iterações para o treinamento de todos os dados. A Figura 5.1, é referente ao resultado das etapas do processo de execução do algoritmo. Os neurônios que mais venceram na competição do neurônio BMU, vão ficando mais evidentes à medida que o algoritmo vai evoluindo, como pode ser observado na figura onde é apresentada a evolução do mapeamento em 0, 20, 40, 60, 80 e 100 por cento da execução, onde os neurônios são vistos na cor vermelha e os microeletrodos em cor cinza. As Figuras 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6 e 5.7 referem-se ao resultado final (100%) da execução do algoritmo de mapeamento. Nas Figuras em torno dos mapas obtidos pelo algoritmo SOM é possível perceber que os dados vão se agrupando centro de cada eletrodo, e posteriormente os neurônios são espalhados dentro da área de cada eletrodo para uma melhor visualização.

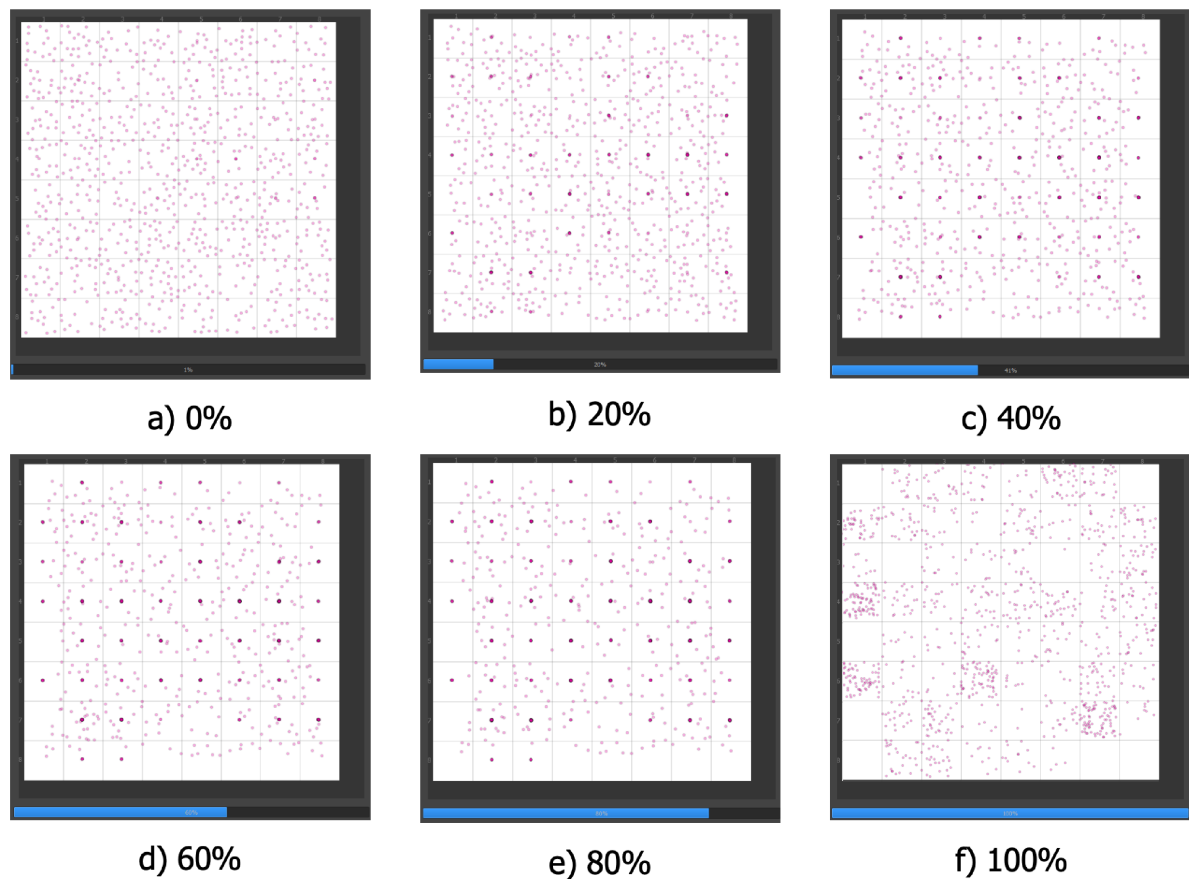


Figura 5.1: Neurônios virtuais estimados após 10.000 iterações utilizando dados de testes dos registros do DIV25: a) distribuição inicial; b) distribuição após 20%, c) distribuição após 40%, d) distribuição após 60%, e) distribuição após 80% e f) distribuição final.

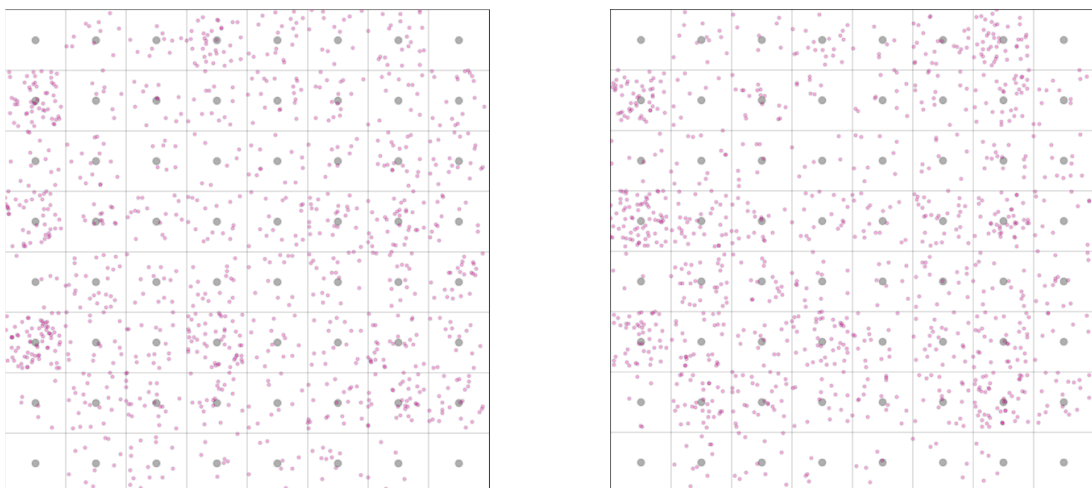


Figura 5.2: Mapa dos neurônios virtuais - DIV29. **Figura 5.3:** Mapa dos neurônios virtuais - DIV32.

Inicialmente foram executados testes de treinamento da rede SOM utilizando a seleção de amostras aleatórias e lineares, após o processo de redimensionamento e codificação das entradas, porém o algoritmo linear mostrou-se mais eficiente.

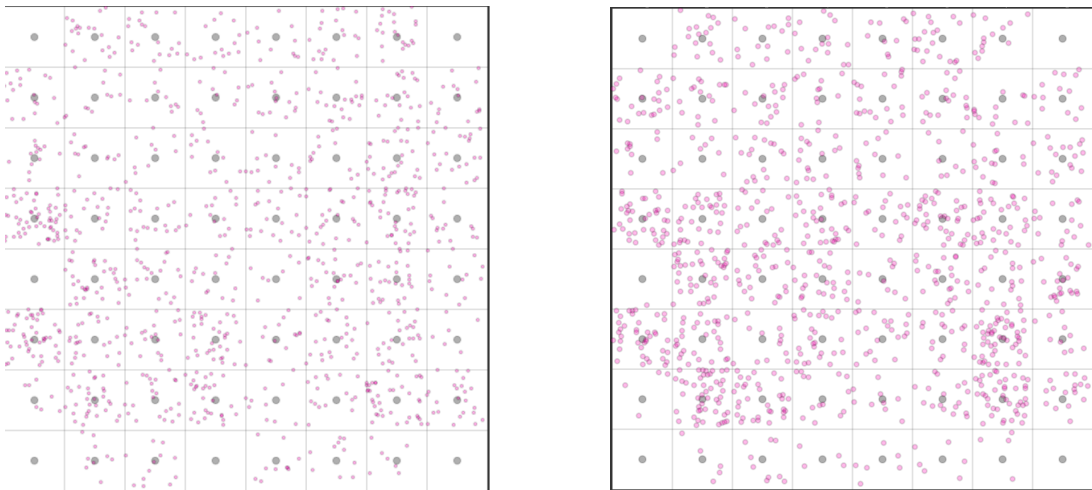


Figura 5.4: Mapa dos neurônios virtuais - DIV36.**Figura 5.5:** Mapa dos neurônios virtuais - DIV39.

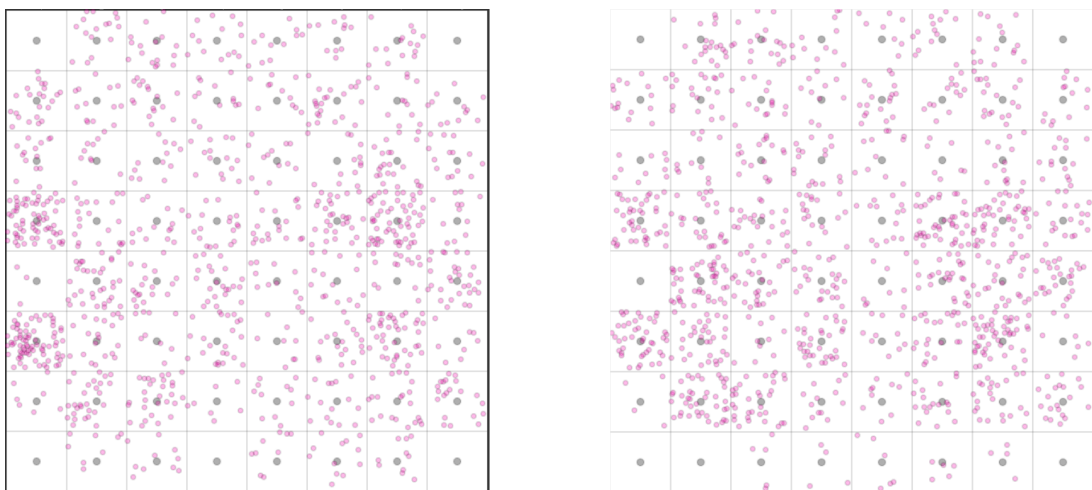


Figura 5.6: Mapa dos neurônios virtuais - DIV43.**Figura 5.7:** Mapa dos neurônios virtuais - DIV46.

Um parâmetro bastante relevante é a largura da vizinhança h_{bi} , que define o quanto a vizinhança efetiva influencia no neurônio vencedor. Este parâmetro, quando próximo a 0 significa que não existe cooperação entre o neurônio vencedor e seus vizinhos, por outro lado, quando próximo de 1 significa que existe uma tendência maior no vizinho com uma quantidade significativa de neurônios. Adotar valores nestas extremidades do parâmetro pode tornar o processo de organização pouco ou muito tendencioso.

Após vários testes, com diferentes valores (0.1, 0.22, 0.27 a 0.3) percebeu-se que os mapas pouco se alteravam. Isso ocorria porque o processo de adaptação da vizinhança pouco refletia na distância entre os neurônios no processo de competição do BMU.

5.1.1 Matriz de Proximidades Unificadas (MATRIZ-U)

A matriz de proximidades unificadas tem o propósito de apresentar visualmente as relações topológicas de proximidades entre os neurônios (ULTSCH, 1993). Normalmente a distância Euclidiana é adotada como métrica entre os neurônios adjacentes resultando em uma imagem onde a cor de cada grupo de neurônios representado por hexágono corresponde a essa proximidade. Valores baixos (cor azul escuro) correspondem a índices de baixa proximidade entre neurônios. Valores maiores indicam uma grande quantidade de agrupamento de neurônios. Nota-se que essa proximidade coincide com a densidade dos neurônios na MEA.

A Matriz-U das Figuras 5.8, 5.9, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13 e 5.14 correspondem aos resultados dos Mapas Auto-organizáveis apresentados na seção anterior. Nas figuras fica evidente o número *spikes* de cada eletrodo no registro de sinais, o que refletiu na quantidade de iterações em que o neurônio virtual resultou em BMU durante a aplicação do SOM.

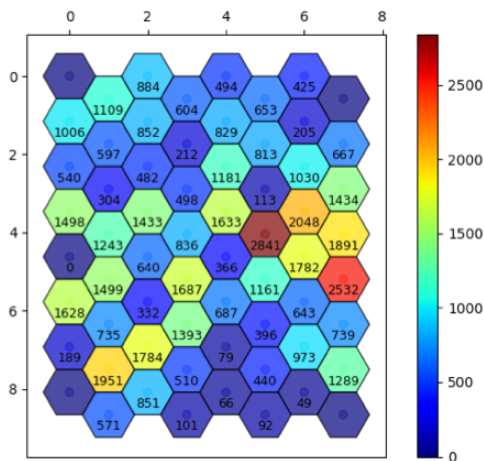


Figura 5.8: Matrix-U do DIV25.

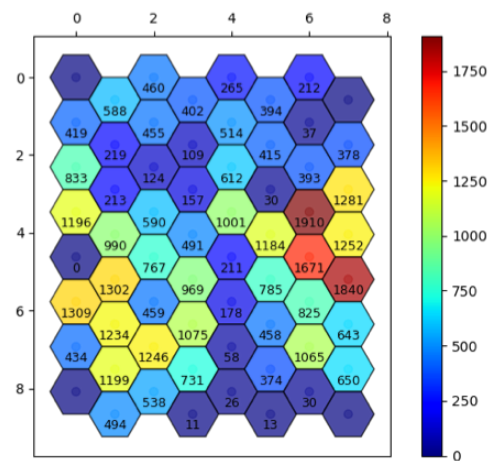


Figura 5.9: Matrix-U do DIV29.

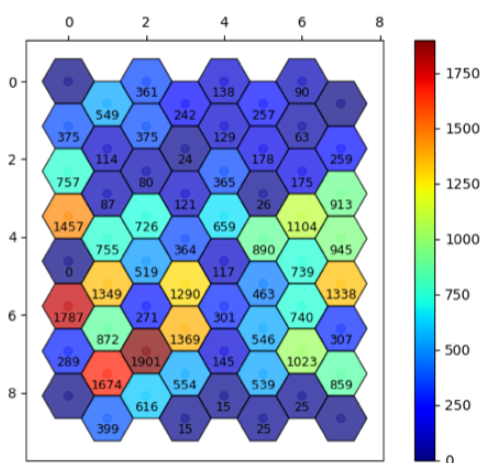


Figura 5.10: Matrix-U do DIV32.

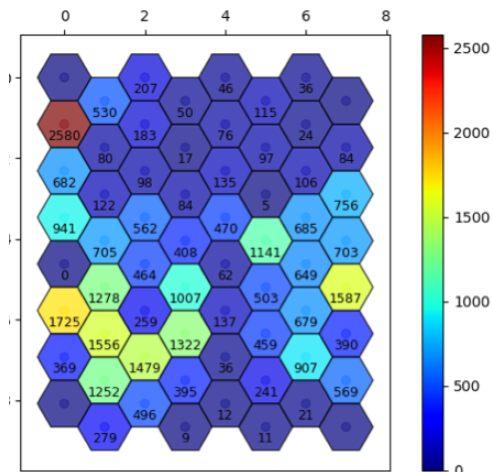


Figura 5.11: Matrix-U do DIV36.

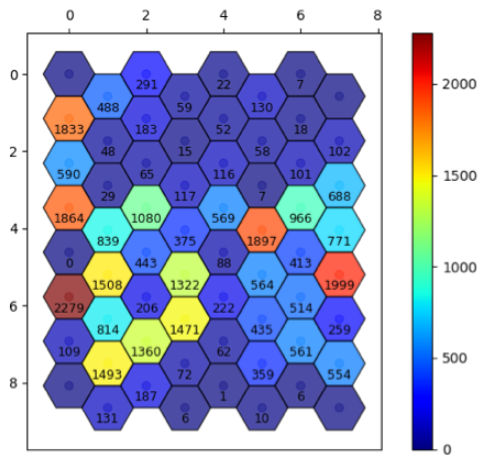


Figura 5.12: Matrix-U do DIV39.

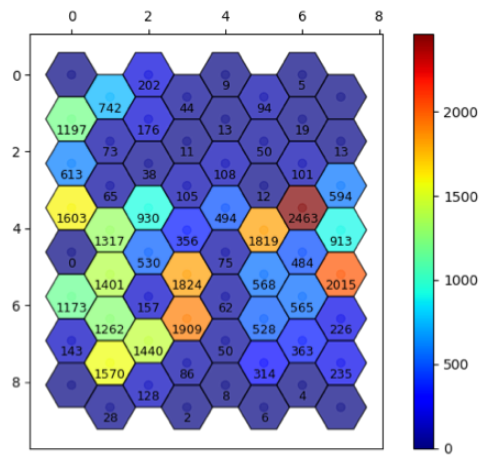


Figura 5.13: Matrix-U do DIV43.

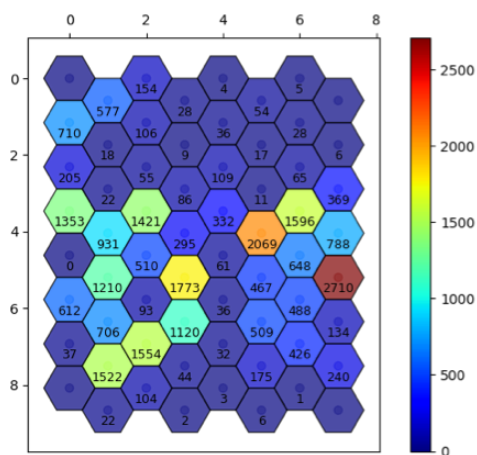


Figura 5.14: Matrix-U do DIV46.

5.2 Identificação dos tipos de spikes e classificação

Após o processo de mapeamento usando a rede SOM, foram realizados os experimentos de classificação dos *spikes* quanto ao seu formato morfológico, como discutido na Seção 4.5. Utilizando os métodos PCA e K-Means, que são considerados eficientes na literatura.

É possível observar no topo das Figuras 5.15, 5.16, 5.17 e 5.18 uma amostra do sinal registrado pelo eletrodo escolhido na lateral esquerda da tela do *framework* mostrado por uma barra azul. No canto superior direito é mostrada uma opção de modificar o processo de escolha do limiar e ajustar os parâmetros do filtro, onde é possível observar o reflexo do processo de filtragem na identificação dos neurônios. Na parte intermediária da figura é possível verificar à esquerda uma visão de todos os *spikes* alinhados antes da aplicação da PCA, e à direita, os *spikes* classificados porém sobrepostos. Na parte inferior são mostradas as quatro formas de *spikes*.

A finalidade deste método é sugerir uma possível relação dos *spikes* identificados a população topográfica dos neurônios ao redor dos microeletrodos. Após vários testes foi possível observar que mesmo reduzindo ou aumentando o limiar de identificação dos *spikes* a proporção era mantida. Com isso foi possível também observar que as morfologias dos *spikes* ao redor dos eletrodos vizinhos são semelhantes.

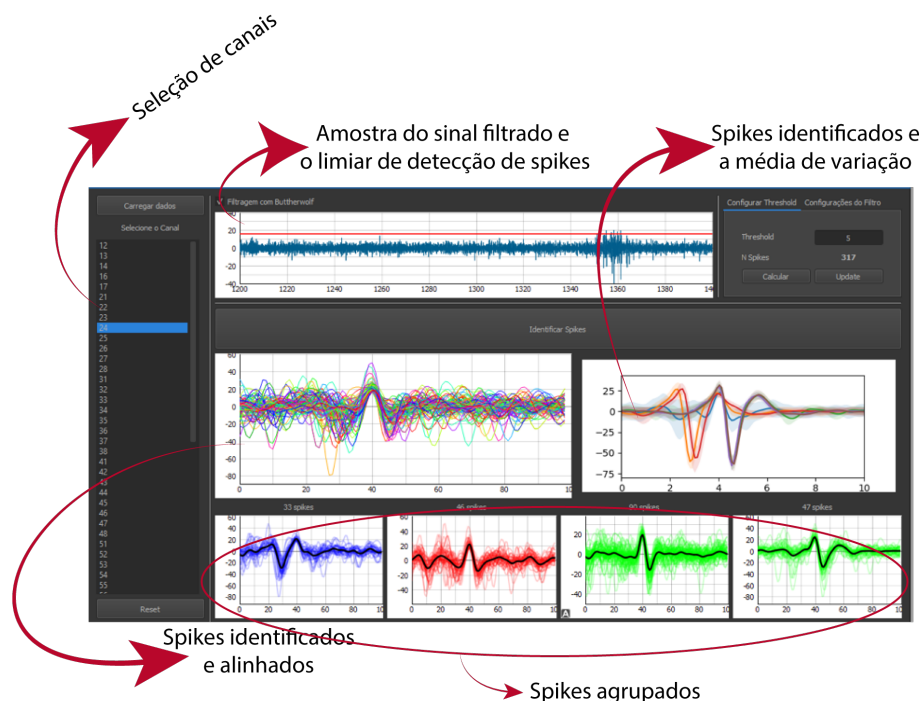


Figura 5.15: Processamento do sinal registrado pelo eletrodo 24 do DIV25 da Cultura 371.

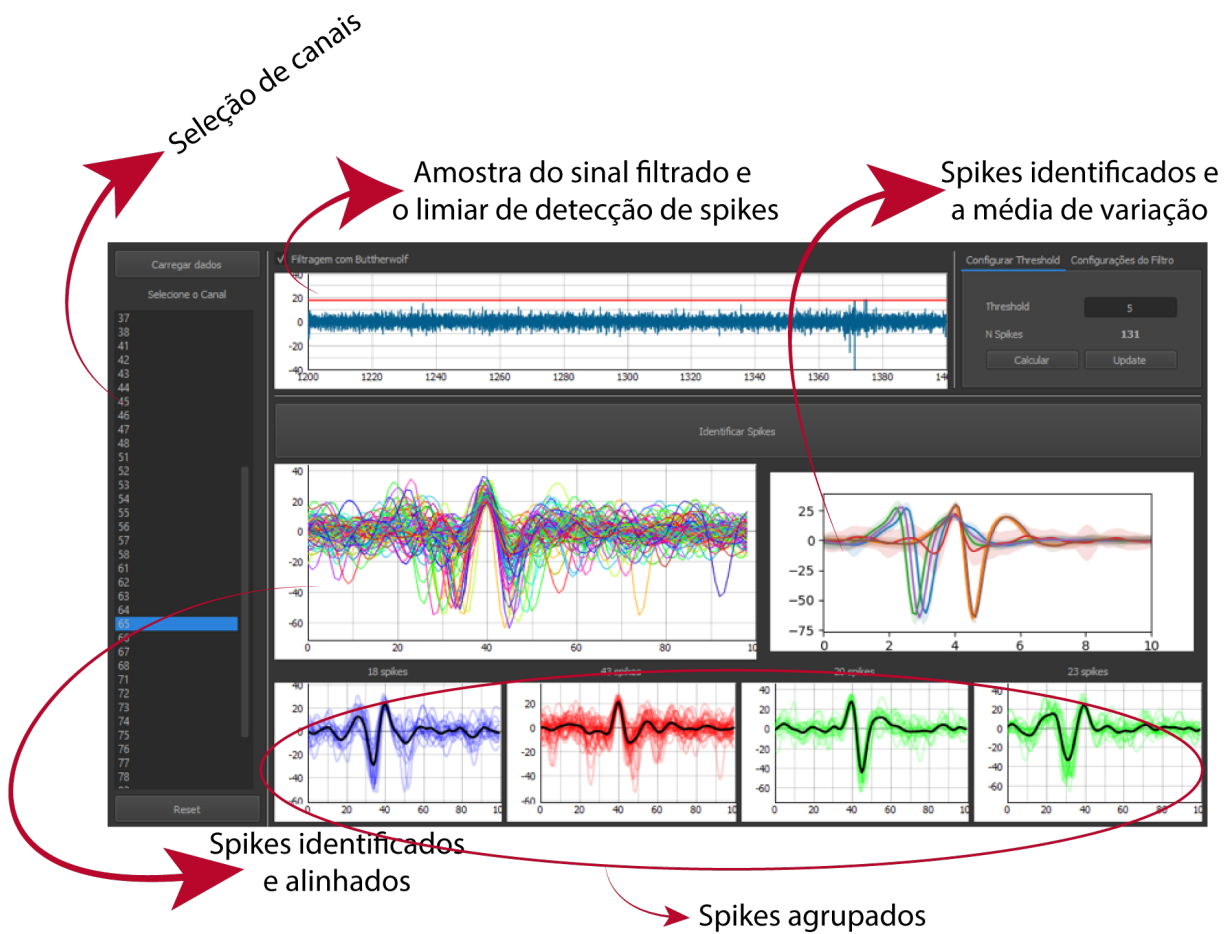


Figura 5.16: Processamento do sinal registrado pelo eletrodo 65 do DIV32 da Cultura 371.



Figura 5.17: Processamento do sinal registrado pelo eletrodo 85 do DIV39 da Cultura 371.

Tendo realizada a classificação dos *spikes* quanto ao seu formato geométrico, o processo de associação aos neurônios estimados após o treinamento do SOM, foi inferido por meio da proporção da quantidade de *spikes* na classe / quantidade de neurônios virtuais conforme visto na Seção 4.5.3.



Figura 5.18: Processamento do sinal registrado pelo eletrodo 41 do DIV46 da Cultura 371.

A Tabela 5.1 mostra um exemplo de resultado da aplicação do método de identificação dos neurônios e classificação para o DIV25 da Cultura 371 onde é mostrada a quantidade de *spikes* identificados e não identificados, e os neurônios estimados pelo algoritmo SOM. As tabelas de outros DIV's estão no Apêndice I. A primeira coluna se refere à identificação do eletrodo analisado, e as colunas da direita são separadas em 4 grupos. Os *spikes* identificados, onde os grupos estão categorizados como A, B e C, e *spikes* não classificados, N, que pode ser um grupo pequeno de *spikes* ou até mesmo um ruído que tenha ultrapassado o limiar. Um estudo mais detalhado dessa classificação e como os neurônios estão conectados é uma sugestão para trabalhos futuros.

Tabela 5.1: Classificação dos neurônios no DIV25

ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N	ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N
12	10421	42	19	6	15	2	51	1432	10	3	5	2	0
13	2605	13	8	2	3	0	52	2844	22	5	11	4	2
14	19738	72	33	12	21	6	53	2536	14	2	8	0	2
16	13467	62	26	16	19	1	54	3993	27	8	11	7	1
17	106	1	1	0	0	0	55	1453	14	2	10	1	1
21	4502	18	8	7	2	1	56	2010	10	3	7	0	0
22	2519	24	9	7	7	1	57	163	4	0	3	1	0
23	582	2	1	1	0	0	58	1121	12	4	5	2	1
24	5143	22	16	5	1	0	61	5883	34	12	14	3	5
25	3854	10	3	2	5	0	62	1547	9	3	4	1	2
26	2033	17	4	4	7	2	63	71	1	0	0	1	0
27	3540	20	8	7	2	3	64	6404	30	6	12	11	1
28	2664	23	9	11	2	1	65	4371	15	2	10	3	0
31	3070	20	4	9	5	2	66	1079	9	3	5	1	0
32	3354	17	3	4	8	2	67	1588	22	7	15	0	0
33	1625	12	1	6	4	1	68	477	5	1	3	1	0
34	3929	16	2	5	8	1	71	4725	26	13	5	7	1
35	2936	8	6	1	1	0	72	3078	22	14	4	4	0
36	1739	11	8	2	1	0	73	2520	10	6	0	2	2
37	4150	34	11	6	15	2	74	5046	17	7	4	5	1
38	2601	24	12	4	7	1	75	2654	14	4	8	2	0
41	3609	18	5	10	3	0	76	4200	29	10	14	3	2
42	545	8	3	4	1	0	77	8438	76	17	38	14	7
43	1558	12	6	4	1	1	78	75	3	0	3	0	0
44	3355	21	4	10	7	0	82	7680	25	10	4	7	4
45	3779	17	8	2	4	0	83	6778	29	14	5	9	1
46	7895	62	31	9	15	7	84	6143	22	10	7	4	1
47	750	7	5	2	0	0	85	8557	24	9	6	7	2
48	293	10	6	2	1	1	86	2140	11	7	3	0	1
							87	3087	9	5	2	1	1

5.3 Visualização topológica dos neurônios em função dos *spikes* classificados

Uma abordagem proposta nesta tese é a classificação dos neurônios de acordo com a forma geométrica dos *spikes*. Neste sentido foi possível identificar e classificar a quantidade de neurônios baseado na proporção de *spikes* classificados vista na seção anterior. Nas Figuras 5.19, 5.20, 5.21, 5.22, 5.23 e 5.24 são apresentados os resultados dos neurônios estimados e classificados nas proximidades dos microeletrodos na MEA, onde os neurônios de cor vermelho, azul e verde pertencem aos grupos A, B e C respectivamente.

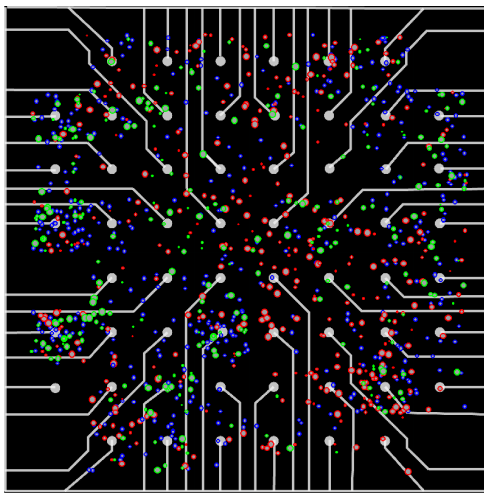


Figura 5.19: Mapa Topográfico Classificado - DIV25.

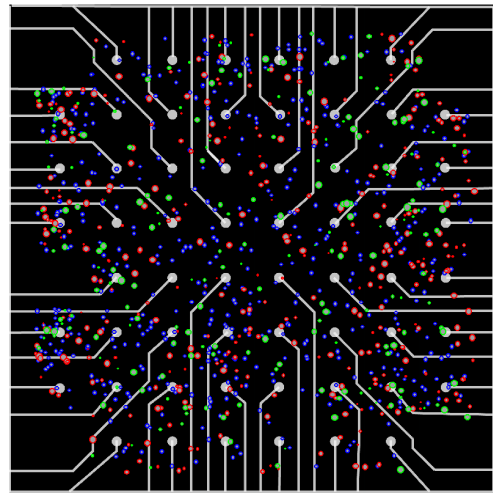


Figura 5.20: Mapa Topográfico Classificado - DIV29.

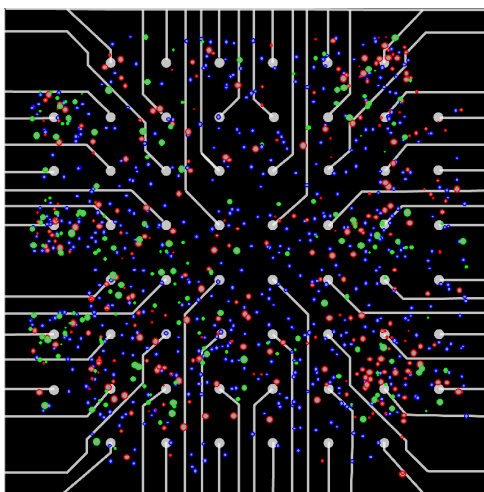


Figura 5.21: Mapa Topográfico Classificado - DIV32.

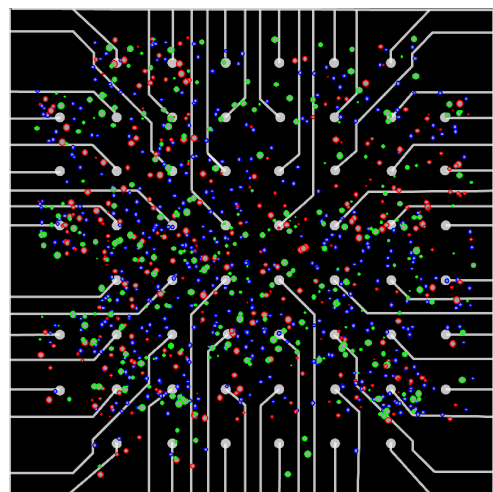


Figura 5.22: Mapa Topográfico Classificado - DIV39.

O posicionamento dos neurônios ao redor dos microeletrodos foram estimados pelo método proposto nesta tese e o tamanho dos neurônios classificados variaram de acordo com a am-

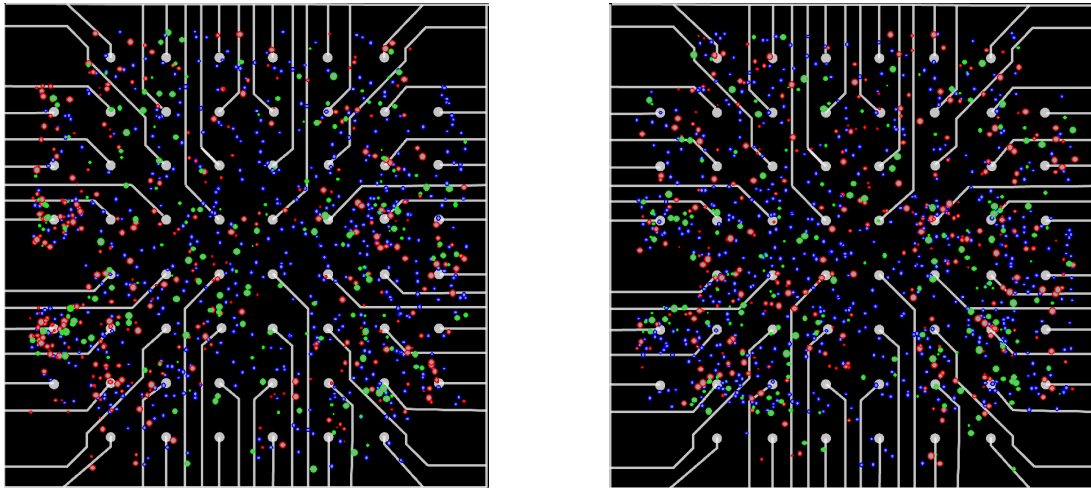


Figura 5.23: Mapa Topográfico Classificado -Figura 5.24: Mapa Topográfico Classificado - DIV43.

plitude do sinal. Isso contribui visualmente para medir a intensidade dos neurônios posicionados próximos aos microeletrodos. Também é possível perceber que onde a densidade dos neurônios é alta, percebe-se que os neurônios da classe A (vermelho) sempre estão em maior número. Cabe lembrar que a classificação se limitou a 3 classes visto que o algoritmo Elbow não apresenta diferenças significativas após 3 classes. Os *spikes* que estão na coluna N "não classificado", são os *spikes* que possivelmente foram classificados em algum grupo com poucos neurônios ou pode ter sido um falso positivo obtido na fase de identificação dos *spikes*.

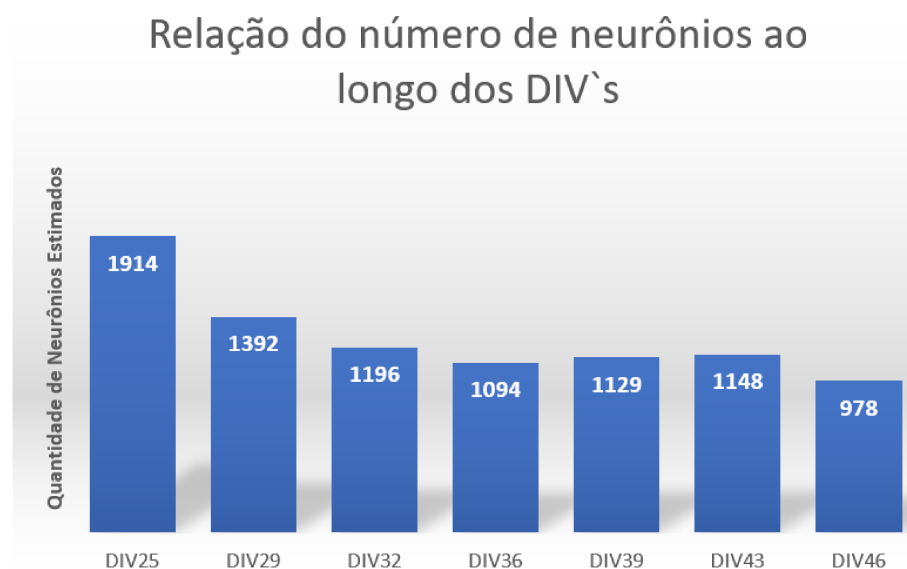


Figura 5.25: Evolução da quantidade de neurônios estimados durante o período de observação da Cultura 371.

5.4 Análise Quantitativa e Evolução da Cultura 371 em Função dos neurônios virtuais

Na Figura 5.25, é possível observar a evolução geral da cultura em relação ao número de neurônios estimados para todos os DIV's, sem mostrar a distribuição por eletrodos. O número aproximado foi estimado com base na medida de proporção das atividades elétricas e normalizadas à quantidade de neurônios do DIV38.

Nota-se que em geral a quantidade de neurônios estimados diminui ao longo dos dias de cultivo, com um pequeno aumento visto nos DIV's 39 e 43.

Os resultados apresentados nas Figuras 5.26, 5.27, 5.28, 5.29, 5.36, 5.31 e 5.32, mostram a evolução da cultura ao longo do período de gravação em relação ao número de neurônios virtuais estimados por eletrodo pelo método proposto nesta tese.



Figura 5.26: Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV25 da Cultura 371.

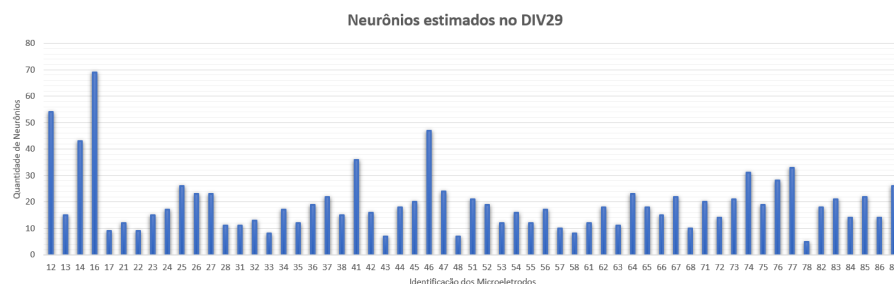


Figura 5.27: Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV29 da Cultura 371.

Na próxima seção será abordada a validação dos resultados tomando como referência o imageamento do DIV38 da mesma cultura.



Figura 5.28: Relação dos neurônios virtuais estimados no DI32 da Cultura 371.

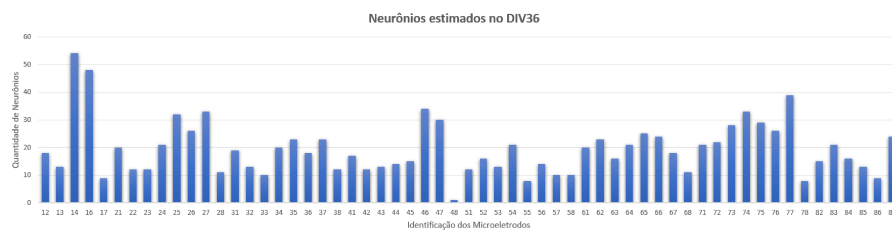


Figura 5.29: Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV36 da Cultura 371.



Figura 5.30: Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV39 da Cultura 371.



Figura 5.31: Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV43 da Cultura 371.

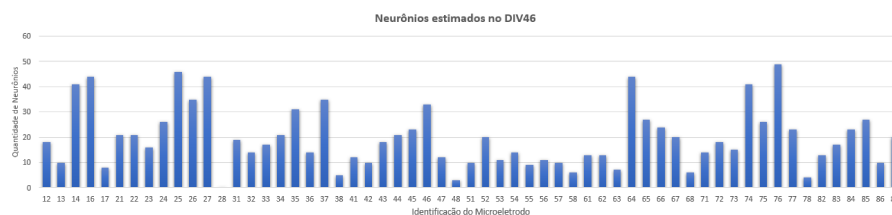


Figura 5.32: Relação dos neurônios virtuais estimados no DIV46 da Cultura 371.

5.5 Validação dos Resultados

Para validar os resultados apresentados nesta tese foi utilizada a imagem do DIV38 como referência onde os neurônios foram identificados manualmente por um especialista (Figuras 5.33, 4.3). O imageamento do DIV38 é utilizado para ponderar o número de neurônios presentes na Cultura 371 que, proporcionalmente foram utilizados como parâmetro para geração dos neurônios virtuais. Sendo assim, os mapas são calibrados de modo que, a partir do imageamento do DIV38 da mesma cultura a distribuição virtual dos neurônios seja proporcional às atividades eletrofisiológicas registradas pelos microeletrodos.

Usando como referência essa distribuição dos neurônios no DIV38, como distribuição real, é possível validar o método desenvolvido comparando-a com a distribuição topológica virtual obtida para um registro eletrofisiológico obtido proximo ao DIV38. Os registros do DIV39 foram selecionados por ter sido obtido um dia após o imageamento, sendo assim, muito próximo e evidentemente apresentando uma menor variação na distribuição dos neurônios em relação aos outros dias de registro. As Figuras 5.33 e 5.34 são cópias das Figuras 4.3 e 5.5, respectivamente.

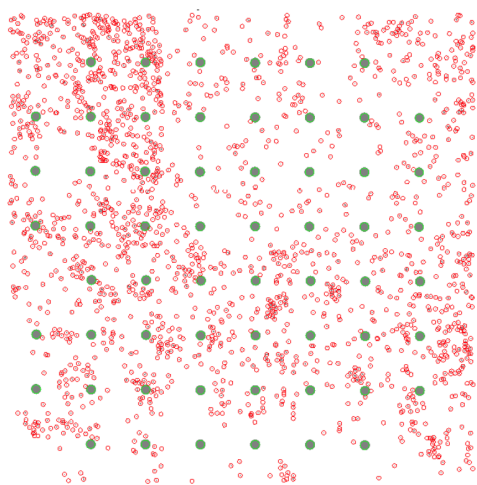


Figura 5.33: Mapa topográfico do DIV38.

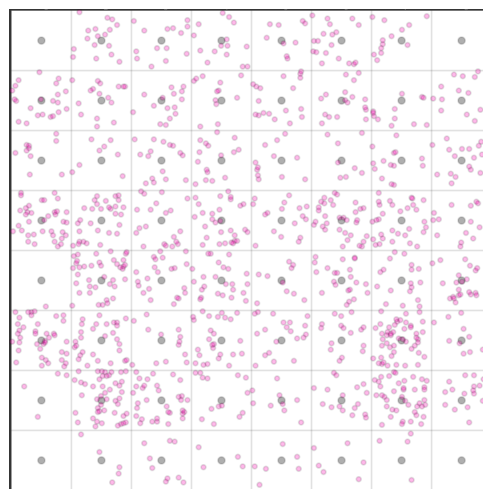


Figura 5.34: Mapa topográfico do DIV39.

Após o processamento da imagem do DIV38 foi possível determinar o número de neurônios na área de registro de cada microeletrodo e o resultado é mostrado na Figura 5.35. Na Figura 5.36 é mostrado o histograma de distribuição de neurônios virtuais obtidos para o DIV39.

Um gráfico de sobreposição dos neurônios virtuais estimados do DIV39 e neurônios reais obtidos pela segmentação do imageamento do DIV38 é visto na Figura 5.37. Na Figura 5.35 é possível observar que a maior concentração de neurônios da Cultura 371 estão nas proximidades dos microeletrodos 12, 13, 21, 22, 23, 27, 31, 33, 34, 45, 77 e 87. Observando a Figura 5.36 do

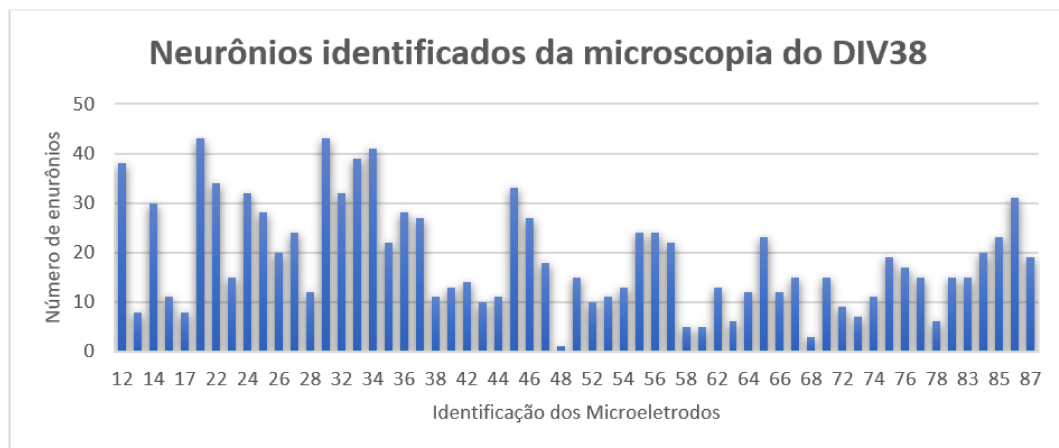


Figura 5.35: Histograma dos neurônios reais do DIV38 da Cultura 371.

dia seguinte, ou seja, DIV39, percebe-se que a cultura manteve basicamente os mesmos padrões de concentração de neurônios. No entanto nota-se uma redução na quantidade de neurônios na região dos eletrodos 31, 32, 33, 55, 56, 63 e 73, mas no geral a topologia pouco se altera.

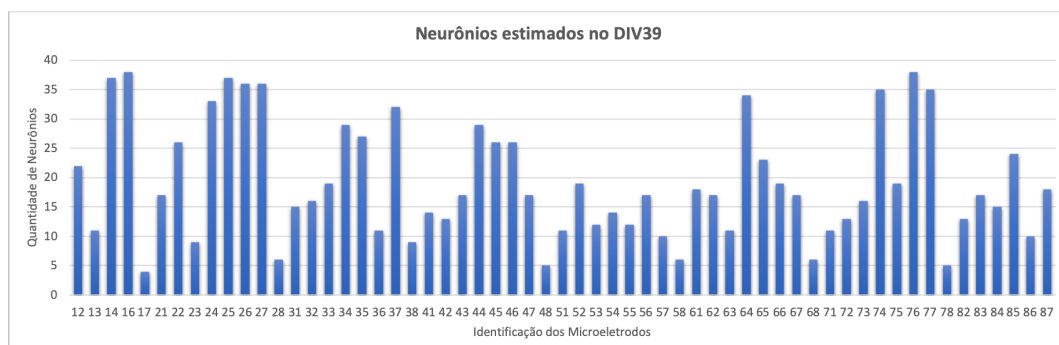


Figura 5.36: Histograma dos neurônios virtuais estimados no DIV39 da Cultura 371.

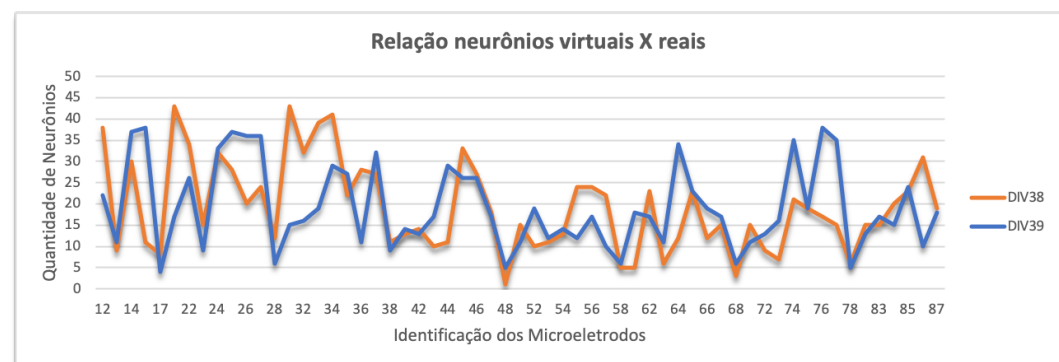


Figura 5.37: Relação da quantidade de neurônios estimados pela proposta desta tese no DIV39 com os neurônios reais do DIV38 da Cultura 371.

Evidentemente a quantidade de neurônios estimada ao redor dos microeletrodos são dependentes dos ajustes dos parâmetros da taxa de aprendizagem e largura efetiva da vizinhança, porém a rede SOM tende a se organizar conforme os padrões de entrada estão relacionados

entre si.

É possível perceber que o resultado do mapa da distribuição de neurônios virtuais do DIV39 segue a mesma tendência ao imageamento do DIV38.

5.6 Teste de Hipótese do Qui-Quadrado

O teste de independência Qui-Quadrado tem como objetivo descobrir a existência de associação entre duas ou mais variáveis. Sabendo-se que, quando a hipótese é nula H_0 , as variáveis estão associadas, ou seja, elas são dependentes. A hipótese alternativa aponta uma distância entre as variáveis, sendo assim, elas são independentes. Neste caso, utilizou-se o teste do Qui-Quadrado com nível de significância de 5% na comparação do número de neurônios observados nos eletrodos no DIV38 com os neurônios virtuais estimados do DIV39.

Considerando-se 32 dos 59 eletrodos, o resultado foi favorável à hipótese H_0 . O fato de resultados discrepantes nos 27 eletrodos restantes é devido aos diversos fatores que resultaram na quantidade excessiva ou deficiente de neurônios detectados na imagem do DIV38, e de *spikes*, no registro do DIV39, considerando-se a hipótese de que a quantidade de neurônios é proporcional à quantidade de *spikes* para cada eletrodo.

É importante mostrar também que a existência de neurônios inibitórios e excitatórios, na proporção de 25%, conforme descrito no final da Seção 4.4.3, deve influenciar positivamente para essa discrepância. Um outro fator que pode afetar o resultado é a diferença de um dia em relação ao imageamento fotográfico e o registro de sinais considerado.

Sendo assim, a hipótese alternativa pode ser negada e consequentemente a hipótese nula, aceita. Com isso é possível afirmar que o número de neurônios reais está relacionado com a quantidade de atividade elétrica registrada pelos eletrodos na MEA.

5.7 Considerações Finais

Neste capítulo foram apresentados os experimentos realizados em direção à comprovação das hipóteses descritas no Capítulo 1. No final, é realizado um cálculo estatístico de Qui-quadrado para o conhecimento do nível de aproximação da distribuição de neurônios virtuais em relação à distribuição vista em imagem fotográfica. O capítulo seguinte refere-se às conclusões finais e trabalhos futuros.

Capítulo 6

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Nesta tese foi proposto um método para criar mapas topológicos, quantificar e classificar neurônios cultivados em MEA baseado na análise dos sinais dos registros de atividades espontâneas dos neurônios cultivados *in vitro*. Essa construção de mapas topológicos de neurônios virtuais é uma alternativa à microscopia na análise da distribuição dos neurônios cultivados em MEA. O método aqui desenvolvido é baseado na rede neural não supervisionada conhecida como mapas auto-organizáveis de Kohonen. A proposta desta tese foi testada e validada com a comparação do mapa topológico obtido para o DIV39 com a distribuição dos neurônios obtidas pelo imageamento fotográfico de microscopia obtida no DIV38, onde os neurônios foram identificados por análise e segmentação.

Como estratégia de pré-processamento para a obtenção dos mapas topológicos foi proposto o processamento do sinal registrado por cada microeletrodo da MEA, para a redução do ruído. Este processo tem como objetivo reduzir o nível de ruído branco e atenuar os picos (*spikes*) onde se encontra toda a codificação de informação dos neurônios. A base de dados de treinamento da rede SOM foi montada a partir dos *spikes* identificados e codificados para a redução de dimensão e para se adequar às entradas dos neurônios da rede.

Com o intuito de classificar os neurônios virtuais dos mapas topológicos foi implementado um algoritmo para classificar os neurônios de acordo com o formato geométrico dos *spikes* detectados. Como foi visto no Capítulo 2, vários trabalhos tendo sido explorados para classificar os neurônios utilizando diversos algoritmos. Nesta tese o método de extração de características utilizado foi a análise das componentes principais dos sinais dos neurônios cultivados em MEA. Através desse processo foi possível construir mapas topológicos com os neurônios classificados. Foi possível observar a distribuição espacial dos neurônios e foi notado que os mapas topológicos de neurônios virtuais obtidos pelo método proposto são bastante semelhantes aos obtidos no imageamento do DIV38. Também foi apresentada a evolução da Cultura 371 do

DIV25 ao DIV46 onde notou-se uma diminuição do número de neurônios sobre a MEA ao longo do tempo e a distribuição dos neurônios ficando mais esparsos.

Foi realizado o teste do Qui-Quadrado entre o número de neurônios da distribuição real de neurônios do DIV38 e o número de neurônios da distribuição virtual de neurônios do DIV39. Considerando um número de 54% dos eletrodos que mostraram resultados de distribuição próximos entre real e virtual, o teste resultou a favor de H_0 , o que valida a afirmação de proporcionalidade entre a distribuição de neurônios e o número de *spikes* observados.

Como um dos trabalhos futuros, propõe-se a implementação do algoritmo de distribuição de neurônios virtuais e classificação utilizando GPU ou em algum outro modo de processamento paralelo para reduzir o tempo de geração dos mapas classificados. Com isso espera-se o processamento e construção dos mapas em tempo real, durante a aquisição dos sinais. Com essa implementação seria possível uma análise visual de onde se encontra a maior concentração de neurônios na MEA, podendo escolher quais eletrodos registrar. Isso também pode contribuir na análise do registro de sinais *in vivo* onde um dos principais problemas é o tempo de processamento e classificação dos neurônios. Uma outra sugestão seria a implementação de mais módulos no *framework* como métodos de comparação em tempo real.

6.1 Publicações geradas durante as pesquisas

Durante a pesquisa as seguintes publicações foram produzidas:

- Topological Mapping of Neurons using Activities Detected in MEA Recording Signals. *PROCEDIA COMPUTER SCIENCE*. , v.126, p.751 - 758, 2018.
- GPU Cuda JSEG Segmentation Algorithm associated with Deep Learning Classifier for Electrical Network Images Identification. *PROCEDIA COMPUTER SCIENCE*. , v.126, p.557 - 565, 2018.
- Approach Based on Fuzzy C-Means for Band Selection in Hyperspectral Images. *WORLD ACADEMY OF SCIENCES*, v.10, p.889 - 895, 2016.
- Virtual Neuron imaging using self-organizing maps obtained by analyzing signals from neurons grown in vitro. *International Journal of Neural Systems* (À submeter).

REFERÊNCIAS

- ADELMAN, G. The neurosciences research program at mit and the beginning of the modern field of neuroscience. *Journal of the History of the Neurosciences*, Taylor & Francis, v. 19, n. 1, p. 15–23, 2010.
- ALUR, D. et al. *Core J2EE Patterns (Core Design Series): Best Practices and Design Strategies*. [S.l.]: Sun Microsystems, Inc., 2003.
- ANTONIOU, A. *Digital signal processing*. [S.l.]: McGraw-Hill, 2016.
- ARLOTTA, P. et al. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, Elsevier, v. 45, n. 2, p. 207–221, 2005.
- ASSIS, T. A. de; MIRANDA, J. G. V.; CAVALVANTE, S. A dinâmica da condução nervosa via modelo de fitzhugh-nagumo. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, SciELO Brasil, v. 32, n. 1, p. 1307, 2010.
- BAK, P.; TANG, C.; WIESENFELD, K. Self-organized criticality: An explanation of the 1/f noise. *Physical review letters*, APS, v. 59, n. 4, p. 381, 1987.
- BARR, R. C.; BRONZINO, J. D. Basic electrophysiology. *The biomedical engineering handbook*, v. 2, 2000.
- BARRETO, M. A.; FAMBRINI, F.; SAITO, J. H. Microelectrode array signal amplification using stochastic resonance. In: IEEE. *IECON 2015-41st Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society*. [S.l.], 2015. p. 002030–002035.
- BARTO, A. G.; ANANDAN, P. Pattern-recognizing stochastic learning automata. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, IEEE, n. 3, p. 360–375, 1985.
- BASSANI, H. F.; ARAÚJO, A. F. Dimension selective self-organizing maps for clustering high dimensional data. In: IEEE. *The 2012 International Joint Conference on Neural Networks (IJCNN)*. [S.l.], 2012. p. 1–8.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. [S.l.]: Artmed Editora, 2007.
- BEN-ARI, Y. Developing networks play a similar melody. *Trends in neurosciences*, Elsevier, v. 24, n. 6, p. 353–360, 2001.
- BERDONDINI, L. et al. A microelectrode array (mea) integrated with clustering structures for investigating in vitro neurodynamics in confined interconnected sub-populations of neurons. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier, v. 114, n. 1, p. 530–541, 2006.

- BERDONINI, L. et al. Extracellular recordings from locally dense microelectrode arrays coupled to dissociated cortical cultures. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 177, n. 2, p. 386–396, 2009.
- BLAU, A. Cell adhesion promotion strategies for signal transduction enhancement in microelectrode array in vitro electrophysiology: An introductory overview and critical discussion. *Current opinion in colloid & interface science*, Elsevier, v. 18, n. 5, p. 481–492, 2013.
- BOCK, D. D. et al. Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature*, Nature Research, v. 471, n. 7337, p. 177–182, 2011.
- BONTORIN, G. et al. A real-time closed-loop setup for hybrid neural networks. In: IEEE. *Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. EMBS 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE*. [S.l.], 2007. p. 3004–3007.
- BROWN, G. D.; YAMADA, S.; SEJNOWSKI, T. J. Independent component analysis at the neural cocktail party. *Trends in neurosciences*, Elsevier, v. 24, n. 1, p. 54–63, 2001.
- CAPORALE, N.; DAN, Y. Spike timing–dependent plasticity: a hebbian learning rule. *Annu. Rev. Neurosci.*, Annual Reviews, v. 31, p. 25–46, 2008.
- CHAO, Z. C.; BAKKUM, D. J.; POTTER, S. M. Region-specific network plasticity in simulated and living cortical networks: comparison of the center of activity trajectory (cat) with other statistics. *Journal of Neural Engineering*, IOP Publishing, v. 4, n. 3, p. 294, 2007.
- CHIAPPALONE, M. et al. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain research*, Elsevier, v. 1093, n. 1, p. 41–53, 2006.
- CHIAPPALONE, M. et al. Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 18, n. 5, p. 627–634, 2003.
- CLAVEROL-TINTURE, E. et al. Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons. *Journal of neural engineering*, IOP Publishing, v. 2, n. 2, p. L1, 2005.
- CORNER, M. A. Spontaneous neuronal burst discharges as dependent and independent variables in the maturation of cerebral cortex tissue cultured in vitro: a review of activity-dependent studies in live ‘model’ systems for the development of intrinsically generated bioelectric slow-wave sleep patterns. *Brain research reviews*, Elsevier, v. 59, n. 1, p. 221–244, 2008.
- COSTA, L. d. F. D.; JR, R. M. C. *Shape analysis and classification: theory and practice*. [S.l.]: CRC Press, Inc., 2000.
- DALY, J. J.; WOLPAW, J. R. Brain–computer interfaces in neurological rehabilitation. *The Lancet Neurology*, Elsevier, v. 7, n. 11, p. 1032–1043, 2008.
- DAVISON, A. P. et al. Pynn: a common interface for neuronal network simulators. *Frontiers in neuroinformatics*, Frontiers, v. 2, p. 11, 2009.

- DEMARSE, T. B. et al. The neurally controlled animat: biological brains acting with simulated bodies. *Autonomous robots*, Springer, v. 11, n. 3, p. 305–310, 2001.
- DICHTER, M. A.; FISCHBACH, G. D. The action potential of chick dorsal root ganglion neurones maintained in cell culture. *The Journal of physiology*, Wiley Online Library, v. 267, n. 2, p. 281–298, 1977.
- DROGE, M. H. et al. Multielectrode analysis of coordinated, multisite, rhythmic bursting in cultured cns monolayer networks. *Journal of Neuroscience*, Society for Neuroscience, v. 6, n. 6, p. 1583–1592, 1986.
- EINEVOLL, G. T. et al. Towards reliable spike-train recordings from thousands of neurons with multielectrodes. *Current opinion in neurobiology*, Elsevier, v. 22, n. 1, p. 11–17, 2012.
- ERICKSON, J. et al. Caged neuron mea: A system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 175, n. 1, p. 1–16, 2008.
- ERWIN, E.; OBERMAYER, K.; SCHULTEN, K. Self-organizing maps: ordering, convergence properties and energy functions. *Biological cybernetics*, Springer, v. 67, n. 1, p. 47–55, 1992.
- EYTAN, D.; MAROM, S. Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, Soc Neuroscience, v. 26, n. 33, p. 8465–8476, 2006.
- FREGA, M. et al. Cortical cultures coupled to micro-electrode arrays: a novel approach to perform in vitro excitotoxicity testing. *Neurotoxicology and teratology*, Elsevier, v. 34, n. 1, p. 116–127, 2012.
- FRIEDMAN, P. A. Novel mapping techniques for cardiac electrophysiology. *Heart*, BMJ Publishing Group Ltd, v. 87, n. 6, p. 575–582, 2002.
- GIUGLIANO, M.; MARTINOIA, S. Substrate arrays of microelectrodes for in vitro electrophysiology. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, Wiley Online Library, 2006.
- GOLDBERG, Y. A primer on neural network models for natural language processing. *J. Artif. Intell. Res.(JAIR)*, v. 57, p. 345–420, 2016.
- GRAY, C. M. et al. Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 63, n. 1-2, p. 43–54, 1995.
- GROSS, G. W. et al. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 10, n. 6-7, p. 553–567, 1995.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. *Tratado de fisiologia médica*. [S.l.]: Elsevier Brasil, 2006.
- HAI, A.; SHAPPIR, J.; SPIRA, M. E. In-cell recordings by extracellular microelectrodes. *Nature methods*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 3, p. 200–202, 2010.

- HAMPSON, R. E.; SIMERAL, J. D.; DEADWYLER, S. A. Distribution of spatial and nonspatial information in dorsal hippocampus. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 402, n. 6762, p. 610, 1999.
- HARRIS, K. D. et al. Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements. *Journal of neurophysiology*, American Physiological Society Bethesda, MD, v. 84, n. 1, p. 401–414, 2000.
- HEBB, D. O. *The organization of behavior: A neuropsychological approach*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1949.
- HEIM, M.; YVERT, B.; KUHN, A. Nanostructuring strategies to enhance microelectrode array (mea) performance for neuronal recording and stimulation. *Journal of Physiology-Paris*, Elsevier, v. 106, n. 3-4, p. 137–145, 2012.
- HOLLAND, N. D. Early central nervous system evolution: an era of skin brains? *Nature Reviews Neuroscience*, Nature Publishing Group, v. 4, n. 8, p. 617–627, 2003.
- HOLTMAAT, A. J. et al. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, Elsevier, v. 45, n. 2, p. 279–291, 2005.
- HOPFIELD, J. J. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proceedings of the national academy of sciences*, National Acad Sciences, v. 79, n. 8, p. 2554–2558, 1982.
- HULLE, M. M. V. *Faithful representations and topographic maps: From distortion-to information-based self-organization*. [S.l.]: Wiley New York, 2000.
- HYVÄRINEN, A.; OJA, E. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural networks*, Elsevier, v. 13, n. 4, p. 411–430, 2000.
- ITO, D. et al. Minimum neuron density for synchronized bursts in a rat cortical culture on multi-electrode arrays. *Neuroscience*, Elsevier, v. 171, n. 1, p. 50–61, 2010.
- IZHIKEVICH, E. M. Simple model of spiking neurons. *IEEE Transactions on neural networks*, IEEE, v. 14, n. 6, p. 1569–1572, 2003.
- JAIN, A. Spike annealing for ultra-shallow junction formation. In: THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY. *Rapid Thermal and Other Short-time Processing Technologies: Proceedings of the International Symposium*. [S.l.], 2000. v. 2000, p. 33.
- JEROME, W. G.; PRICE, R. L. *Basic confocal microscopy*. [S.l.]: Springer, 2018.
- JJ, S. et al. 3d convolutional neural networks for human action recognition. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, IEEE, v. 35, n. 1, p. 221–231, 2013.
- JIMBO, Y. et al. A system for mea-based multisite stimulation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, IEEE, v. 50, n. 2, p. 241–248, 2003.
- JIMBO, Y. et al. Mea-based spike recording in cultured neuronal networks. In: *Frontiers in Biochip Technology*. [S.l.]: Springer, 2006. p. 88–98.
- JIMBO, Y. et al. The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats. *Biological cybernetics*, Springer, v. 83, n. 1, p. 1–20, 2000.

- JIMBO, Y.; TATENO, T.; ROBINSON, H. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 76, n. 2, p. 670–678, 1999.
- JOBLING, D.; SMITH, J.; WHEAL, H. Active microelectrode array to record from the mammalian central nervous system in vitro. *Medical and biological engineering and computing*, Springer, v. 19, n. 5, p. 553–560, 1981.
- JOHNSTONE, A. F. et al. Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. *Neurotoxicology*, Elsevier, v. 31, n. 4, p. 331–350, 2010.
- JONES, I. L. et al. A method for electrophysiological characterization of hamster retinal ganglion cells using a high-density cmos microelectrode array. *Frontiers in neuroscience*, Frontiers, v. 9, p. 360, 2015.
- KANTARDZIC, M. *Data mining: concepts, models, methods, and algorithms*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2011.
- KASKI, S.; KOHONEN, T. Winner-take-all networks for physiological models of competitive learning. *Neural Networks*, Elsevier, v. 7, n. 6-7, p. 973–984, 1994.
- KETCHEN, D. J.; SHOOK, C. L. The application of cluster analysis in strategic management research: an analysis and critique. *Strategic management journal*, Wiley Online Library, v. 17, n. 6, p. 441–458, 1996.
- KOHONEN, T. The self-organizing map. *Proceedings of the IEEE*, IEEE, v. 78, n. 9, p. 1464–1480, 1990.
- KOHONEN, T. Exploration of very large databases by self-organizing maps. In: IEEE. *Proceedings of International Conference on Neural Networks (ICNN'97)*. [S.l.], 1997. v. 1, p. PL1–PL6.
- KOHONEN, T. *Self-organization and associative memory*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2012. v. 8.
- KOSHIMIZU, Y. et al. Quantitative analysis of axon bouton distribution of subthalamic nucleus neurons in the rat by single neuron visualization with a viral vector. *Journal of Comparative Neurology*, Wiley Online Library, v. 521, n. 9, p. 2125–2146, 2013.
- KRASNER, G. E.; POPE, S. T. et al. A description of the model-view-controller user interface paradigm in the smalltalk-80 system. *Journal of object oriented programming*, v. 1, n. 3, p. 26–49, 1988.
- KRIZHEVSKY, A.; SUTSKEVER, I.; HINTON, G. E. Imagenet classification with deep convolutional neural networks. In: *Advances in neural information processing systems*. [S.l.: s.n.], 2012. p. 1097–1105.
- LEWICKI, M. S. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network: Computation in Neural Systems*, Taylor & Francis, v. 9, n. 4, p. R53–R78, 1998.
- LIU, H.; MOTODA, H. *Computational methods of feature selection*. [S.l.]: CRC Press, 2007.

- LIU, H.; YU, L. Toward integrating feature selection algorithms for classification and clustering. *IEEE Transactions on Knowledge & Data Engineering*, IEEE, n. 4, p. 491–502, 2005.
- LOEB, G.; LEVINE, W.; HE, J. Understanding sensorimotor feedback through optimal control. In: COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. [S.l.], 1990. v. 55, p. 791–803.
- LOUIS, D. N. et al. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, Springer, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.
- MAASS, W. Searching for principles of brain computation. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, Elsevier, v. 11, p. 81–92, 2016.
- MARI, J. F. et al. Quantitative analysis of rat dorsal root ganglion neurons cultured on microelectrode arrays based on fluorescence microscopy image processing. *International journal of neural systems*, World Scientific, v. 25, n. 08, p. 1550033, 2015.
- MAROM, S. et al. On the precarious path of reverse neuro-engineering. *Frontiers in computational neuroscience*, Frontiers, v. 3, p. 5, 2009.
- MAROM, S.; SHAHAF, G. Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. *Quarterly reviews of biophysics*, Cambridge University Press, v. 35, n. 1, p. 63–87, 2002.
- MASSOBRIO, P.; MARTINOIA, S. Modelling small-patterned neuronal networks coupled to microelectrode arrays. *Journal of neural engineering*, IOP Publishing, v. 5, n. 3, p. 350, 2008.
- MCCULLOCH, W. S.; PITTS, W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of mathematical biology*, Elsevier, v. 52, n. 1-2, p. 99–115, 1990.
- MEISTER, M.; PINE, J.; BAYLOR, D. A. Multi-neuronal signals from the retina: acquisition and analysis. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 51, n. 1, p. 95–106, 1994.
- MITIANOUDIS, N.; DAVIES, M. E. Audio source separation: Solutions and problems. *International Journal of Adaptive Control and Signal Processing*, Wiley Online Library, v. 18, n. 3, p. 299–314, 2004.
- MNIH, V. et al. Playing atari with deep reinforcement learning. *arXiv preprint arXiv:1312.5602*, 2013.
- NARENDRA, K. S.; PARTHASARATHY, K. Gradient methods for the optimization of dynamical systems containing neural networks. *IEEE Transactions on Neural Networks*, IEEE, v. 2, n. 2, p. 252–262, 1991.
- NELSON, R. et al. Detection of high frequency oscillations with teager energy in an animal model of limbic epilepsy. In: IEEE. *Engineering in Medicine and Biology Society, 2006. EMBS'06. 28th Annual International Conference of the IEEE*. [S.l.], 2006. p. 2578–2580.
- NEWELL, A.; SIMON, H. A. et al. *Human problem solving*. [S.l.]: Prentice-Hall Englewood Cliffs, NJ, 1972. v. 104.

- NOVELLINO, A. et al. Behaviors from an electrically stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays. *Neurocomputing*, Elsevier, v. 52, p. 661–669, 2003.
- ODAWARA, A. et al. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochemical and biophysical research communications*, Elsevier, v. 443, n. 4, p. 1176–1181, 2014.
- OKOSHI, T. *Three-dimensional imaging techniques*. [S.l.]: Elsevier, 2012.
- PASQUALE, V. et al. Self-organization and neuronal avalanches in networks of dissociated cortical neurons. *Neuroscience*, Elsevier, v. 153, n. 4, p. 1354–1369, 2008.
- PELT, J. van et al. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, IEEE, v. 51, n. 11, p. 2051–2062, 2004.
- PINE, J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 2, n. 1, p. 19–31, 1980.
- POTTER, S.; WAGENAAR, D.; DEMARSE, T. Closing the loop: stimulation feedback systems for embodied mea cultures. *Advances in network electrophysiology*, Springer, p. 215–242, 2006.
- POTTER, S. M.; DEMARSE, T. B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 110, n. 1, p. 17–24, 2001.
- POUZAT, C.; MAZOR, O.; LAURENT, G. Using noise signature to optimize spike-sorting and to assess neuronal classification quality. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 122, n. 1, p. 43–57, 2002.
- PURVES, D. et al. *Neurociências-4*. [S.l.]: Artmed editora, 2010.
- QUIROGA, R. Q.; NADASDY, Z.; BEN-SHAUL, Y. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural computation*, MIT Press, v. 16, n. 8, p. 1661–1687, 2004.
- RIEKE, F. *Spikes: exploring the neural code*. [S.l.]: MIT press, 1999.
- ROLSTON, J. D.; GROSS, R. E.; POTTER, S. M. Closed-loop, open-source electrophysiology. *Frontiers in neuroscience*, Frontiers Media SA, v. 4, 2010.
- ROSENBLATT, F. The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychological review*, American Psychological Association, v. 65, n. 6, p. 386, 1958.
- RUMELHART, D. E.; HINTON, G. E.; WILLIAMS, R. J. Learning representations by back-propagating errors. *nature*, Nature Publishing Group, v. 323, n. 6088, p. 533, 1986.
- RUMELHART, D. E.; MCCLELLAND, J. L. *Parallel distributed processing: Explorations in the microstructure of cognition: Foundations (Parallel distributed processing)*. [S.l.]: MIT Press, August, 1986.

- RUTISHAUSER, U.; MAMELAK, A. N.; SCHUMAN, E. M. Single-trial learning of novel stimuli by individual neurons of the human hippocampus-amygdala complex. *Neuron*, Elsevier, v. 49, n. 6, p. 805–813, 2006.
- RUTISHAUSER, U.; SCHUMAN, E. M.; MAMELAK, A. N. Online detection and sorting of extracellularly recorded action potentials in human medial temporal lobe recordings, in vivo. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 154, n. 1, p. 204–224, 2006.
- RUTTEN, W. et al. Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a cultured probe. *Proceedings of the IEEE*, IEEE, v. 89, n. 7, p. 1013–1029, 2001.
- SADIKU, M. N.; ALEXANDER, C. K.; MUSA, S. *Análise de circuitos elétricos com aplicações*. [S.l.]: AMGH Editora, 2014.
- SAITO, J. H. et al. Simulated activation patterns of biological neurons cultured onto a multi-electrode array based on a modified izhikevich's model. *Fundamenta Informaticae*, IOS Press, v. 124, n. 1-2, p. 111–132, 2013.
- SCHNITZER, M. J.; MEISTER, M. Multineuronal firing patterns in the signal from eye to brain. *Neuron*, Elsevier, v. 37, n. 3, p. 499–511, 2003.
- SEGEV, R. et al. Recording spikes from a large fraction of the ganglion cells in a retinal patch. *Nature neuroscience*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 10, p. 1155, 2004.
- SILVA, D. D. et al. A data mining framework for electricity consumption analysis from meter data. *IEEE Transactions on Industrial Informatics*, IEEE, v. 7, n. 3, p. 399–407, 2011.
- SILVA, I. d.; SPATTI, D. H.; FLAUZINO, R. A. Redes neurais artificiais para engenharia e ciências aplicadas. *São Paulo: Artliber*, p. 33–111, 2010.
- SOUSSOU, W. et al. Mapping spatio-temporal electrophysiological activity in hippocampal slices with conformal planar multi-electrode arrays. In: *Advances in Network Electrophysiology*. [S.l.]: Springer, 2006. p. 127–152.
- STETT, A. et al. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Springer, v. 377, n. 3, p. 486–495, 2003.
- TAKAHASHI, S.; ANZAI, Y.; SAKURAI, Y. A new approach to spike sorting for multi-neuronal activities recorded with a tetrode—how it can be practical. *Neuroscience research*, Elsevier, v. 46, n. 3, p. 265–272, 2003.
- TAKEUCHI, A. et al. Device for co-culture of sympathetic neurons and cardiomyocytes using microfabrication. *Lab on a Chip*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 13, p. 2268–2275, 2011.
- THOMAS, C. et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental cell research*, Elsevier, v. 74, n. 1, p. 61–66, 1972.
- TORBORG, C. L.; FELLER, M. B. Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Progress in neurobiology*, Elsevier, v. 76, n. 4, p. 213–235, 2005.
- ULTSCH, A. Self-organizing neural networks for visualisation and classification. In: *Information and classification*. [S.l.]: Springer, 1993. p. 307–313.

- VASSALLO, A. et al. A multi-laboratory evaluation of microelectrode array-based measurements of neural network activity for acute neurotoxicity testing. *Neurotoxicology*, Elsevier, v. 60, p. 280–292, 2017.
- VESANTO, J.; ALHONIEMI, E. et al. Clustering of the self-organizing map. *IEEE Transactions on neural networks*, Citeseer, v. 11, n. 3, p. 586–600, 2000.
- WAGENAAR, D. A. et al. Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *Journal of Neuroscience*, Soc Neuroscience, v. 25, n. 3, p. 680–688, 2005.
- WAGENAAR, D. A.; PINE, J.; POTTER, S. M. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 138, n. 1-2, p. 27–37, 2004.
- WAGENAAR, D. A.; PINE, J.; POTTER, S. M. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC neuroscience*, BioMed Central, v. 7, n. 1, p. 11, 2006.
- WERBOS, P. J. Beyond regression: New tools for prediction and analysis in the behavioral sciences. *Doctoral Dissertation, Applied Mathematics, Harvard University, MA*, 1974.
- WERBOS, P. J. Backpropagation through time: what it does and how to do it. *Proceedings of the IEEE*, IEEE, v. 78, n. 10, p. 1550–1560, 1990.
- WHEELER, B. C.; HEETDERKS, W. J. A comparison of techniques for classification of multiple neural signals. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, IEEE, n. 12, p. 752–759, 1982.
- WHEELER, B. C.; NOVAK, J. L. Current source density estimation using microelectrode array data from the hippocampal slice preparation. *IEEE transactions on biomedical engineering*, IEEE, n. 12, p. 1204–1212, 1986.
- WHITSON, J. et al. Multi-electrode arrays: enhancing traditional methods and enabling network physiology. *Advances in Network Electrophysiology*, Springer, p. 38–68, 2006.
- WIDMANN, A.; SCHRÖGER, E.; MAESS, B. Digital filter design for electrophysiological data—a practical approach. *Journal of neuroscience methods*, Elsevier, v. 250, p. 34–46, 2015.
- WU, Q.; MERCHANT, F.; CASTLEMAN, K. *Microscope image processing*. [S.l.]: Elsevier, 2010.
- YADA, Y. et al. Development of neural population activity toward self-organized criticality. *Neuroscience*, Elsevier, v. 343, p. 55–65, 2017.
- ZHANG, B. Regression clustering. In: IEEE. *Third IEEE International Conference on Data Mining*. [S.l.], 2003. p. 451–458.
- ZUCHINI, M. H. et al. Aplicações de mapas auto-organizáveis em mineração de dados e recuperação de informação. [sn], 2003.

Apendice A

TABELAS DAS MEDIDAS QUANTITATIVAS DOS DIV'S 25, 29, 32, 36, 43 E 46

Neste apêndice são descritos os resultados das medidas quantitativas contendo o número de spikes, a classificação e o número de neurônios estimados pelo algoritmo SOM para os DIV's 29, 32, 36, 43 e 46. Nas tabelas é possível observar da esquerda para direita, o número de identificação do eletrodo, a quantidade de spikes obtidos durante os 20 minutos de observação, a associação dos neurônios virtuais a uma das três classes: A, B, C ou N, sendo este os spikes que não foram classificados em nenhuma das classes.

Tabela A.1: Classificação dos neurônios no DIV25

ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N	ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N
12	10421	42	19	6	15	2	51	1432	10	3	5	2	0
13	2605	13	8	2	3	0	52	2844	22	5	11	4	2
14	19738	72	33	12	21	6	53	2536	14	2	8	0	2
16	13467	62	26	16	19	1	54	3993	27	8	11	7	1
17	106	1	1	0	0	0	55	1453	14	2	10	1	1
21	4502	18	8	7	2	1	56	2010	10	3	7	0	0
22	2519	24	9	7	7	1	57	163	4	0	3	1	0
23	582	2	1	1	0	0	58	1121	12	4	5	2	1
24	5143	22	16	5	1	0	61	5883	34	12	14	3	5
25	3854	10	3	2	5	0	62	1547	9	3	4	1	2
26	2033	17	4	4	7	2	63	71	1	0	0	1	0
27	3540	20	8	7	2	3	64	6404	30	6	12	11	1
28	2664	23	9	11	2	1	65	4371	15	2	10	3	0
31	3070	20	4	9	5	2	66	1079	9	3	5	1	0
32	3354	17	3	4	8	2	67	1588	22	7	15	0	0
33	1625	12	1	6	4	1	68	477	5	1	3	1	0
34	3929	16	2	5	8	1	71	4725	26	13	5	7	1
35	2936	8	6	1	1	0	72	3078	22	14	4	4	0
36	1739	11	8	2	1	0	73	2520	10	6	0	2	2
37	4150	34	11	6	15	2	74	5046	17	7	4	5	1
38	2601	24	12	4	7	1	75	2654	14	4	8	2	0
41	3609	18	5	10	3	0	76	4200	29	10	14	3	2
42	545	8	3	4	1	0	77	8438	76	17	38	14	7
43	1558	12	6	4	1	1	78	75	3	0	3	0	0
44	3355	21	4	10	7	0	82	7680	25	10	4	7	4
45	3779	17	8	2	4	0	83	6778	29	14	5	9	1
46	7895	62	31	9	15	7	84	6143	22	10	7	4	1
47	750	7	5	2	0	0	85	8557	24	9	6	7	2
48	293	10	6	2	1	1	86	2140	11	7	3	0	1
							87	3087	9	5	2	1	1

Tabela A.2: Classificação dos neurônios no DIV29

ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N	ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N
12	7375	54	21	17	11	5	51	159	21	11	5	3	2
13	807	15	7	5	2	1	52	394	19	8	6	3	2
14	5375	43	17	16	6	4	53	362	12	7	5	0	0
16	3737	69	33	19	10	7	54	621	16	8	6	1	1
17	73	9	6	3	0	0	55	242	12	6	4	2	0
21	585	12	7	3	1	1	56	259	17	10	5	1	1
22	94	9	5	3	1	0	57	48	10	5	3	2	0
23	133	15	8	4	1	2	58	55	8	3	3	2	0
24	890	17	7	6	4	0	61	420	12	6	0	5	1
25	1278	26	10	7	7	2	62	243	18	6	5	5	2
26	1203	23	12	5	4	2	63	5	11	5	1	3	2
27	943	23	13	5	5	0	64	1115	23	10	5	7	1
28	674	11	5	4	2	0	65	741	18	11	4	2	1
31	398	11	6	2	3	0	66	411	15	6	5	4	0
32	447	13	6	5	2	0	67	473	22	9	7	5	1
33	71	8	4	2	2	0	68	51	10	4	6	0	0
34	578	17	8	5	3	1	71	333	20	6	10	3	1
35	513	12	6	3	2	1	72	75	14	5	4	5	0
36	241	19	9	5	4	1	73	371	21	9	7	4	1
37	1282	22	8	10	4	0	74	1975	31	8	12	8	3
38	719	15	5	7	3	0	75	7112	19	5	10	3	1
41	229	36	17	9	6	4	76	776	28	9	11	5	3
42	25	16	8	6	1	1	77	1421	33	14	10	7	2
43	152	7	3	2	2	0	78	18	5	3	1	1	0
44	439	18	11	2	5	0	82	617	18	7	8	2	1
45	853	20	12	4	3	1	83	1081	21	10	7	3	1
46	975	47	24	12	8	3	84	814	14	5	6	3	0
47	616	24	12	7	3	2	85	1488	22	9	10	2	1
48	10	7	5	1	1	0	86	430	14	7	5	2	0
							87	816	26	11	10	5	0

Tabela A.3: Classificação dos neurônios no DIV32

ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N	ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N
12	7213	49	19	11	14	5	51	135	9	5	2	1	1
13	971	9	6	0	2	1	52	293	11	6	3	1	1
14	8791	69	29	17	15	8	53	510	9	7	1	0	1
16	7646	46	20	7	15	4	54	994	17	10	4	2	1
17	108	6	4	1	1	0	55	333	9	9	0	0	0
21	1269	12	6	5	1	0	56	697	20	11	2	5	2
22	169	8	4	1	1	2	57	234	18	12	4	0	2
23	159	12	9	2	1	0	58	110	5	5	0	0	0
24	2214	36	17	8	6	5	61	3075	22	10	6	4	2
25	1638	29	12	9	6	2	62	197	16	6	5	4	1
26	1359	29	13	10	5	1	63	15	11	8	2	0	1
27	1795	34	15	9	7	3	64	2064	27	13	7	6	1
28	1349	11	6	3	2	0	65	1080	17	9	4	2	2
31	813	8	3	2	3	0	66	942	23	12	6	1	4
32	824	17	5	6	4	2	67	992	22	12	7	2	1
33	127	11	5	4	2	0	68	157	5	5	0	0	0
34	1590	21	8	6	5	2	71	4367	45	17	21	4	3
35	1127	18	9	1	8	0	72	1034	31	14	9	7	1
36	848	15	6	7	1	1	73	669	17	9	5	1	2
37	2013	30	9	10	7	4	74	2658	39	18	8	10	3
38	1482	9	5	3	1	0	75	743	15	10	2	1	2
41	1719	20	14	4	2	0	76	2622	31	11	15	3	2
42	21	8	6	1	0	1	77	2876	48	15	21	8	4
43	272	7	5	2	0	0	78	35	7	3	4	0	0
44	1547	18	9	5	2	2	82	956	12	4	6	0	2
45	1779	16	9	4	1	2	83	1669	11	5	5	0	1
46	3874	43	22	9	8	4	84	1695	12	6	3	2	1
47	768	13	7	3	2	1	85	2339	13	9	2	1	1
48	31	4	4	0	0	0	86	493	12	8	3	1	0
							87	1493	18	8	4	5	1

Tabela A.4: Classificação dos neurônios no DIV36

ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N	ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N
12	2329	18	9	3	4	2	51	27	12	7	5	0	0
13	770	13	8	1	3	1	52	142	16	6	9	1	0
14	8204	54	23	17	9	5	53	182	13	9	2	1	1
16	7211	48	24	14	7	3	54	700	21	10	5	4	2
17	53	9	6	2	1	0	55	202	8	5	0	3	0
21	1152	20	10	6	4	0	56	364	14	8	2	4	0
22	119	12	8	0	2	2	57	32	10	9	0	1	0
23	89	12	9	1	2	0	58	35	10	8	0	2	0
24	1238	21	11	6	4	0	61	612	20	13	2	4	1
25	1294	32	15	9	7	1	62	126	23	15	4	4	0
26	1128	26	11	10	4	1	63	9	16	9	5	1	1
27	1246	33	17	7	5	4	64	1655	21	12	3	4	2
28	841	11	6	1	3	1	65	764	25	13	7	3	2
31	492	19	9	5	2	3	66	613	24	15	5	2	2
32	356	13	8	3	1	1	67	462	18	8	9	1	0
33	296	10	9	0	1	0	68	67	11	6	4	1	0
34	1051	20	14	5	1	0	71	2008	21	10	3	6	2
35	1093	23	13	6	3	1	72	213	22	11	4	6	1
36	471	18	9	6	2	1	73	351	28	10	8	7	3
37	1591	23	10	4	7	2	74	1057	33	15	7	9	2
38	1049	12	10	1	1	0	75	378	29	13	12	2	2
41	395	17	11	3	2	1	76	1423	26	10	9	6	1
42	8	12	12	3	2	1	77	1287	39	19	13	5	2
43	447	13	7	5	1	0	78	24	8	6	1	1	0
44	948	14	4	2	8	0	82	693	15	8	6	1	0
45	1097	15	5	3	7	0	83	739	21	9	7	4	1
46	3639	34	11	5	14	4	84	1083	16	10	4	3	0
47	370	30	9	5	14	2	85	1582	13	8	1	3	1
48	36	1	0	0	1	0	86	410	9	8	1	0	0
							87	1804	24	9	6	7	2

Tabela A.5: Classificação dos neurônios no DIV39

ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N	ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N
12	2427	28	12	7	8	1	51	111	6	1	2	2	1
13	872	8	5	2	1	0	52	223	7	0	3	3	1
14	7028	47	17	14	13	3	53	393	11	4	2	1	0
16	1299	22	8	6	7	1	54	1378	21	2	11	8	0
17	191	6	1	2	1	2	55	841	15	2	7	5	1
21	1214	23	8	9	6	0	56	1384	30	6	10	11	3
22	906	19	6	4	8	1	57	556	11	4	5	1	1
23	901	14	6	4	2	2	58	23	3	0	0	3	0
24	2086	31	12	11	8	0	61	1358	12	2	5	4	1
25	2511	35	14	12	7	2	62	1308	16	4	6	5	1
26	1811	39	16	11	9	3	63	122	6	1	2	2	1
27	2301	32	11	12	7	2	64	1733	26	10	8	6	2
28	1257	7	2	4	1	0	65	3887	31	14	5	11	1
31	1406	27	8	11	7	1	66	1246	25	11	4	9	1
32	1060	20	7	7	5	1	67	1232	19	9	7	2	1
33	951	22	6	9	7	0	68	100	1	1	0	0	0
34	1160	39	18	10	9	2	71	650	10	5	2	3	0
35	1558	34	14	6	11	3	72	476	14	6	4	3	1
36	1292	22	10	5	6	1	73	548	21	1	6	7	6
37	2343	36	20	7	8	1	74	2789	37	13	8	14	2
38	1006	7	1	2	4	0	75	1710	19	8	2	7	2
41	922	7	4	0	3	0	76	1970	23	10	4	6	3
42	711	12	6	1	5		77	3748	48	23	10	11	4
43	808	19	11	5	2	1	78	11	1	0	0	0	1
44	2125	27	13	4	8	2	82	744	17	7	6	4	0
45	1844	38	19	6	11	2	83	604	13	1	9	2	1
46	2789	36	17	8	10	1	84	1683	12	2	9	1	0
47	1557	11	4	7	0	0	85	2846	22	5	10	4	3
48	56	1	0	0	1	0	86	311	6	3	1	1	1
							87	1683	11	6	1	4	0

Tabela A.6: Classificação dos neurônios no DIV43

ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N	ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N
12	1518	22	7	12	3	0	51	16	11	7	3	1	0
13	691	15	5	8	1	0	52	71	11	7	2	2	0
14	10481	65	20	29	11	5	53	188	12	10	1	1	0
16	12320	78	23	38	14	3	54	842	19	8	5	4	2
17	29	11	6	5	0	0	55	398	11	9	1	1	0
21	1086	17	7	8	2	0	56	72	9	5	0	3	1
22	95	14	5	6	3	0	57	33	14	6	5	3	0
23	37	10	1	3	4	2	58	5	11	6	3	1	1
24	1364	18	9	5	3	1	61	309	12	5	5	2	0
25	1641	30	13	9	6	2	62	565	20	9	6	5	0
26	1046	24	9	10	5	0	63	15	12	7	3	2	0
27	1882	31	13	18	0	0	64	2379	29	16	6	7	0
28	279	7	1	6	0	0	65	657	15	10	4	2	0
31	509	16	4	5	6	1	66	727	20	11	4	3	2
32	727	20	11	2	6	1	67	519	16	8	5	2	1
33	99	13	8	3	2	0	68	40	13	4	5	4	0
34	915	16	6	4	5	1	71	96	14	6	4	3	1
35	1267	20	10	6	3	1	72	310	14	7	3	4	0
36	171	10	6	3	1	0	73	522	26	15	5	4	2
37	1896	30	16	9	5	0	74	4352	57	30	14	10	3
38	789	10	7	2	1	0	75	520	18	11	3	4	0
41	135	14	10	3	1	0	76	2311	44	21	11	7	5
42	10	13	8	5	0	0	77	1289	21	10	6	5	0
43	846	14	8	5	1	0	78	13	11	8	0	2	1
44	1309	19	11	4	3	1	82	146	12	12	0	0	0
45	2244	26	10	8	7	1	83	594	15	7	3	5	0
46	2234	23	9	8	5	1	84	1383	18	10	5	3	0
47	183	9	6	1	2	0	85	3517	29	15	9	4	1
48	1	0					86	424	10	5	2	3	0
							87	1682	21	9	10	2	0

Tabela A.7: Classificação dos neurônios no DIV46

ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N	ID Eletrodo	Spikes	Qto. Neurônios	A	B	C	N
12	2119	18	8	5	4	1	51	10	10	6	3	1	0
13	852	10	6	2	1	1	52	638	20	8	9	3	0
14	10015	41	19	9	10	3	53	334	11	4	5	2	0
16	9446	44	23	8	12	1	54	1400	14	5	6	2	1
17	143	8	6	2	0	0	55	422	9	6	1	2	0
21	3110	21	10	8	2	1	56	438	11	10	0	1	0
22	743	21	11	9	1	0	57	105	10	8	0	2	0
23	72	16	9	5	2	0	58	5	6	6	0	0	0
24	2287	26	12	7	5	2	61	103	13	4	5	2	2
25	3321	46	23	13	6	4	62	162	13	5	5	3	0
26	3185	35	15	10	7	3	63	26	7	5	2	0	0
27	3115	44	22	9	11	2	64	3725	44	26	10	5	3
28	307	0	0	0	0	0	65	1418	27	15	4	3	5
31	1449	19	11	6	2	0	66	1753	24	10	6	5	3
32	717	14	6	4	4	0	67	1019	20	9	7	4	0
33	960	17	9	6	2	0	68	54	6	1	4	1	0
34	2497	21	13	3	4	1	71	59	14	6	5	3	0
35	2597	31	15	10	6	0	72	481	18	9	5	4	0
36	398	14	7	3	4	0	73	218	15	7	7	0	1
37	2949	35	17	8	9	1	74	3199	41	18	11	8	4
38	691	5	1	4	0	0	75	1424	26	11	6	7	2
41	290	12	7	3	2	0	76	3708	49	29	10	9	1
42	36	10	5	3	2	0	77	1627	23	9	7	7	0
43	1125	18	7	5	4	2	78	16	4	0	0	4	0
44	1503	21	11	5	3	2	82	159	13	3	5	4	1
45	3007	23	16	6	1	0	83	559	17	9	5	3	0
46	3279	33	19	9	5	0	84	3096	23	14	4	3	2
47	472	12	8	5	1	0	85	5012	27	15	7	4	1
48	4	3	0	1	2	0	86	844	10	7	3	0	0
							87	1794	20	13	5	2	0