
Análise da evolução da dinâmica de uma cultura
de neurônios dissociados em matriz de
microeletrodos usando Coerência Parcial
Direcionada e Redes Complexas

Mayra Mercedes Zegarra Rodriguez

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA
COMPUTAÇÃO

Análise da evolução da dinâmica de uma cultura de neurônios dissociados em matriz de microeletrodos usando Coerência Parcial Direcionada e Redes Complexas

Mayra Mercedes Zegarra Rodriguez

Orientador: *Prof. Dr. Jose Hiroki Saito*

Dissertação de mestrado 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 Mestre em Ciência da Computação, área de pesquisa: Processamento de Imagens e Sinais.

Fevereiro/2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

Z44ae

Zegarra Rodriguez, Mayra Mercedes.

Análise da evolução da dinâmica de uma cultura de neurônios dissociados em matriz de microeletrodos usando Coerência Parcial Direcionada e Redes Complexas / Mayra Mercedes Zegarra Rodriguez. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

82 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Processamento de imagens. 2. Processamento de sinais. 3. Análise de séries temporais. 4. Coerência parcial direcionada. 5. Redes complexas. I. Título.

CDD: 006.42 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação

**“Análise da Evolução da Dinâmica de uma
Cultura de Neurônios Dissociados em Matriz de
Microeletrodos usando Coerência Parcial
Direcionada e Redes Complexas”**

Mayra Zegarra Rodriguez

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciência da Computação.

Membros da Banca:



Prof. Dr. José Hiroki Saito
(Orientador - DC/UFSCar)



Prof. Dr. Emerson Carlos Pedrino
(DC/UFSCar)



Prof. Dr. João Batista Destro Filho
(FEE/UFU)

São Carlos
Agosto/2012

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, ele foi meu refugio e ânimo nos momentos de dificuldade, onde não conseguia enxergar a luz em meio da escuridão. Também quero agradecer aos meus pais e irmãos que me apoiaram muito, com orações, cuidados, me encorajando a continuar e não desistir. Amo muito vocês.

Outro agradecimento vai aos meus amigos que ficaram no Peru, especialmente para minhas duas grandes amigas Rocio B, Rocio Z, as melhores amigas que Deus poderia ter me dado, obrigada por sempre se lembrar de mim em suas orações e pelo apoio que também recebi de vocês.

Também quero agradecer ao meu orientador Prof. Saito por ter me dado a oportunidade de fazer o mestrado com ele, por ter acreditado em mim. Aprender da experiência dele foi muito gratificante. Outros professores que também colaboraram para que esta dissertação possa ser feita é o Prof. Francisco Rodrigues e o Prof. Marinho do ICMC, obrigada pelo seu tempo para responder as minhas dúvidas e compartilhar seus conhecimentos comigo.

A Katiane uma amiga estudante de estatística da UFSCar que utilizo várias horas do seu tempo, paciência para me ensinar conceitos de estatística, aprendi muito trabalhando juntas.

Aos meus amigos de laboratório Cristian, Michelle, Marcia, Pedro. Obrigada, especialmente a Gustavo P. pelas conversas que em mim produziram um aprendizado que com certeza quero que continuem me acompanhando ao longo da vida.

Finalmente quero colocar um versículo que me acompanhou durante toda a pesquisa e escrita desta dissertação.

Disse, pois, Davi a seu filho Salomão: Esforça-te e tem bom ânimo, e faz a obra; não temas; nem te desalentes, pois o Senhor Deus, meu Deus, é contigo; não te deixará, nem te desampará, até que seja acabada toda a obra para o serviço da casa do Senhor. 1 Crônicas 28: 20

Resumo

Há mais de 30 anos a Matriz de microeletrodos (Multi-Electrode Array, MEA) foi desenvolvida. Este dispositivo planar de múltiplos microeletrodos tem permitido detectar as variações do potencial elétrico local que são criadas pelo movimento de íons através dos canais de proteínas que atravessam as membranas das células neuronais em sua vizinhança imediata.

A MEA oferece a possibilidade de gravação não-invasiva da atividade das células e de redes de células, permitindo-nos conhecer como os neurônios se comunicam através de sinapses formando uma rede e disparando atividades eletrofisiológicas espontâneas evocadas. No sentido de poder entender melhor a dinâmica das redes neurais em termos de atividades espontâneas e sua evolução em culturas de células hipocâmpais dissociadas, que são as propriedades mais importantes na plasticidade sináptica, neste trabalho é proposta a análise da evolução e o modelamento de culturas de células hipocâmpais na MEA usando a teoria de Coerência Parcial Direcionada (PDC) e de Redes Complexas. Foram usados os registros eletrofisiológicos obtidos usando o sistema MEA60, de neurônios dissociados de embrião de rato Wistar, de 18 dias de vida em um experimento denotado como 371, realizado na Universidade de Gênova, Itália.

Como resultados obtidos ao utilizar o método de Coerência Parcial Direcionada, verificou-se que o método é capaz de detectar conectividade neuronal nas culturas de neurônios da MEA, mesmo com sinais com presença de ruído. Também verificou-se que tempos de atraso diferentes na aplicação do PDC não tem uma influência direta nos resultados de causalidade. O PDC permitiu mostrar que na MEA a quantidade de conexões diretas estabelecidas foram sempre em menor quantidade do que as conexões indiretas, através de caminhos. Isso pode ser um indicativo de que os neurônios preferem estabelecer comunicações usando caminhos já existentes do que criando novas conexões. Também observou-se que com o passar do tempo é mais fácil se perderem conexões diretas do que conexões intermediárias entre neurônios. Através dos experimentos realizados pode se observar que a cultura no 25 DIV (dias in vitro) desenvolveu maior quantidade de conexões com nós vizinhos, possuindo menos conexões em total, do que a rede no 46 DIV que teve maior quantidade de conexões total mas menor quantidade de conexões com nós vizinhos.

Como uma das características do PDC é a detecção da direcionalidade nas conexões, observou-se mudanças no sentido das conexões ao longo do registro, embora não saibamos ainda o significado fisiológico dessas mudanças em processos cognoscitivos. Também observou-se que as conexões estabelecidas não seguiam um padrão aleatório, encontrando-se um indicativo de

um comportamento de redes livres de escala, embora não possamos afirmar isso por ter utilizado poucas medidas estatísticas para caracterizar as redes.

Key Words: trem de pulsos, burst, coerência parcial direcionada, matriz de microeletrodos, atividade espontânea, redes complexas.

Abstract

Multi-Electrode Array, MEA, was developed more than thirty years ago. This planar device of multiple microelectrodes has been used to detect local electric potential variations created by the ion movement through the protein channels that traverses the cell membranes in the near neighborhood.

MEA offers the possibility of non invasive registering of the cell and their network's activities, allowing to know how the neurons start to connect through the synapses forming a network and generating spontaneous electrophysiological activities. In order to understand the neural network dynamics in face of the spontaneous activities and its evolution in dissociated hippocampal cell cultures, important properties in the synaptic plasticity, in this work it is proposed the analysis of the evolution and modeling of the hippocampal cell cultures in MEA using the theory of Partial Directed Coherence and Complex Networks. There were used the electrophysiological records obtained using MEA60 System, of the dissociated neurons of 18 days old Wistar rat embyo, in an experiment denoted as 371, realized at the University of Genoa, Italy.

As the results obtained using the Partial Directed Coherence approach, it was verified that the method is capable to detect neuronal connectivity in the neuron cultures using MEA, even with the noisy signals. It was also verified that different time delays between signals during application of the PDC method do not affect directly on the results of the causality. PDC allowed to show that in MEA the amount of direct connections resulted is less than the amount of indirect connections, through the microelectrodes. This can indicate that the neurons prefer to communicate through existing connections than creating new connections. It was also observed that it is easier to lose direct connections than indirect connections between microelectrodes through the time. Through the experiments it can be observed that the culture in 25 DIV (Days In Vitro) developed more amount of connections between neighboring electrodes, with less overall connections than the culture in 46 DIV, that had more overall connections with less neighborhood connections.

Since one of the PDC features is the directionality detection between connections, it was observed direction changes through the connections through the time, even though we do not know the physiological meaning of these changes in the cognitive process. It was also observed that the established connections do not follow random patterns, showing an indicative of a free scale network, although we used small statistical measures to characterize the networks.

Key Words: spikes train, burst, partial coherence directed, micro-eletrode array, spontaneous activity, complex networks

Sumário

Resumo	iii
Abstract	v
Sumário	vi
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	1
Simbolos	3
1 Introdução	5
1.1 Motivação	6
1.2 Objetivo Principal	6
1.3 Objetivos específicos	7
1.4 Organização do Trabalho	7
2 Revisão Bibliográfica da MEA	9
2.1 História e Desenvolvimento da MEA	9
2.2 Sinapses entre neurônios	10
2.3 Gravações e estimulações	12
2.3.1 Spikes	14
2.3.2 Bursts	15
2.4 Tipos de MEAs	15
2.4.1 MEA Padrão	15
2.4.2 MEA Fina	15
2.4.3 MEAs de Alta Densidade	15
2.5 Pesquisas realizadas na MEA	15
3 Revisão Bibliográfica de Redes Complexas	17
3.1 Introdução Histórica	17
3.2 Definição de Redes complexas	18
3.3 Tipos de Redes	18
3.3.1 Redes Sociais	19
3.3.2 Redes de Informação	19
3.3.3 Redes Tecnológicas	20
3.3.4 Redes Biológicas	20
3.4 Propriedade das redes	21
3.4.1 Redes aleatórias	21

3.4.2	Redes livres de escala	22
3.4.3	Redes Mundo Pequeno	23
3.5	Propriedades Topológicas	23
3.5.1	Caminho mínimo médio	24
3.5.2	Grau de conectividade	24
3.5.3	Betweenness	25
3.5.4	Coefficiente de aglomeração ou agrupamento	25
3.5.5	Dominância do ponto central	26
3.5.6	Grau hierárquico de nível 2 e razão de divergência	26
3.5.7	Entropia	26
3.5.8	Densidade da Rede	27
3.6	Trabalhos relacionados a redes complexas e cultivos de neurônios <i>in vitro</i>	27
4	Séries Temporais	31
4.1	Análise de Séries Temporais	31
4.2	Duas abordagens das séries temporais	33
4.2.1	Análise no domínio do tempo	33
4.2.2	Análise Espectral	33
4.2.3	Função de autocorrelação (FAC)	34
4.2.4	Função de autocorrelação parcial	35
4.2.5	Modelo autorregressivo multivariado (Multi-Valued Auto Regressive, MVAR)	35
4.3	Etapas na estimação	36
4.3.1	Estimação do modelo autorregressivo multivariado	37
4.3.2	Ordem do modelo	38
4.3.3	Diagnóstico do modelo estimado	38
5	Coerência Parcial Direcionada e Trabalhos correlatos	41
5.1	Analisando a conectividade usando modelos de causalidade nas séries de tempo	41
5.2	Coerência Parcial Direcionada (PDC)	42
5.3	Interpretação geométrica da aplicação da coerência parcial direcionada	44
5.4	Analisando as propriedades da rede usando teoria de redes complexas	45
5.5	Trabalhos relacionados	45
6	Experimentos	49
6.1	Metodologia proposta	49
6.1.1	Obtenção do sinal MEA	49
6.1.2	Pré-processamento do sinal	50
6.1.3	Estimar a ordem do modelo	52
6.1.4	Verificação dos resíduos	53
6.1.5	Estimar o PDC	53
6.1.6	Analisar a matriz de conectividade através de medidas estatísticas	54
6.2	Experimentos	57
6.2.1	Experimento 1	57
6.2.2	Experimento2	62
6.3	Verificação e Análise dos resultados	68
6.3.1	Verificação	68

6.3.2	Análise dos resultados	68
7	Conclusões	71
7.1	Conclusões	71
7.1.1	Conclusões específicas	72
7.1.2	Recomendações	73
7.1.3	Dificuldades encontradas	73
7.1.4	Trabalhos futuros	73
	Referências Bibliográficas	78
	Apendice	80

Lista de Figuras

2.1	Mostra-se uma MEA de 60 canais, sendo a distância entre cada eletrodo de $200 \mu m$ e o diâmetro do eletrodo de $30 \mu m$. Imagem obtida de [SOUSSOU et al., 2006]	11
2.2	Estimulação e registro da atividade elétrica em fatias de tecido com uma MEA. O tecido cerebral está aderido à superfície, a qual contém eletrodos planares a um substrato integrado, que pode ser usado tanto para a estimulação quanto para aquisição ou registro [STETT et al., 2003]	12
2.3	Gravações de uma fatia do hipotálamo. Cada pequeno quadrado é um eletrodo, seis diferentes eletrodos produzem unidades individuais de <i>spikes</i> , como é mostrado nos gráficos etiquetados pela letra A-F. Cada um destes seis eletrodos tem uma correspondente frequência de <i>spikes</i> indicando a mudança no comportamento de <i>spikes</i> observados durante a aplicação de Ghrelin. Fonte: [JAMES et al., 2006].	14
3.1	Representação gráfica de uma rede complexa: Em (a) temos uma rede não dirigida, onde os elementos a_{ij} da matriz são iguais a 1 se há uma conexão entre os vértices, i e j igual a zero, caso contrário. No caso (b) é uma rede dirigida, os elementos a_{ij} da matriz são iguais a 1 se há uma conexão dirigida entre o vértice, i e o vértice j	18
3.2	Exemplos de redes complexas: (a) Rede de contatos sexuais entre indivíduos; (b) Rede de contágios entre pessoas; (c) Rede dos amigos numa escola dos Estados Unidos; (d) Documentos num sítio da Web e ligações entre eles. As cores representam diferentes comunidades.	21
3.3	Exemplo de uma rede aleatória contendo 64 nós com probabilidade de conexão de $p = 0.05$	22
3.4	Exemplo de uma rede livre de escala contendo 64 nós com $m = 3$, onde m é um valor constante e indica o número de vértices que serão acrescentados no passo do tempo	23
3.5	Exemplo de uma rede mundo pequeno contendo 64 nós com uma probabilidade de conexão de $p = 0.05$	24
6.1	O gráfico mostra as posições de cada eletrodo no sistema MEA60	50
6.2	Gráfico onde se mostra as etapas da análise dos dados para a detecção de causalidade	54

6.3	O gráfico representa o processo de estimação do PDC. 1) Cada eletrodo tem uma posição específica na MEA; 2) Agrupa-se os eletrodos por par bivariado até se analisar todas as combinações possíveis; 3) Obtém-se uma matriz de conectividade de 2×2 onde a diagonal representa o espectro do sinal e a antidiagonal representa a causalidade no par bivariado. O valor 1 representa conectividade nesses eletrodos e o valor 0 representa não conectividade e 4) Através de um grafo se representa a matriz de conectividade.	55
6.4	Diagrama de fluxo indicando as etapas a serem consideradas na identificação de conectividade.	56
6.5	Função de autocorrelação correspondente ao eletrodo 12 no 46 DIV.	57
6.6	Função de autocorrelação correspondente ao eletrodo 13 no 46 DIV.	58
6.7	Gráfico dos resíduos correspondente ao eletrodo 12 no 46 DIV, após a estimação do modelo.	58
6.8	Gráfico dos resíduos correspondente ao eletrodo 13 no 46 DIV, após a estimação do modelo.	59
6.9	Conexões diretas totais detectadas no 25 DIV.	60
6.10	Conexões diretas totais detectadas no 46 DIV	61
6.11	Na figura A se mostra as conexões diretas em comum entre 25 e 46 DIV. Na figura B mostra-se as conexões indiretas em comum entre 25 e 46 DIV.	61
7.1	Rede Aleatória contendo 64 nós com probabilidade de conexão de $p=0.1$, $p=0.05$, $p=0.01$	81
7.2	Rede do mundo pequeno contendo 64 nós e uma probabilidade de conexão de $p=0.1$, $p=0.05$, $p=0.01$	81
7.3	Rede livre de escala contendo 64 nós e uma probabilidade de conexão preferencial de $\alpha = 1$ e $\alpha = 2$	82
7.4	Rede gerada no Experimento 1 correspondente no 25 e 46 DIV.	82

Lista de Tabelas

6.1	Tabela contendo as médias dos resultados estatísticos das medidas de redes complexas.	59
6.2	Tabela contendo medidas estatísticas de redes complexas correspondente à cultura 371 no 25 DIV.	63
6.3	Tabela contendo medidas estatísticas de redes complexas correspondente à cultura 371 no 46 DIV.	64
6.4	A tabela mostra as relações do eletrodo 12 na cultura 371 no 46 DIV.	65
6.5	Tabela contendo medidas estatísticas de redes complexas correspondente à cultura 371 no 46 DIV após 2 segundos de registro.	66
6.6	Tabela contendo medidas estatísticas de redes complexas correspondente à cultura 371 no 46 DIV após 120 segundos de registro.	67
6.7	Tabela contendo os resultados dos testes de Jarque Bera e Portmanteau, para o par bivariado 12 e 13.	70
7.1	Tabela A.1: O cálculo das medidas foi realizado considerando que todas são redes contem 64 nós e uma probabilidade de conexão de $p=0.05$	80
7.2	Tabela A.2: Medidas estatísticas de redes complexas com probabilidade de conexão $p=0.05$, $p=0.1$, $p=0.01$	80
7.3	Tabela A.3: Medidas estatísticas de redes complexas com probabilidade de conexão $p=0.05$, $p=0.1$, $p=0.01$	80

Lista de Símbolos

- l - Caminho mínimo médio
- d_{ij} - Distância do vértice i até o j
- C - Coeficiente de agrupamento
- B - Grau de intermediação
- C_D - Dominância do ponto central
- K_{in} - Grau de conectividade de entrada
- K_{out} - Grau de conectividade de saída
- K_{total} - Grau de conectividade total
- σ^2 - Variância
- μ - Média
- IC - Intervalo de confiança
- A_r - Matriz de $n \times p$ que contém os coeficientes autorregressivos
- P - Ordem do modelo
- W - Vetor de resíduos
- $E(f)$ - Vetor de ruído espectral
- $A(f)$ - Matriz de coeficientes espectrais
- $S(f)$ - espectro cruzado
- $H(f)$ - Função de transferência
- I - Matriz Identidad e
- $S(f)$ - Matriz de densidade espectral
- Σ_w - Matriz de covariância da matriz de resíduos

Introdução

Os neurônios são células notáveis por sua capacidade de propagar rapidamente sinais sobre longas distâncias representando e transmitindo informações por sequência de disparo ou *spikes* em padrões temporais [DAYAN. and L.F.Abbott, 2001]. O desenvolvimento da primeira MEA foi em 1972 pela equipe de Thomas [THOMAS et al., 1972]. Os primeiros trabalhos sobre gravações de culturas de neurônios dissociados (gânglio cervical superior de ratos recém-nascidos) foram relatados por Pine em 1980 [PINE, 1980]. Neurônios dissociados são aqueles separados da fatia de tecido original extraída de algum animal.

O que faz o papel de Pine ser tão importante foi que ele relatou simultaneamente a medida intracelular e extracelular da atividade neural, provando a utilidade das MEAs para monitoração de respostas neurais. Desde então, diversos grupos criaram as suas próprias matrizes planares de microeletrodos utilizando-os em conjunto com vários tipos de culturas de células neurais. Um trabalho desse tipo é o desenvolvido por Israel [ISRAEL et al., 1984].

Na MEA as camadas de redes neuronais cultivadas agem como se fossem em ambientes *in vivo* enviando e recebendo sinais entre si, através de suas conexões sinápticas. Assim as redes neuronais cultivadas *in vitro*, sobre a MEA, são capazes de desenvolver padrões complexos de atividade espontânea, gerando potenciais de ação sem nenhuma evocação externa através dos eletrodos atuadores, bem como apresentam respostas evocadas nos eletrodos sensores, processando informações, que se assemelham aos registros em cérebros de animais.

Os neurônios cultivados *in vitro* formam espontaneamente sinapses e uma observação muito geral sobre redes neuronais cultivadas sobre matrizes de microeletrodos é que independente da sua origem, todos eles mostram algum tipo de atividade sináptica quando desenvolvidos ou maduros. [STETT et al., 2003].

Porém, as culturas de neurônios dissociados, isolados do ambiente biológico, além do seu tempo de vida limitado, incluem uma necessidade de esterilização, reabastecimento de mídia, manutenção de pH, temperatura, e osmolaridade.

Portanto ao modelar este tipo de rede computacionalmente poderemos analisar o comportamento global de como os neurônios agem por meio das constantes iterações entre eles sem a necessidade de desenvolvimento real da cultura. Também permitirá entender a dinâmica e evolução ao longo do tempo de uma rede neuronal *in vitro*.

1.1 Motivação

Conjuntos de células nervosas que crescem como culturas em uma matriz de microeletrodos tem sido muito úteis pois permitem a longo prazo e em vários locais da matriz o monitoramento e registro da atividades espontâneas e evocadas [THOMAS et al., 1972]. Este tipo de estudo sobre a MEA fornece uma forma eficaz para a observação da dinâmica interna da rede neural de forma não invasiva, especialmente padrões de geração e evolução da organização das redes. O estudo da MEA como ferramenta para o registro de sinais torna-se importante pois parece que a compreensão dos princípios de organização e a dinâmica resultante de pequenos conjuntos de células neurais pode levar a uma família de modelos matemáticos que podem representar as funções do sistema nervoso central melhor do que os modelos de redes neurais artificiais. O estudo da dinâmica das redes neuronais tornou-se uma via principal de pesquisa. Segundo Bettencourt [LUIS et al., 2007] o estudo da atividade coletiva de uma rede em termos de séries de tempo é importante pois a partir deste tipo de dados redes de informação podem ser inferidas revelando como os sinais de atividade elétrica são compartilhados entre os neurônios, armazenados e processados coletivamente.

Outra motivação para o desenvolvimento desta proposta é que a partir da atividade neural de células de tecido hipocampal possamos entender e conhecer o tipo de ligações existentes entre elas. Este desafio tem sub-desafios que também devem ser resolvidos, os quais são:

- Modelagem da conectividade de neurônios na rede usando para isso a teoria de redes complexas;
- Adequada caracterização das redes obtidas através do uso de medidas estatísticas indicadas na literatura como Coerência Parcial Direcionada.

1.2 Objetivo Principal

Este projeto de mestrado tem como objetivo principal a modelagem da conectividade efetiva de séries de tempo de atividades elétricas espontâneas obtidas através da MEA, sobre cultura de

neurônios dissociados de embrião *in vitro*, assim como a análise da evolução das redes quanto à dinâmica.

1.3 Objetivos específicos

O trabalho tem ainda como principais objetivos específicos:

- Explorar as propriedades neurais por meio de uma adequada caracterização das medidas da rede modelada, usando a teoria de redes complexas; e
- Estudar a eficácia do método da Coerência Parcial Direcionada, para o estudo de conectividade em MEA.

1.4 Organização do Trabalho

Este trabalho de dissertação está dividido em sete partes, inclusive este capítulo 1 de introdução. No Capítulo 2 é apresentada uma descrição de conceitos relacionados à MEA e uma revisão bibliográfica das características da MEA e os avanços tecnológicos ao longo do tempo. No Capítulo 3 é apresentada uma breve descrição de conceitos e propriedades relacionados a redes complexas. No Capítulo 4 é apresentada uma descrição de conceitos de séries temporais. No Capítulo 5 são introduzidos conceitos correspondentes a Coerência Parcial Direcionada. No Capítulo 6 são descritos os experimentos realizados, iniciando-se pela metodologia de trabalho. O capítulo trabalho 7 trata das conclusões e trabalhos futuros.

Revisão Bibliográfica da MEA

Este capítulo está dividido nas seguintes seções. Na seção 2.1 são apresentados em forma sucinta conceitos relacionados à história e desenvolvimento ao longo do tempo da MEA. Na seção 2.2 são relatados os princípios do sistema nervoso, uma vez que sua introdução ajuda a entender o funcionamento e dinâmica das redes de neurônios. Seguidamente, na seção 2.3 é explicado o processo de gravação e estimulação elétrica. Na seção 2.4 são apresentados os tipos de MEA e finalmente na seção 2.5 relatam-se aplicações desenvolvidas usando a MEA em diferentes áreas científicas de pesquisa.

2.1 História e Desenvolvimento da MEA

A MEA é um dispositivo planar de múltiplos microeletrodos ou multieletrodos, construída com nanotecnologia semelhante à fabricação de circuitos integrados, usada para cultivos celulares *in vitro*, podendo estudar de forma não invasiva os corpos celulares cultivados, permitindo-nos conhecer como os neurônios se conectam através de sinapses formando uma rede e disparando potenciais de ação espontânea e evocada [PINE, 2006]. Existem três métodos para cultura de células: o uso de células dissociadas, culturas organotípicas e de reagregação [POTTER and DEMARSE, 2001]. A técnica mais adequada para a avaliação do crescimento axonal e formação de sinapses entre neurônios é a dissociação. Nesta técnica as culturas podem ser primárias, sendo utilizadas nos experimentos diretamente logo após a extração.

O primeiro artigo publicado sobre um arranjo planar de microeletrodos ocorreu em 1972 [THOMAS et al., 1972]. Através de eletrodos que estavam cobertos com platina (platinum black) para reduzir a impedância das conexões com o meio de cultura, foram feitos registros de culturas

celulares.

Em 1977 com uma introdução muito parecida, Guenter Gross e seus colaboradores propuseram a ideia de arranjos de multieletrodos, sem conhecimento prévio do trabalho de Thomas. Os 36 eletrodos eram de ouro, isolados com um polímero (thermosetting), e era de aproximadamente $10\ \mu\text{m}$ de diâmetro. Os experimentos em 1977 com neurônios mostrou registros de um gânglio de caramujo isolado sobre os eletrodos, com potenciais de ação tendo amplitudes de até 3 mv, dependendo do tamanho da célula.

Em 1980 os primeiros registros com sucesso de neurônios dissociados foram reportados por Jerome Pine, em um arranjo de multieletrodos com duas linhas paralelas de 16 eletrodos de ouro, platinizados, e isolados com dióxido de silício. Os neurônios ganglionares cervicais superiores de ratos se desenvolveram por uma a três semanas em cultura, formando uma rica interconexão. As células eram de aproximadamente $20\ \mu\text{m}$ de diâmetro, e os registros foram feitos de 19 células em 9 culturas, não em contato com os eletrodos mas tipicamente a $25\ \mu\text{m}$ de distância. Os sinais observados também são semelhantes aos observados *in vivo*, mas um pouco menor, porque a resistividade do cérebro é menor comparado com o ambiente de cultura em MEA [PINE, 2006].

Em 1981, surgiu um trabalho pioneiro com um MEA de 9 eletrodos em que os eletrodos eram *gates* de transistores FET num *chip* de silício. FET(Field Effect Transistor)- Transistor de Efeito de Campo, tem como característica básica o controle de uma corrente por um campo elétrico aplicado. Eles demonstraram o registro de fatias do hipocampo com boa razão sinal-ruído, enquanto estimulavam a fatia com um eletrodo convencional [JAMES et al., 2006].

Em 1995 grupos do Japão nos laboratórios NTT e Matsushita, liderados por Taketani e Kawana, fabricaram MEAs de 64 eletrodos para uso em experimentos de fatias e com culturas de neurônios corticais dissociados. Para fatias, um dispositivo foi desenvolvido para manter a cultura viva por muitas semanas, tal que o seu desenvolvimento pudesse ser observado ao longo do tempo [SOUSSOU et al., 2006].

Na figura 2.1 observa-se um exemplo de MEA, onde à esquerda é mostrada uma visão do seu empacotamento em um substrato de vidro e um reservatório circular dentro do qual se cultivava as células, e à direita é mostrada uma fotografia ampliada da matriz de microeletrodos, onde os pontos terminais são os eletrodos e as linhas ou raias são condutores de sinais que se interligam aos circuitos amplificadores.

2.2 Sinapses entre neurônios

Para compreender as conexões fisiológicas e o processamento é necessário entender a atividade elétrica de um neurônio numa rede de neurônios. Cada neurônio se comunica com o seguinte por meio de sinapses nervosas, também chamadas sinais neuronais, que consistem em

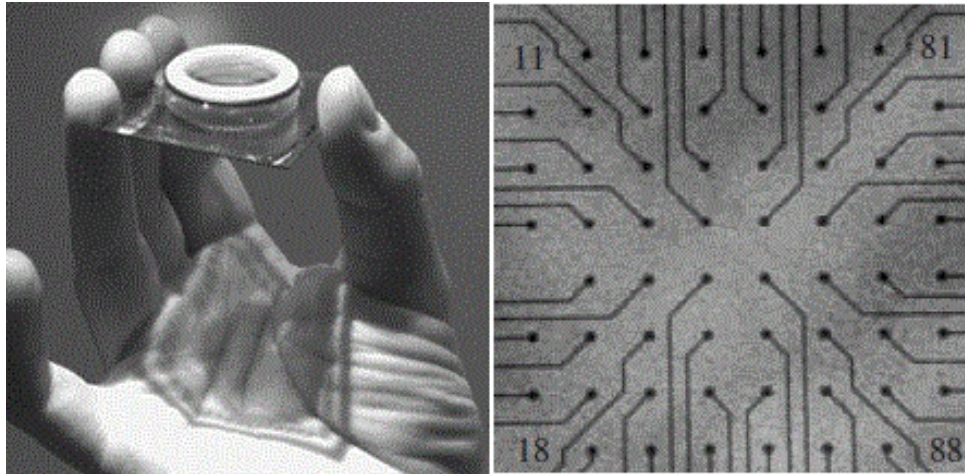


Figura 2.1: Mostra-se uma MEA de 60 canais, sendo a distância entre cada eletrodo de $200 \mu m$ e o diâmetro do eletrodo de $30 \mu m$. Imagem obtida de [SOUSSOU et al., 2006]

pequenos pulsos elétricos. Os pulsos são chamados também de potenciais de ação ou spikes, têm uma amplitude de aproximadamente 100 mV e uma duração entre 1-2 ms. São as sinapses que possibilitam a transmissão do impulso nervoso de um neurônio a outro. A forma do pulso não muda na maneira como o potencial de ação é propagado ao longo do axônio, tal impulso é a transmissão de um sinal codificado como resultado de um estímulo ocorrido ao longo da membrana do neurônio. Segundo Guyton e Hall [GUYTON et al., 2006] o número de conexões de um único neurônio pode variar de algumas unidades até algumas centenas de milhares. Os dendritos se ramificam e servem como a principal estrutura para a recepção de sinais de outras células neuronais. Do corpo celular pode sair vários dendritos, porém dele se origina um único axônio, que é a principal unidade condutora do neurônio. Ao longo do axônio são propagados sinais elétricos chamados de potenciais de ação, que são impulsos elétricos rápidos e transientes com duração de cerca de 1ms. A célula nervosa cuja terminação do axônio se conecta ao soma ou ao dendrito do outro neurônio é denominado neurônio pré-sináptico, sendo responsável pelo envio do impulso. O neurônio seguinte que recebe o impulso é denominado de neurônio pós-sináptico. Estas células são separadas na sinapse por um espaço chamado de fenda sináptica [KANDEL et al.].

O efeito de um *spike* num neurônio pós-sináptico pode ser registrado com um eletrodo intracelular que mede a diferença do potencial entre o interior e o exterior. Esta diferença é chamada de potencial de membrana. Após a chegada de um *spike* o potencial muda e finalmente decai de volta ao potencial de repouso. Se a mudança é positiva a sinapse é chamada de excitatória, se a mudança for negativa a sinapse é chamada de inibitória [WULFRAM and WERNER, 2002]. A geração do potencial de ação também depende do histórico da célula de disparo, ou seja, considerando-se que o potencial de ação dura aproximadamente 1ms, um novo potencial de ação não poderá ocorrer num intervalo menor que esse tempo de duração de

1ms [DAYAN. and L.F.Abbott, 2001]. Na MEA a estimulação entregue por meio de um único eletrodo afeta um número de células que não são necessariamente próximas a ele. Muitos fatores influenciam na transdução de sinal, como: a polarizabilidade e a impedância do eletrodo, a qualidade do contato entre células e eletrodos, e assim por diante. Diversas discussões e modelos celulares/interface microeletrodos, podem ser encontradas na literatura [DARBON et al., 2002].

2.3 Gravações e estimulações

A distribuição espacial da voltagem em uma camada de uma fatia de tecido condutor acima da superfície dos eletrodos da MEA é registrada com relação ao eletrodo de referência localizado na solução, figura 2.2

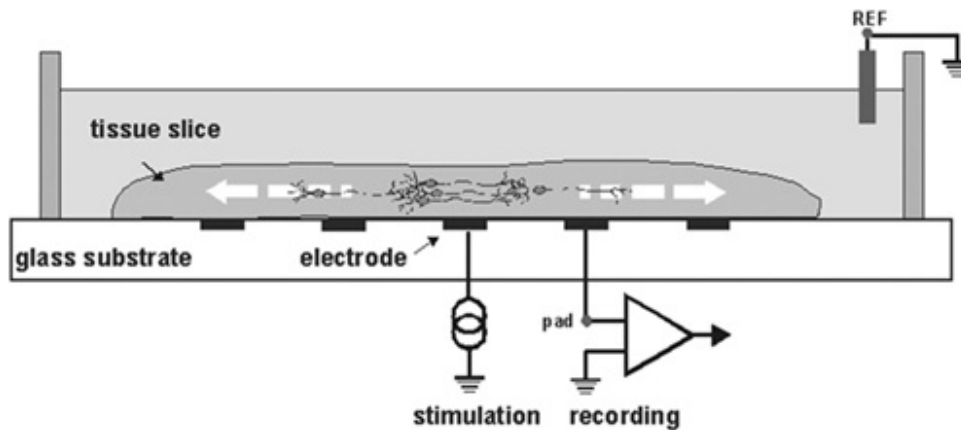


Figura 2.2: Estimulação e registro da atividade elétrica em fatias de tecido com uma MEA. O tecido cerebral está aderido à superfície, a qual contém eletrodos planares a um substrato integrado, que pode ser usado tanto para a estimulação quanto para aquisição ou registro [STETT et al., 2003]

O substrato que é construída a MEA, é normalmente transparente, adequado para se fazer visualizações em microscópios invertidos, de fluorescência, confocal ou de varredura dupla [POTTER and DEMARSE, 2001]. A principal característica de uma MEA é o intercâmbio bidirecional de informação que ela proporciona, no qual atua como uma interface bioeletrônica, do mundo biológico com o eletrônico, onde células neurais são cultivadas sobre um microcircuito elétrico [RUTTEN, 2002]. Essa situação oferece um ambiente controlado no qual as células vão se aderir a partir de moléculas de adesão conhecidas, possibilitando seu monitoramento constante por um período de dias a semanas [CLAVEROL-T et al., 2005].

Os eletrodos na MEA são também usados para estimulação elétrica extracelular aplicando impulsos de correntes ou voltagem nos eletrodos. Em princípio, o circuito equivalente é o mesmo para o registro quando o amplificador é substituído por uma fonte de estimulação. A eficácia da estimulação depende do espalhamento efetivo da corrente injetada dentro da interface

eletrodo-tecido e dentro do tecido. A voltagem nos eletrodos deve ser tão baixa quanto possível de forma a não levar a uma reação eletroquímica irreversível na interface eletrodo/eletrólito. As gravações podem apresentar potenciais de campo lento, assim como também picos de potenciais de ação, podendo detectar *spikes* de atividade em distâncias de até 100 μm de um neurônio em uma fatia grossa. É muito importante ressaltar que os microeletrodos possuem um tamanho reduzido (diâmetro máximo de 30 μm) e cada microeletrodo pode fazer contato com um único neurônio ou no máximo algumas células. Sabe-se que, para se obter um bom sinal, pelo menos parte substancial do corpo celular do neurônio precisa estar em contato com a superfície do eletrodo, uma vez que os axônios individualmente não conseguem cobrir significativamente a área de um eletrodo [vAN PELT et al., 2004]. A atividade originada pelo tecido pode ser gravada com alta resolução espacial e temporal, sendo que o principal pré-requisito para o registro eficiente de um sinal é o contato estreito do tecido com o substrato [STETT et al., 2003].

Em consequência, um único eletrodo pode gravar sinais provenientes de vários neurônios e os sinais devem ser idealmente identificados e classificados. Isso levou ao desenvolvimento da classe de algoritmos de intervalos *inter-spikes*. No entanto, deve-se notar que, sobre condições não-padrão de cultura, um significativo percentual de microeletrodos pode permanecer inativo [ZIEGLER, 2000].

Dependendo da cultura de células usada, uma consistente atividade de *bursts* pode ser vista após os 18 até os 25 dias *in vitro* [KOWALSKI et al., 1992]. Durante os episódios de *bursts* sincronizados, a maioria dos neurônios experimenta uma rápida e passageira transição (algumas centenas de milissegundos), aumento da sua taxa de disparo, seguido por um período de quietude durante o qual apenas alguns neurônios apresentam uma taxa baixa, atividade assíncrona, embora o contato físico entre as células na cultura é necessário para a sincronização [MAEDA, 1995]. Portanto, o objetivo genérico de gravações usando microeletrodos é identificar as interações entre os neurônios e sua modulação, em resposta a algum estímulo.

Devido a quantidade de aplicações de matrizes multieletrodos, vários sistemas dedicados foram desenvolvidos e comercializados. [P., 2001]. Existem diferentes modelos de MEAs, os quais oferecem uma ampla variedade de aplicações. Dentro do campo da neurobiologia, as aplicações mais comuns para os sistemas MEAs consistem em: neuroregeneração, biologia do desenvolvimento, ritmo circadiano [KLISCH et al., 2009], registros de potenciais de ação prolongados, microencefalogramas e microretroretinogramas. Algumas limitações da MEA são as seguintes:

- Pequenas amplitudes de gravações comparadas com a instrumentação tradicional; e
- Os eletrodos não podem ser removidos pois estão inseridos na placa de vidro.

Como exemplo, na figura 2.3 mostra-se uma fatia do hipotálamo de um rato colocada numa MEA de 64 microeletrodos dispostos numa grade de 8x8. Várias gravações foram tomadas ao

mesmo tempo a partir de diferentes locais na fatia. Depois de gravar uma taxa estável de disparos para cada uma das unidades, $0,1 \mu\text{m}$ de Ghrelin (hormônio que estimula o apetite) foi adicionado. Nota-se que no intervalo 24-40s algumas unidades reagiram com um aumento na taxa de disparo e outras diminuíram sua taxa de disparo pela aplicação do hormônio. Após a fatia ser lavada resultando na remoção do hormônio, a taxa de disparo continua novamente estável.

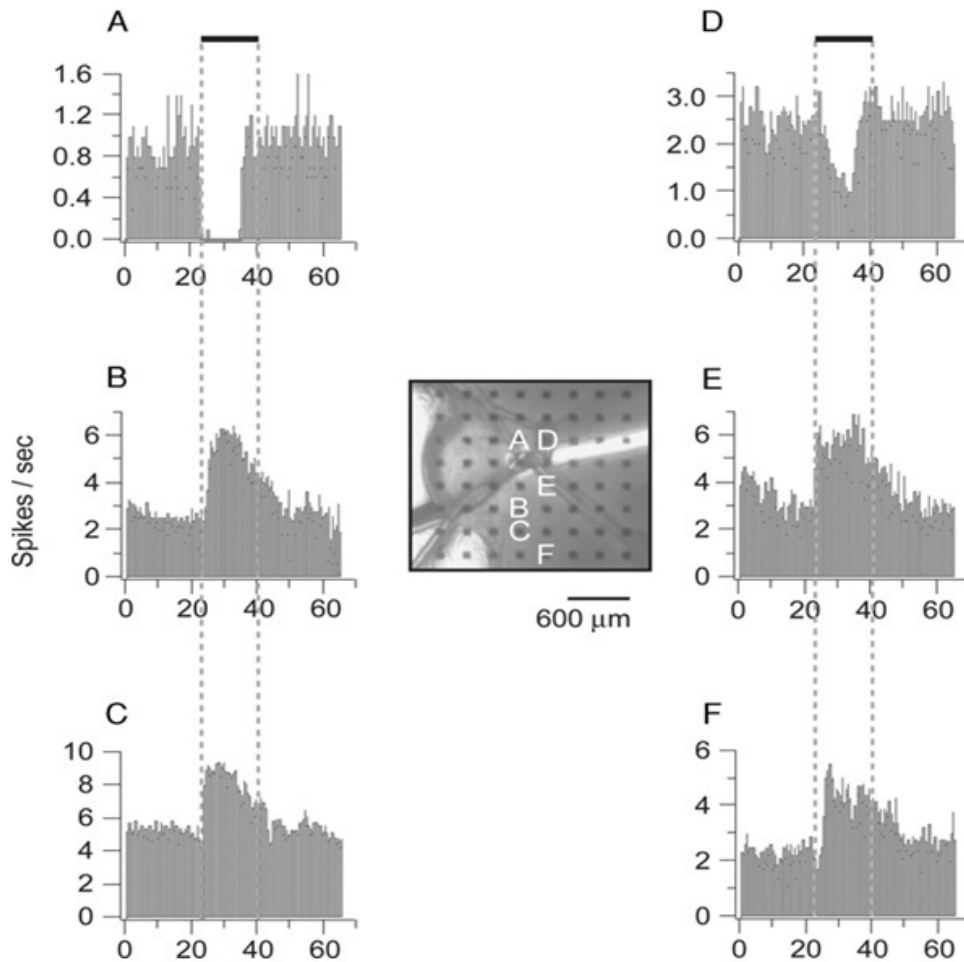


Figura 2.3: Gravações de uma fatia do hipotálamo. Cada pequeno quadrado é um eletrodo, seis diferentes eletrodos produzem unidades individuais de *spikes*, como é mostrado nos gráficos etiquetados pela letra A-F. Cada um destes seis eletrodos tem uma correspondente frequência de *spikes* indicando a mudança no comportamento de *spikes* observados durante a aplicação de Ghrelin. Fonte: [JAMES et al., 2006].

2.3.1 Spikes

Um sinal gravado a partir da MEA possui uma parte constituída por picos e outra parte sem atividade elétrica denominada ruído biológico. Os picos são considerados como atividade elétrica extracelular dos grupos de neurônios e são chamados de spikes. Para que um spike

seja detectado é preciso estabelecer um limiar que é calculado como múltiplo do desvio padrão, sendo o desvio padrão calculado sobre o ruído biológico.

2.3.2 Bursts

Um *burst* é uma sequência de 5 a 10 spikes que possuem duração igual ou superior a soma de todos os ISI (intervalo entre spikes) contidos no mesmo conjunto. Os intervalos entre *bursts* deve ter uma duração mínima de 100 ms.

2.4 Tipos de MEAs

2.4.1 MEA Padrão

A MEA padrão possui 60 eletrodos em um *layout* de 6x10 ou de 8x8 sem os microeletrodos nos vértices, possui microeletrodos planos circulares e trilhas (que são feitas de titânio), o material utilizado para o isolamento é o nitrito de silício. Estas MEAs podem ser usadas por uma larga variedade de aplicações desde culturas de neurônios dissociados a fatias de tecido posicionadas diretamente sobre os eletrodos.

2.4.2 MEA Fina

A diferença da MEA fina com a MEA padrão é que a primeira possui uma espessura de 180 μm , que permite que a cultura seja observada por microscópios invertidos. Geralmente esta MEA é usada para combinar registro de atividade e imageamento. Os microscópios invertidos possuem lentes (objetivas) de alta potência com uma abertura numérica alta com uma distância focal muito pequena da ordem de várias centenas de micrômetros.

2.4.3 MEAs de Alta Densidade

Estas possuem uma quantidade grande de eletrodos (256 eletrodos) com pequeno espaçamento 100 μm . A importância deste tipo de MEA é devida à maior precisão dada quando se mede os atrasos de sinapses ou velocidade de condução.

2.5 Pesquisas realizadas na MEA

Atualmente, existem várias pesquisas que estão sendo realizadas em MEAs: para estudar os processos da plasticidade neuronal subjacente à aprendizagem e à memória; para monitorar a atividade de desenvolvimento das redes; e também aplicações no estudo de substâncias

neurotóxicas; seleção da droga e testes farmacológicos. Um exemplo de aplicação é o biosensor MEA que constitui um sistema ideal *in vitro* para monitorar os efeitos crônicos e agudos de drogas e toxinas. A gravação da resposta elétrica é realizada em vários locais de um tecido, e portanto um mapa de diferentes posições pode ser gravado, provendo conclusões importantes sobre a atuação bioquímica específica da droga em estudo [STETT et al., 2003].

A MEA também está incursionando na indústria farmacêutica. Os experimentos estão ligados ao teste de segurança de medicamentos. O DS-MED é uma ferramenta que foi desenvolvida para selecionador de drogas. Esta ferramenta emprega software, hardware e incubadoras e foi desenvolvido para simplificar experimentos de triagem de drogas.

Revisão Bibliográfica de Redes Complexas

Neste capítulo na seção 3.1, começaremos com uma breve introdução histórica das redes complexas, que nasceu de tentativas em resolver um problema matemático. Seguidamente, na seção 3.2, resumimos as definições encontradas na literatura para definir os grafos que constituem a base das redes complexas. Consequentemente, na seção 3.3, apresentaremos a classificação das redes. Na seção 3.4, são apresentadas as características das redes. Na seção 3.5, serão detalhadas as propriedades topológicas das redes e para finalizar, na seção 3.6, detalharemos os trabalhos encontrados na literatura relacionados com este conceito e que podem ser de grande orientação para o desenvolvimento do presente projeto.

3.1 Introdução Histórica

Leonhard Euler matemático suíço escreveu um trabalho abordando um intrigante problema que havia se originado em Königsberg. A pujante economia de Königsberg permitiu à administração da cidade construir pelo menos sete pontes sobre o rio. Muitas delas ligavam a elegante ilha Kneiphof, encravada entre as duas margens do Pregel a outras regiões da cidade. Duas pontes adicionais cruzavam as duas margens do rio. A população de Königsberg desfrutando uma época de paz e prosperidade entretinha-se com quebra cabeças do tipo: pode-se cruzar as sete pontes sem jamais passar pela mesma ponte duas vezes? Euler propusera uma rigorosa demonstração matemática estabelecendo que com as sete pontes esse caminho não existia, seu trabalho acabou desbravando um imenso ramo da matemática conhecida como teoria de grafos.

Atualmente essa teoria constitui a base de nosso pensamento sobre as redes. Pequenas mudanças na topologia de uma rede, afetando tão somente alguns poucos nós ou *links*, podem abrir portas ocultas, permitindo a emergência de novas possibilidades [ALBERT, 2003].

Hoje, cada vez mais reconhecemos que nada ocorre isoladamente, muitos eventos e fenômenos se acham conectados. Cientistas de todas as diferentes disciplinas descobrem que a conectividade das redes possui uma rigorosa arquitetura, e começam a perceber a importância de seu estudos.

3.2 Definição de Redes complexas

Uma rede é um grafo no qual há um conjunto de vértices (ou nós) e um conjunto de arestas (ou arcos) que conectam esses vértices. As arestas estabelecem algum tipo de relação entre dois vértices de acordo com o problema modelado. Além disso, o grafo pode ser direcionado ou não. Em um grafo direcionado (dígrafo), cada aresta tem um sentido (direção) que conecta um vértice origem a um vértice destino. Nem todo grafo é uma rede complexa. As redes complexas são caracterizadas pela não regularidade ou seja pela desigualdade de número de arestas existentes nos seus vértices. As redes complexas têm propriedades particulares que as diferenciam das redes regulares, estas propriedades ou características serão detalhadas posteriormente. A representação gráfica de uma rede complexa, bem como sua matriz de conexão, podem ser observadas na figura 3.1.

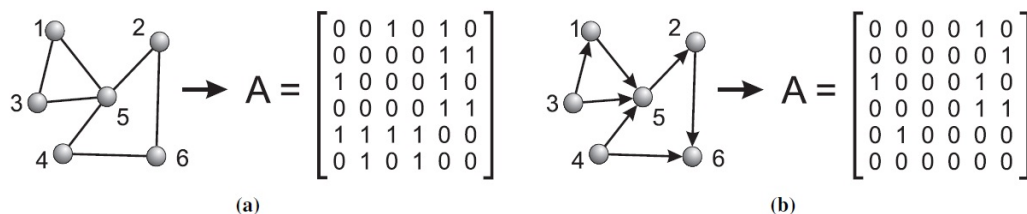


Figura 3.1: Representação gráfica de uma rede complexa: Em (a) temos uma rede não dirigida, onde os elementos a_{ij} da matriz são iguais a 1 se há uma conexão entre os vértices, i e j igual a zero, caso contrário. No caso (b) é uma rede dirigida, os elementos a_{ij} da matriz são iguais a 1 se há uma conexão dirigida entre o vértice, i e o vértice j .

3.3 Tipos de Redes

Nesta seção são descritos alguns tipos de redes sendo as seguintes: redes sociais, redes de informação, redes tecnológicas e redes biológicas.

3.3.1 Redes Sociais

As redes sociais são constituídas por pessoas ou grupos de pessoas, representados por vértices, e pelas interações entre eles, as arestas. A centralidade e a conectividade são propriedades usadas, por exemplo, para determinar os indivíduos que melhor se relacionam com os demais ou para identificar os indivíduos mais influentes. Os seres humanos possuem o desejo inato de constituir rodas e grupos que lhes proporcionem familiaridade, segurança e intimidade. Watts começou sua incursão pelas redes com uma pergunta simples: qual é a probabilidade de dois amigos meus se conhecerem? Watts introduziu o termo *coeficiente de clusterização*, que informa o grau de coesão do círculo de amigos. Um número próximo de 1 significa que todos os amigos são bons amigos uns dos outros. Por outro lado se o coeficiente de clusterização for zero significa que agrega-se como amigos apenas a si mesmo [ALBERT, 2003].

Outro conjunto importante de experimentos são os famosos experimentos de Millgram. Este experimento foi realizado com o envio de centenas de cartas a pessoas residentes em Wichita (Kansas) e Omaha (Nebraska). Estas pessoas foram escolhidas de forma aleatória e na carta era perguntado se elas conheciam a esposa de um aluno de graduação que residia em Sharon (Massachusetts) ou se conheciam um corretor de fundos públicos em Boston. Caso elas conhecessem, as cartas deveriam ser enviadas aos respectivos destinatários. Caso contrário, as pessoas deveriam colocar seus dados e enviar as cartas a outras pessoas que supostamente os conheciam. As missivas deveriam passar pelas mãos de diversos indivíduos até chegarem ao seu destino e, dessa forma, Milgram poderia saber a rota pela qual elas teriam passado. Das 160 cartas enviadas, 42 chegaram ao destino e, com isso, Milgram determinou o caminho médio que separava duas pessoas quaisquer nos Estados Unidos. Tal distância foi determinada como sendo 5,5 e arredondada para seis. A partir desta descoberta, surgiu o famoso termo seis graus de separação [ALBERT, 2003]. Um exemplo clássico deste tipo de rede é uma rede de colaboração de atores, nesta rede os autores colaboram em filmes e dois atores são considerados conectados se eles aparecem num filme juntos.

3.3.2 Redes de Informação

Um exemplo de uma rede de informação é a rede das citações entre artigos científicos. A maioria dos artigos publicados cita outros trabalhos anteriores relacionados ou importantes para esta. Estas citações geram uma rede em que os nós são os artigos científicos e a ligação dirigida do artigo para outro artigo indica que este cita o precedente. A estrutura da rede de citações reflete assim a estrutura da informação armazenada nos seus nodos: daí a designação de redes de informação. A distribuição do número de artigos escritos por um só cientista segue a lei de potência. Esta é observada em muitos fenômenos naturais.

Outro exemplo muito importante de uma rede de informação é a *World Wide Web*, onde os

nós são os documentos disponíveis e os *links* fazem as ligações entre documentos. O *World Wide Web* é composto de servidores Web e o emaranhado de conexões entre suas páginas de hipertexto. Esta rede, diferentemente das redes de citações científicas, apresenta uma característica cíclica. Este ambiente foi amplamente estudado desde o seu início no começo dos anos 90 com destaque para os trabalhos de Albert e Barabási [[ALBERT, 2003](#)]. Nos estudos feitos, a topologia da rede envolve bilhões de documentos nela existentes. Das 325 mil páginas domínio da Universidade de Notre Dame, 270 mil, ou 82% de todas as páginas, possuíam três ou menos *links* de entrada, entretanto uma pequena minoria era referenciada por mais de mil outras páginas e tinha mais de mil entradas.

3.3.3 Redes Tecnológicas

A característica destas redes tecnológicas é que sua estrutura está dirigida pelo espaço e geografia. Um exemplo é a rede de Internet. Pesquisadores reconstruíram esse tipo de rede através dos *traceroute*, que é um programa que permite localizar um determinado nó. A localização do nó é obtida e conectada a um mapa geográfico para mostrar o caminho que um pacote de dados leva através da internet desde um host origem até um host destino

3.3.4 Redes Biológicas

Um exemplo biológico clássico deste tipo de rede é a rede de reações metabólicas. Seus nós são substratos moleculares e as ligações ou arestas são reações metabólicas que conectam os substratos e produzem um determinado produto. O estudo das propriedades físicas das redes metabólicas tem sido executado por diferentes autores como: Fell, Wagner e Steling.

As redes neurais são outros exemplos de redes biológicas. Um dos estudos mais satisfatórios para entender a complexidade do cérebro é a análise do *Caenoshabditis Elegans* (*C. Elegans*) [[NEWMAN, 2003](#)], é a prova viva de quão longe se pode alcançar com apenas 282 neurônios, apesar de seu intervalo de vida de duas a três semanas. Os cientistas conseguiram decifrar a precisa trama do seu sistema nervoso, criando um mapa que detalha quais neurônios estão conectados a outros neurônios. Estudando esse mapa neuronal Watts e Strogatz descobriram que as redes de neurônios não diferem muito das redes sociais em geral, pois elas revelam um alto grau de clusterização, tão elevado que os vizinhos de um neurônio têm cinco vezes mais probabilidade de estarem interligados do que teriam numa rede aleatória.

Na figura [3.2](#) apresentam 4 exemplos de redes complexas:

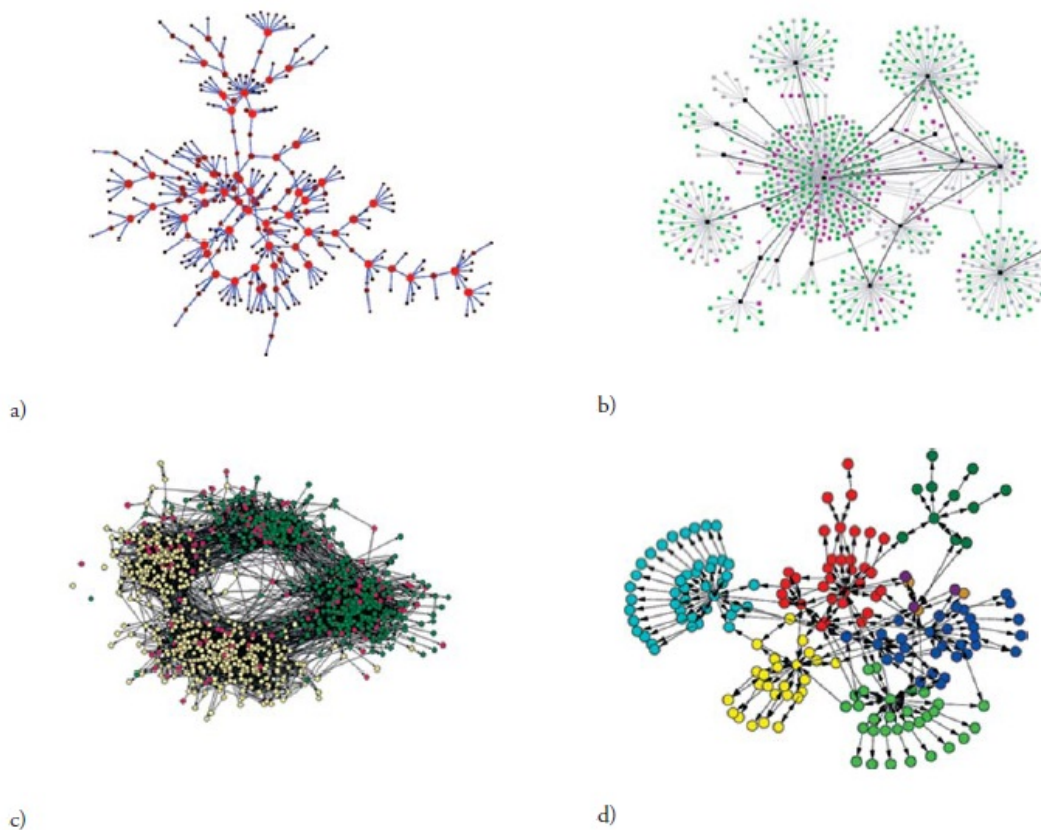


Figura 3.2: Exemplos de redes complexas: (a) Rede de contatos sexuais entre indivíduos; (b) Rede de contágios entre pessoas; (c) Rede dos amigos numa escola dos Estados Unidos; (d) Documentos num sítio da Web e ligações entre eles. As cores representam diferentes comunidades.

3.4 Propriedade das redes

A seguir são descritos os tipos mais clássicos de redes complexas: redes aleatórias, redes livres de escala e redes mundo pequeno.

3.4.1 Redes aleatórias

Provavelmente o modelo de rede mais simples e útil foi o proposto por Paúl Erdos e Alfred Rényi. Eles indicavam que os nós se podiam conectar em forma aleatória, desta forma eles representavam as interações do mundo como fundamentos aleatórios. Os vértices sem direção são colocados em forma aleatória entre um número fixo n de vértices para criar uma rede de $n(n - 1)/2$ possíveis vértices, com uma probabilidade p de conexão. A distribuição de conectividade destas redes aleatórias clássicas obedece a uma distribuição binomial, ou uma distribuição de Poisson. A característica mais importante de uma rede aleatória é o que se chama de transição de fase, de uma densidade baixa com um p baixo, um estado onde tem poucos

vértices e todos os componentes são pequenos tendo uma distribuição exponencial, a um estado de densidade alta onde a fração de todos os vértices estão juntos num só componente, com uma distribuição também de tamanho exponencial. Uma rede aleatória reproduz bem o efeito de mundo pequeno, no entanto as outras propriedades das redes aleatórias não coincidem com as redes do mundo real. Na figura 3.3 mostra-se uma rede aleatória.

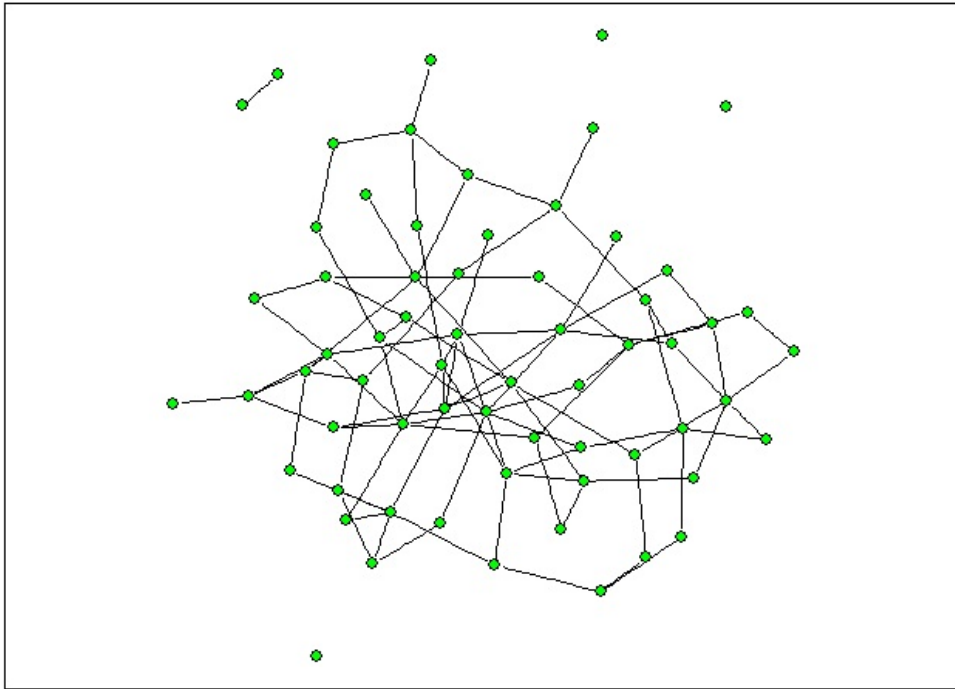


Figura 3.3: Exemplo de uma rede aleatória contendo 64 nós com probabilidade de conexão de $p = 0.05$.

3.4.2 Redes livres de escala

Posteriormente surgiram as redes sem escala ou livres de escala: são um tipo de rede complexa que atraiu a atenção dos pesquisadores porque várias redes reais caem nesta categoria. Diferentemente das redes aleatórias onde a distribuição de conectividade segue a distribuição de Poisson, no caso de redes livres de escala, alguns poucos elementos são muito conectados enquanto a maioria dos demais possui baixo índice de conectividade. Este tipo de rede é independente do número N de elementos. Sua principal característica, que a diferencia das redes aleatórias, é a probabilidade de conexão que é dada por uma lei de potência.

Nas últimas décadas os cientistas reconheceram que por vezes a natureza gera grandezas que seguem uma distribuição de tipo lei de potência em vez de uma curva de sino. Uma distribuição de lei de potência não tem pico, pelo contrário é uma curva constantemente decrescente, O caráter distintivo de uma lei de potência é que inúmeros eventos pequenos coexistem com outros eventos de grande magnitude. Toda lei é caracterizada por um expoente único. A lei de potência

descreve a distribuição do grau ou grau exponencial que nos informa o número de *links* por nó. Os modelos que caracterizam este tipo de rede são os modelos de Barabási- Albert, modelo Dorogovtsev- Mendes e o modelo Zhou- Mondragón. Estes modelos tratam dos seguintes conceitos básicos: crescimento contínuo, conexão preferencial, atração inicial, novas conexões e exclusão de conexões [NEWMAN, 2003]. Na figura 3.4 mostra-se uma rede livre de escala.

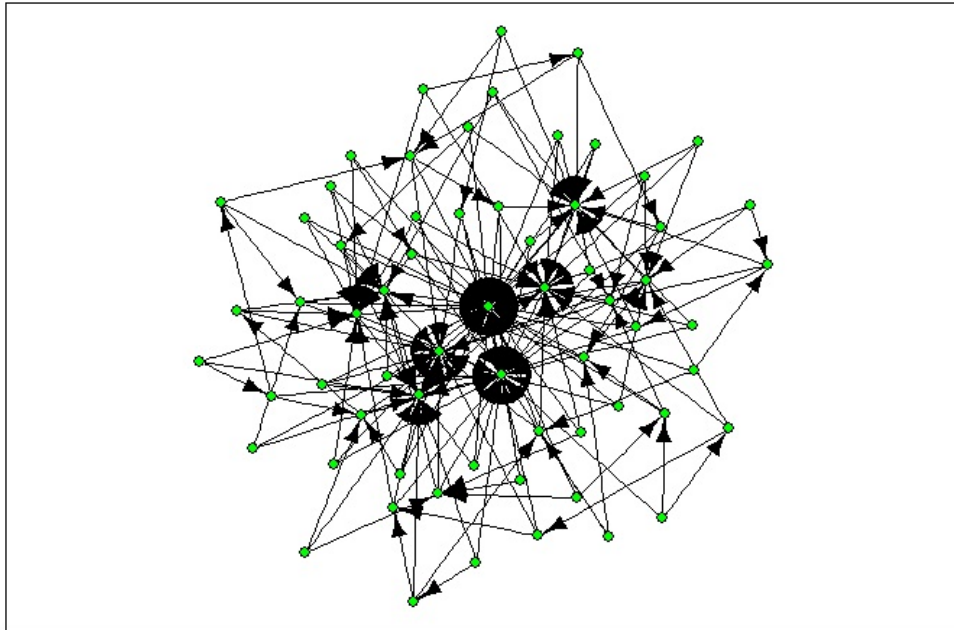


Figura 3.4: Exemplo de uma rede livre de escala contendo 64 nós com $m = 3$, onde m é um valor constante e indica o número de vértices que serão acrescentados no passo do tempo

3.4.3 Redes Mundo Pequeno

Chamado também modelo *small world* de Watts-Strogatz, no qual observa-se a presença de um grande número de ciclos de ordem três e surgiu como uma alternativa ao modelo de redes aleatórias. No modelo inicia-se com uma rede regular formada por N vértices ligados a k vizinhos mais próximos, tendo $2k$ conexões iniciais, posteriormente cada aresta é aleatoriamente reconectada com uma probabilidade p . Quando $p = 0$ a rede é completamente regular, quando $p = 1$ a rede é aleatória. Na figura 3.5 mostra-se uma rede mundo pequeno.

3.5 Propriedades Topológicas

Como a estrutura de uma rede é representada por um grafo, então para medir sua complexidade tem-se que considerar características mensuráveis. Estas medidas básicas são as seguintes.

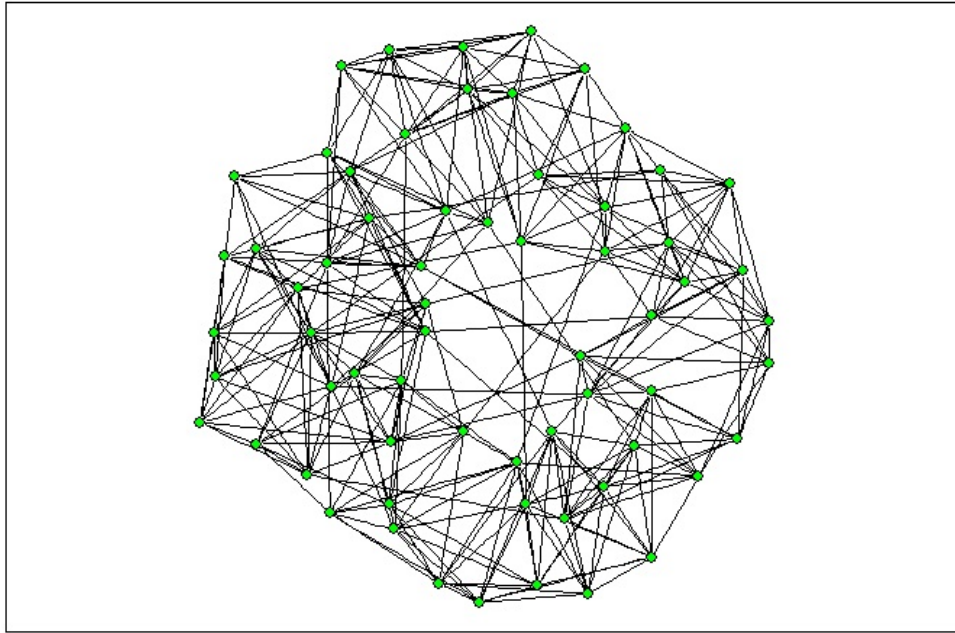


Figura 3.5: Exemplo de uma rede mundo pequeno contendo 64 nós com uma probabilidade de conexão de $p = 0.05$

3.5.1 Caminho mínimo médio

A definição de caminho mínimo médio depende do conhecimento de como se mede a distância d entre dois vértices. Numa rede, a distância entre dois vértices é dada pelo número de arestas do menor caminho que os conecta. Então, o caminho mínimo médio é a média da distância entre dois vértices medida sobre todos os pares de vértices [DOROGOVITSEV and MENDES, 2003]. É calculada pela equação(1):

$$\ell = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i \neq j} d_{ij}$$

Equação(1).

3.5.2 Grau de conectividade

Por definição, o grau de conectividade de um vértice i , em uma rede não direcionada, é o número de suas conexões diretas a outros vértices, ou seja dado pela equação(2):

$$k_i = \sum_{j=1}^N A_{ij}$$

Equação(2).

onde A é a matriz de adjacência associada e N é o número de vértices da rede. O grau de conectividade médio é definido como a média aritmética do grau de conectividade sobre todos os vértices. Dada pela equação(3):

$$\langle k \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N k_i$$

Equação(3).

A distribuição de graus em uma rede é caracterizada por uma função de distribuição $P(k)$ onde esta função descreve a probabilidade de um determinado vértice selecionado aleatoriamente tenha k arestas [DOROGOVTSSEV and MENDES, 2003]. As redes aleatórias, de mundo pequeno e livre de escala são classificadas e diferenciadas por estas propriedades.

3.5.3 Betweenness

O betweenness b_i é uma medida de centralidade de um nó i . Permite quantificar a importância de um nó individual na rede, definida com a seguinte Equação(4).

$$B_i = \sum_{j,k \in N, j \neq k} \frac{n_{jk}(i)}{n_{jk}}$$

Equação(4).

onde n_{jk} é o número de menores caminhos conectando j e k , enquanto que $n_{jk}(i)$ é o número de menores caminhos conectando j e k e passando através de i .

3.5.4 Coeficiente de aglomeração ou agrupamento

Também conhecido como transitividade, o agrupamento é uma propriedade típica de redes de conhecimento, onde dois indivíduos com um amigo em comum são também conhecidos um do outro. Esta tendência inerente ao agrupamento é quantificada pelo coeficiente de agrupamento. Suponha que um vértice i tenha grau de conectividade k_i , logo $(k_i - 1) / 2$ ligações podem existir entre eles (isto ocorre quando todos os vizinhos de i estão conectados a todos os outros vizinhos de i , Equação(5)).

$$C_i = \frac{2E_i}{k_i(k_i - 1)}$$

Equação(5).

onde E_i é dado pelo número de arestas dos vértices adjacentes ao vértice i e k_i é o número de arestas do vértice i .

Se o coeficiente de agrupamento for zero então significa que os nós adjacentes a i não estão conectados entre si, mas se for 1 significa que os nós adjacentes a i estão conectados entre si. A distribuição de graus em uma rede é caracterizada por uma função de distribuição $P(k)$, onde esta função descreve a probabilidade de um determinado vértice selecionado aleatoriamente tenha k arestas.

O coeficiente de aglomeração também pode ser expressado em função da conectividade dos vértices, Equação(6).

$$cc(k) = \frac{\sum_i cc_i \delta_{k_i k}}{\sum_i \delta_{k_i k}}$$

Equação(6).

O comportamento de $cc(k)$ é associado com a estrutura hierárquica da rede e δ_{ij} é a função delta de Kronecker ($\delta_{ij} = 1$ se $i = j$ ou zero caso contrário).

3.5.5 Dominância do ponto central

A partir do grau de intermediação, também conhecido como *betweenness*, podemos calcular a dominância do ponto central C_D . A dominância será 0 para uma rede completamente conectada, e será 1 para uma rede tipo estrela. É calculada pela seguinte equação, Equação(7).

$$C_D = \frac{1}{N-1} \sum_i (B_{max} - B_i)$$

Equação(7).

3.5.6 Grau hierárquico de nível 2 e razão de divergência

É definido pelo número de arestas entre um subgrafo g e o restante da rede sem considerar as arestas que ligam os vértices internos de g . A razão de divergência é calculada pela, Equação(8).

$$dv_d(g) = \frac{|N(R_d(g))|}{k_{d-1}(g)}$$

Equação(8).

3.5.7 Entropia

A entropia H é também chamada entropia de Shannon. Se todas as conexões possuem a mesma probabilidade de ocorrerem, a rede gerada terá uma estrutura altamente homogênea, por tanto tem o maior valor de H . É definida pela equação Equação(9).

$$H = - \sum_k P(x) \log P(x)$$

Equação(9).

onde $P(k)$ indica a probabilidade de que um vértice escolhido aleatoriamente tenha grau k , o logaritmo é dado na base 2.

3.5.8 Densidade da Rede

É uma medida que indica a quantidade de ligações existentes. São chamadas de redes densas aquelas nas quais há uma grande quantidade de ligações e redes esparsas são aquelas nas quais há poucas ligações. A densidade de uma rede não direcionada é denotada por Δ , sendo definida pela quantidade de ligações L , dividido pelo número máximo l_{max} de ligações. $l_{max} = n(n - 1)$, Equação(10).

$$\Delta = \frac{2L}{n(n-1)}$$

Equação(10).

onde L é o número de conexões da rede e n é o número total de nós.

A densidade de uma rede direcionada é dada pela equação(11).

$$\Delta = \frac{L}{n(n-1)}$$

Equação(11).

3.6 Trabalhos relacionados a redes complexas e cultivos de neurônios *in vitro*

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas para tentar compreender a auto-organização, sincronização dos *spikes* e dos *bursts* nos cultivos de neurônios *in vitro*, pois se acredita que influenciam em processos de aprendizado e memória. Os modelos computacionais desenvolvidos têm sido utilizados para demonstrar como os padrões dinâmicos surgem como resultado de interações entre unidades neurais ligados exclusivamente.

O trabalho de [LUIS et al., 2007] propõe uma metodologia baseada no tratamento da informação teórica de séries de tempo da atividade neural, especificamente registro do potencial de ação de células corticais de embriões de rato, desenvolvendo-se sobre uma matriz de microeletrodos, com o objetivo de mapear a estrutura da rede de neurônios através das conexões entre eles e identificar como a informação é processada através de atividades neurais, e como cada canal dentro da matriz é associado a um neurônio específico através da forma do potencial de ação. Os resultados foram obtidos após 5 horas de gravação de três diferentes culturas corticais com 34, 51 e 42 dias *in vitro* respectivamente, e o número de células gravadas é uma fração (estimada ao redor de 5% ao 10%) de todos os neurônios ativos na cultura. A informação mútua é uma medida estatística que provê informação de dependência estatística entre duas variáveis, sendo esta medida considerada neste trabalho para indicar a conectividade entre neurônios. Neste modelo considera-se a informação mútua $I(X; Y|Z)$ de duas variáveis X e Y sujeitas ao estado da

terceira variável Z . A consideração de uma terceira variável dá maior ou menor informação sobre a correlação entre as variáveis X e Y , Equação(12).

$$R(X, Y, Z) = I(X; Y) - I(X; Y|Z).$$

Equação(12).

Se R tem valor positivo indica que o conhecimento de Z não melhora e de repente degrada o conhecimento da correlação de X e Y , se $R = 0$ indica que ao menos uma das variáveis é independente das outras e se $R < 0$ indica que o conhecimento de Z agrega maior informação a X e Y . Para determinar o valor de R e I como significantes foram computados estes valores de acordo com o modelo *null* onde cada célula i na rede produz *spikes* no mesmo tempo de disparo observado por cada trem de pulsos dos neurônios mas cuja estrutura temporal é aleatória. O resultado observado nas redes corticais *in vitro* demonstram ser fracamente dissociativas, as redes possuem alto nível de *clustering* e pequeno diâmetro de largura ou seja características que identificam as redes do pequeno mundo. O autor conclui que entender a estrutura funcional da rede usada nos sistemas nervosos para armazenar e processar informação é importante para entender os mecanismos do poder computacional. É possível medir a atividade das redes de neurônios e identificar o seu desenvolvimento ao longo do tempo e seus papéis em resposta a um estímulo externo. Também ressalta a importância das séries de tempo serem tratadas estatisticamente, pois mostram como a informação é armazenada e processada por grupos de células. Como trabalho futuro apresenta expandir esta proposta a um número maior de células para investigar as mudanças ao longo do tempo e sob estimulações eletrofisiológicas. Também indica que esse mesmo tipo de análise pode ser feita sobre outro tipo de tecido nervoso tanto *in vivo* como *in vitro*.

Segundo [SEN et al., 2005] os neurônios e as regiões do cérebro que são espacialmente próximos têm uma probabilidade relativamente elevada de estarem ligados ao passo que as conexões entre os neurônios ou regiões do cérebro espacialmente remotas são menos prováveis. A reconstrução de redes celulares no córtex dos mamíferos a partir de gravações de atividade elétrica revelou várias características de conectividade altamente não-aleatórias, inclusive apresentam uma tendência de conexões sinápticas ser recíproca e em cluster. Na literatura existem muitos trabalhos que abordam este tipo de pesquisa mas apenas um estudo investigou a estrutura de uma rede neuronal através da análise de interações funcionais entre os neurônios individuais. Neste caso, o acoplamento foi avaliado a partir da atividade espontânea de uma cultura de neurônios e os resultados sugerem que a rede apresenta propriedades do mundo pequeno [LUIS et al., 2007]. É importante destacar que nesses estudos se tentou quantificar propriedades do mundo pequeno em redes neuronais a nível individual de neurônios, mas que segundo [Felipe Gerhad, 2011] estes estudos apresentaram falhas, por considerar apenas as redes que foram obtidas a partir de preparações *in vitro* ou de animais anestesiados. Além disso, as estimativas da matriz

de conectividade eram baseadas em pares de medidas ou em aproximações bastante grosseiras à atividade da população. Os estudos feitos utilizaram medidas que não ofereciam noções de causalidade. O pesquisador tenta superar as falhas anteriormente citadas usando gravações de multieletródos de um macaco acordado, fazendo uso de um conjunto de dados maiores do que em outras abordagens propostas e cuja conectividade efectiva foi estimada usando uma plataforma de modelos de regressão linear generalizados (GLM) desenvolvidos por [NELDER, 1972], que permitem estabelecer relações entre variáveis que se interrelacionam cujas informações estão disponíveis através de dados pré-coletados.

Os resultados obtidos por Gerhad [Felipe Gerhad, 2011] indicam que as redes de neurônios possuem uma estrutura de redes livre de escala, mas que apresentam uma pequena mas significativa estrutura de mundo pequeno. No artigo indica que extrair a estrutura de conectividade a partir de gravações em grande escala é um tema de investigação em curso e as análises do coeficiente de correlação cruzada ou o mais recente modelo Ising produzem matrizes de conectividade simétrica e que nenhum desses modelos estima o sentido da interação, indicando que a plataforma GLM usada na sua pesquisa permite estimar interações dirigidas que em geral, resultam em matrizes de conectividade assimétrica. O modelo Ising trata-se de um modelo de sistema magnético, segundo os quais os átomos possuem um momento magnético ou spin, podendo suceder que esse spin apenas possa apontar em duas direções opostas do espaço. Os *spins* podem assumir os estados 0 ou 1, se o parâmetro de acoplamento k entre dois *spins* tem valor positivo e a energia total minimiza-se quando os *spins* apontam todos na mesma direção, o oposto acontece quando o valor de k é negativo.

Outro trabalho interessante e o melhor exemplo conhecido é a reconstrução de uma rede neural de 302 neurônios do nematóide *C. Elegans* por White. Uma das características que chama a atenção dos pesquisadores é que as redes reais não são como grafos aleatórios revelando que possuem mecanismos que possam orientar a formação das redes e possíveis caminhos em que se pode explorar a estrutura da rede para atingir determinados objetivos.

No trabalho de [SHAN YU et al., 2008] para a reconstrução de uma rede de neurônios foi aplicado o modelo Ising baseado no princípio de máxima entropia. Foram investigadas redes funcionais de neurônios corticais mediante a análise de correlação para determinar a conectividade funcional da rede. Para determinar se a rede tem propriedades do mundo pequeno traçou-se um gráfico binário (onde nós eram ligados ou não) ou um gráfico de peso (pesos definidos por força da interação foram designados para conexões individuais) para analisar as propriedades associadas com a força da conexão dos nós. No experimento para extrair as redes de interação foi usado um parâmetro j ajustado do modelo Ising. Este valor representa a interação entre pares de picos e está relacionado à probabilidade de um pico ocorrido em um neurônio ser causado por um pico de outro neurônio ou vice-versa. As redes de interação resultante desse modelo baseado em reconstrução concordaram bem com a organização funcional do córtex

visual. No experimento foi analisada a arquitetura funcional da rede definida diretamente pelo coeficiente de correlação bruto. Utilizando o mesmo método, foram encontradas novamente propriedades do mundo pequeno para redes de 10 neurônios e para redes maiores contendo todos os neurônios registrados a partir de uma sonda. Um resultado obtido foi que há um grande grupo de neurônios cuja atividade depende em grande medida na entrada de outras fontes e uma proporção relativamente pequena de neurônios que interagem fortemente com a rede analisada.

Séries Temporais

Neste capítulo serão apresentados conceitos relacionados a séries temporais, cuja abordagem é feita no domínio do tempo como da frequência. Aprofundaremos especificamente na explicação do modelo autorregressivo multivariado (MAR), sua estimação, análise dos resíduos e testes aplicados sobre o mesmo. O objetivo deste capítulo é proporcionar uma ideia clara e concisa dos conceitos acima, pois os mesmos serão posteriormente aplicados nos experimentos detalhados no capítulo 6, a fim de determinar se os modelos estimados para cada registro de atividade espontânea representam adequadamente as séries temporais.

4.1 Análise de Séries Temporais

Uma série temporal é um conjunto de observações, obtidas em diferentes intervalos de tempo e em forma cronológica. Existem dois enfoques utilizados na análise de séries temporais: modelos paramétricos, onde o número de parâmetros é finito, e não paramétricos que é o oposto do paramétrico. A série temporal também pode ser vista como uma realização de um processo estocástico, ou seja, uma série temporal pode ser considerada como uma amostra de um determinado processo estocástico.

Um tipo de classificação das séries temporais, está baseado na quantidade de variáveis envolvidas na análise, podendo ser: i) modelos univariados: baseados na análise de uma série temporal, onde a mesma é explicada apenas pelos valores passados por uma única variável ii) modelos multivariados: inclui a análise de duas ou mais variáveis. A necessidade de entender as relações entre diferentes variáveis (dinâmica que acontece no mundo real) faz com que o estudo de sistemas multivariados seja de interesse para entender fenômenos físicos, biológicos,

atmosféricos, etc. Usando-se modelos estatísticos os dados multivariados podem se representar como uma matriz retangular A de n linhas e p colunas, equação(1).

$$A = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \dots & a_{1k} \dots a_{1p} \\ a_{21} & a_{22} \dots & a_{2k} \dots a_{2p} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} \dots & a_{nk} \dots a_{np} \end{pmatrix}$$

Equação(1).

A matriz A contém os dados de todas as observações de todas as variáveis. Quando nos referimos a séries temporais, entendemos que essas séries podem ser modeladas usando modelos paramétricos e não paramétricos. Os métodos paramétricos são aqueles nos quais o número de parâmetros é finito, sendo modelos como: Modelo Autorregressivo (Auto Regressive, AR), Modelo de médias móveis (Moving Average, MA), Modelo autorregressivo de médias móveis (Auto Regressive Moving Average, ARMA), entre outros.

Os métodos não paramétricos são aqueles que o número de parâmetros é infinito, cuja abordagem é direcionada na aplicação de redes neurais artificiais, entre outros. A importância de estudar métodos regressivos é devida a possibilidade de determinar um padrão de comportamento de sistemas dinâmicos, baseado em relações lineares, quantificar características inerentes, e prever comportamentos futuros. É muito comum ao trabalhar-se com séries temporais encontrar padrões de comportamento como:

- Sazonalidade: Quando as séries exibem um comportamento que se repete a cada t períodos de tempo. A sazonalidade pode ser: i) aditiva: quando as flutuações sazonais são mais ou menos constantes, ii) multiplicativa: quando as flutuações sazonais variam dependendo de todas as variáveis;
- Tendência linear: mudanças de longo prazo, em que o sistema estudado tenha a sua intensidade aumentada ou diminuída com o passar do tempo. Uma forma de suavizar essa tendência é aplicando filtros lineares como: i) alisamento exponencial; ii) diferenciação: que consiste em aplicar diferenças na série até esta se tornar estacionária. Esta última não é recomendável para as séries em estudo nesta dissertação, pois muitas vezes mudam o espectro do sinal;
- Ciclos: O também chamado de componente cíclico é um movimento oscilatório de longa duração e

- Volatilidade: Séries de tempo cuja variância é condicionada ao tempo.

O correlograma é um gráfico comumente usado na identificação dos padrões de comportamento das séries temporais: porém os gráficos devem ser adequadamente analisados e interpretados, para determinar o modelo que se adapte melhor para o estudo da série temporal. Para trabalhar com modelos regressivos, as séries de tempo devem ser estacionárias ou estáveis. Segundo [PEDRO and CLELIA, 2004] uma variável é estacionária se as propriedades estatísticas não se alteram com o tempo, logo a média $\mu(t)$ e a variância $\sigma^2(t)$ são constantes.

Um processo é dito fracamente estacionário (ou estacionário de segunda ordem, referem-se aos dois primeiros momentos da distribuição de probabilidade dos Z_t 's) se as três condições especificadas a seguir são satisfeitas. A definição de estacionariedade mais geral envolve todos os momentos:

Condição 1: $E(Z_t) = \mu$ (média constante)

Condição 2: $Var(Z_t) = \gamma_0$ (Variância constante)

Condição 3: $Cov(Z_t, Z_t - k) = \gamma_k$

A covariância entre Z_t e $Z : t - k$ depende apenas do atraso k

Aqui Z_t significa a amostra de série obtida para o tempo t e k refere-se ao atraso no tempo.

Onde Z_t é a amostra de série obtida no tempo t , e k refere-se ao atraso no tempo.

4.2 Duas abordagens das séries temporais

Para trabalhar com séries temporais existem duas abordagens: modelar as mesmas no domínio do tempo e no domínio da frequência. Quando se considera como variável independente, o tempo, o sinal é considerado no domínio do tempo; e se quer medir a variabilidade dos dados em diferentes escalas de frequência é utilizado o domínio da frequência cuja análise é denominada análise espectral.

4.2.1 Análise no domínio do tempo

A descrição sobre a análise no domínio do tempo foi dispensada pois neste trabalho serão realizados estudos de análise no domínio da frequência, da análise espectral.

4.2.2 Análise Espectral

A série temporal no domínio da frequência pode ser especificada em termos de senos e cossenos, fazendo uso da transformada de Fourier, porém uma alternativa da transformada de Fourier de uma função $f(t)$ escreve-se como Equação(2), na forma exponencial.

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i\omega t} f(t) dt.$$

Equação(2).

Aqui $f(\omega)$ é a transformada no domínio da frequência, $f(t)$ é a função que representa a série temporal a ser analisada. Uma outra transformação é conhecida como Transformada Discreta de Fourier (Discrete Fourier Transform, DFT), cuja função é transformar uma função discreta no tempo para o domínio da frequência, e uma forma de avaliação dessa transformada de forma rápida. é conhecida como Transformada Rápida de Fourier (Fast Fourier Transform, FFT) [PRIESLEY., 1981].

Este tipo de análise é aplicado para estudar a evolução de séries temporais, sendo que diferentes evoluções apresentam diferentes espectros de potência. Sinais aleatórios apresentam espectros de potência com energia constante ao longo das frequências, sinais periódicos apresentam picos bem definidos na frequência correspondente ao período.

O espectro de frequência mostra os conteúdos de frequência do sinal $x(t)$ com suas amplitudes e fases [PRIESLEY., 1981]. Para aplicar FFT na análise espectral é recomendável que N (tamanho da série) seja uma potência de 2.

4.2.3 Função de autocorrelação (FAC)

A função de autocorrelação ρ_k é uma medida que indica o grau de semelhança no sinal à medida que o tempo passa, ou seja, o quanto o valor de uma realização de uma variável aleatória no instante t depende de seus valores prévios. Se a série for estacionária, dependendo da forma do decaimento da função de autocorrelação determinar-se-á, se a série possui ou não correlação de longo alcance ou de curto alcance. A autocorrelação se define pela distância ou atraso.

Uma função de autocorrelação com decaimento seguindo uma lei de potência indica que a série possui uma correlação de longo alcance. Em geral sinais neurológicos possuem correlações de longo alcance, características de sistemas críticos. Pode ser definida como a razão entre a covariância e a variância. A fac amostral r_k matematicamente é definida como Equação(3).

$$r_k = \frac{C_k}{C_0}, k = 0, 1, \dots, N - 1$$

Equação(3).

onde:

$$C_k = \frac{1}{N} \sum_{t=1}^{N-K} (Z_t - \bar{Z})(Z_{t+k} - \bar{Z}) \quad k = 0, 1, 2, \dots, N - 1$$

Equação(4).

portanto:

$$\bar{\rho}_k = r_k = \frac{\sum_{t=1}^{N-K} (Z_t - \bar{Z})(Z_{t+k} - \bar{Z})}{\sum_{t=1}^N (Z_t - \bar{Z})^2} \quad k=0,1,2,\dots,N-1$$

Equação(5).

sendo que \bar{Z} é a média amostral e $Z_t = Z_{t-1}, Z_{t-2}, \dots, Z_{t-k}$.

Para uma série com tendência os valores da função de autocorrelação decaem para zero em defasagens grandes, por isso é necessário que qualquer tendência seja removida antes de estimar o modelo da série estudada.

4.2.4 Função de autocorrelação parcial

A função de autocorrelação parcial mede a correlação entre duas amostras Z_t e Z_{t-k} separadas por um intervalo de tempo k , excluindo-se amostras até chegar a um valor estatístico confiável.

Os resultados obtidos através da função de autocorrelação parcial podem ser graficados utilizando um correlograma parcial. O correlograma traça um limite assintótico, determinado um intervalo de confiança no qual as estatísticas da função de autocorrelação e de autocorrelação parcial devem variar. Este intervalo é determinado pela equação(6).

$$IC = \pm 1,96\left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}}\right)$$

Equação(6).

Portanto o valor 1,96 corresponde a um intervalo relacionado a uma distribuição normal com um nível de significância de 5%, σ corresponde ao desvio padrão, n corresponde ao número de elementos da amostra.

4.2.5 Modelo autorregressivo multivariado (Multi-Valued Auto Regressive, MVAR)

Este modelo é a extensão de um modelo autorregressivo univariado e é útil para descrever o comportamento dinâmico de séries de tempo financeira, climatológicas, econômicas, e realizar suas previsões. Um modelo autorregressivo multivariado de ordem p é definido como, Equação(7).

$$X_n = \begin{bmatrix} X_1(n) \\ \vdots \\ X_M(n) \end{bmatrix} = \sum_{r=1}^p A(r)X(n-r) + w(n)$$

Equação(7).

onde $A(r)$ é uma matriz que contém os coeficientes autorregressivos, Equação(8).

$$A(r) = \begin{bmatrix} a_{11}(r) & \dots & a_{1n}(r) \\ a_{m1}(r) & \dots & a_{mn}(r) \end{bmatrix},$$

Equação(8).

$w(n)$ é um vetor que contém as informações também conhecidas como ruído aleatório. O coeficiente $a_{ij}(r)$ representa as interações lineares de $X_j(n-r)$ em $X_i(n)$ e p é a ordem do modelo (ver sec 1.4.1). Para o caso bivariado, a Equação(7) pode ser representada da seguinte forma, Equação(9)

$$\begin{aligned} X(n) &= \sum_{r=1}^p a_{xx} X(n-r) + \sum_{r=1}^p a_{xy} Y(n-r) + w_1(\tau) \\ Y(n) &= \sum_{r=1}^p a_{yx} X(n-r) + \sum_{r=1}^p a_{yy} Y(n-r) + w_2(\tau) \end{aligned}$$

Equação(9).

Para uma análise espectral a Equação(7) pode ser transformada no domínio da frequência sendo a equação da seguinte forma, Equação(10):

$$A(f)X(f) = E(f)$$

Equação(10).

onde:

$$A(f) = \sum_{r=0}^p A(r)e^{-j2\pi f\Delta_t r}$$

Equação(11).

onde $A(f)$ é a matriz de coeficientes espectrais, onde Δ_t é um intervalo de tempo entre duas amostras, $E(f)$ é um vetor de ruído espectral resultando da aplicação da transformada de Fourier nos resíduos $w(t)$.

4.3 Etapas na estimação

Em continuação descrevem-se as etapas na estimação de um modelo autorregressivo multivariado.

4.3.1 Estimação do modelo autorregressivo multivariado

Ao se estudar séries temporais procura-se entender qual é o comportamento da variável ou variáveis estudadas. Baseados nesse tipo de comportamento procuram-se encontrar modelos que possam representar adequadamente a série. Baseado na metodologia de Box-Jenkins existem quatro etapas a serem seguidas na procura do modelo as quais são: 1) identificar: que consiste em analisar o comportamento da série, identificando critérios de comportamento. Para a identificação desses critérios podem ser usados os métodos da função de autocorrelação (FAC), sendo um método bastante útil para ter uma idéia do comportamento da série temporal estudada; 2) Estimar: Consiste em escolher o melhor modelo baseado nos critérios AIC (Akaike Information Criteria) ou BIC (Bayesian Information Criteria). O melhor modelo é aquele que apresenta o menor AIC ou BIC entre os candidatos. Outro critério também considerado é baseado nos resíduos da regressão. Esse critério é baseado na escolha do modelo que possui o menor Erro Quadrático Médio, onde posteriormente é necessário verificar a ordem do modelo (número de coeficientes da série estimada) e caso essa ordem seja um número muito grande indica que o modelo não seja adequado; 3) Verificação: Procura-se verificar se o modelo descreve adequadamente a série, verificando-se a estacionariedade e os resíduos não correlacionados. Chama-se de resíduo ao estimador para o erro, onde o erro é uma variável aleatória não observável, com média zero e variância constante.

O número de parâmetros estimados se incrementará à medida que se analise mais sinais de forma simultânea.

Os métodos mais tradicionais para estimar os parâmetros dos modelos lineares são os seguintes:

- Método dos Momentos;
- Método de Mínimos Quadrados Ordinários (MQO);
- Método da Máxima Verossimilhança (MV).

O Método dos Momentos é pouco utilizado na estimação dos parâmetros dos modelos de regressão linear, pois a estimação dos parâmetros resulta de um sistema de equações que depende da dimensão do vetor de parâmetros. Já o método de mínimos quadrados ordinários é o mais popular e conhecido, pois os estimadores são facilmente calculados.

O método da Máxima Verossimilhança exige que seja determinada uma distribuição de probabilidades para a componente estocástica do modelo.

Outro modelo considerado adequado estimador dos parâmetros dos modelos de regressão linear é o método de Nuttall Strand [MARPLE, 1987], o qual será utilizado para a estimação dos parâmetros das séries de registro de atividade espontânea.

A implementação do método pode se encontrar disponível no pacote `artif2` ou `TSA` que são bibliotecas específicas para a análise de séries temporais que faz parte do software R, muito usado em economia e estatística.

4.3.2 Ordem do modelo

O tamanho do atraso no modelo MAR depende da ordem do modelo estimado. Através da função de autocorrelação parcial podemos determinar a ordem de um processo autoregressivo. A seleção da ordem do modelo é dada pelo critério Akaike (*Akaike Criterion Information-AIC*) Equação(12) ou pelo critério Bayesiano de Schwarz (*Bayesian Information Criteria- BIC*), que são baseados no valor de verossimilhança do modelo. Sendo que a ordem escolhida é aquela que minimiza o AIC ou BIC. Quando a função de autocorrelação decresce lentamente indica a não estacionariedade da série. Para a ordem do modelo escolhido nos experimentos optou-se pelo critério AIC. Para a escolha da ordem do modelo é muito importante ter em vista a chamada parcimônia que consiste em utilizar a menor quantidade de parâmetros possível para obter uma representação adequada da série temporal. Alterações pequenas na ordem do modelo não influenciam os resultados, Equação(12).

$$AIC(p) = n * \ln(SQ/n) + 2K$$

Equação(12).

onde \ln é o algoritmo da base natural, SQ é a soma de quadrados do erro, K é o número de parâmetros, n é o número de observações. A seguir é apresentado o algoritmo AIC.

4.3.3 Diagnóstico do modelo estimado

- **Análise dos resíduos:** Os resíduos correspondem aos erros de previsão na estimação do modelo. Para um adequado ajuste da série modelada é necessário verificar se o resíduo é um ruído branco, ou seja, se o erro é uma variável aleatória independente e identicamente distribuída, com distribuição normal e média zero. Se os resíduos são correlacionados, os modelos de previsão não modelaram somente os dados, mas também modelaram os resíduos, originando inadequadas previsões.

Para verificar os resíduos se utilizará o teste de Portmanteau também conhecido como Q Teste [LJUNG, 1978], que determina se os resíduos quadrados possuem correlação serial. A equação é a seguinte, Equação(14).

$$Q = T(T + 2) \sum_{i=1}^n \frac{\rho_i}{T-i}$$

Calcular Akaike (num_obser, erro, k)

```
1. AIC=1
2. Flag=-1
3. for (i=1 até k)
4. Flag=1
5.   n=num_obser.
6.   SQ=soma(erro)
7.   SQ=Log(SQ/n)
8.   num_param=2*k
9.   AIC_ant=n*SQ+num_param
10.  If (AIC_ant<=AIC and Flag=1)
11.    Print(AIC_ant)
12.  End-if
13.  AIC=AIC_ant
14. End-for
```

Equação(14).

O valor Q tem uma distribuição χ^2 assintótica com n graus de liberdade, ρ_i é o coeficiente de autocorrelação da amostra entre os resíduos $\hat{\epsilon}_t^2$ e $\hat{\epsilon}_{t-1}^2$, T é o tamanho da amostra dos resíduos. O teste da hipótese nula com $H_0=0$ indica que não existe correlação, contra a hipótese alternativa $H_0=1$ da existência de correlação entre as séries.

- Previsões: A previsão é um dos objetivos da modelagem de séries univariadas e multivariadas e é realizada uma vez que o modelo esteja bem estimado para o fenômeno estudado. Assim se t é o período atual e temos interesse em prever os valores de X_{t+1}, X_{t+2}, \dots . A previsão de X_{t+k} , onde k é o horizonte de previsão será denotado como \hat{X}_{t+k} que é a esperança condicional de X_{t+k} de todos os valores passados. Numa série temporal as previsões são feitas dentro do período amostral e comparadas com os valores observados. A diferença entre o valor previsto e o valor observado é chamado erro de previsão com k passos à frente. Outra prática comum para séries temporais consiste em estimar o modelo excluindo algumas observações finais e usar o modelo estimado para fazer previsões, assim as observações podem ser comparadas com os valores observados.

Coerência Parcial Direcionada e Trabalhos correlatos

Neste capítulo serão apresentados os conceitos relacionados aos tipos de conectividade de redes de neurônios, medidas de correlação causal como: causalidade de Granger e coerência parcial direcionada (PDC). O objetivo é explicar como o PDC é capaz de detectar a direção na conectividade entre séries temporais multivariada. Também detalharemos em forma resumida, trabalhos existentes na literatura relacionados com a nossa proposta, os resultados obtidos em cada um deles, conclusões e propostas futuras. Este tipo de informação poderá nos ajudar a delinear parâmetros como: tamanho da amostra, testes para a verificação dos resultados, escolha do método adequado. Ditos parâmetros serão uma referência na execução dos experimentos, apresentados no capítulo 6.

5.1 Analisando a conectividade usando modelos de causalidade nas séries de tempo

Quando nos referimos à conectividade podemos citar 3 tipos: i) conectividade funcional; ii) conectividade estrutural; e iii) conectividade efetiva. Tanto a primeira como quanto a segunda conectividade podem mostrar algum tipo de dependência entre séries de dados, mas não podem revelar processos causais que ocorrem, por exemplo, entre neurônios ou em regiões do cérebro. A conectividade efetiva é de especial interesse com respeito às demais pois tenta ir além da dependência estatística e pretende identificar uma rede de causas ou influências dirigidas que explicam os dados observados. Segundo Sporns [\[OLAF, 2011\]](#), uma das dificuldades ao estimar

a conectividade efetiva tem a ver com a resolução temporal na aquisição dos dados o que implica que o modelo estimado esteja sujeito a erros, mas mesmo assim modelos computacionais ajudam a testar hipóteses e ter uma visão geral da dinâmica de uma rede.

Para estudar as interações direcionadas na conectividade efetiva, muitos métodos tem sido propostos, como: análise de correlação, modelagem de equações estruturais e dinâmicas causais. O mais estudado recentemente é a causalidade de Granger que tem sido aplicada em sistemas econômicos e financeiros. Granger definiu a causalidade como uma medida de dependência direcionada entre séries de tempo [GRANGER, 1987]. Se uma variável Z_t pode ser prevista mais eficientemente se a informação da variável X_t é levada em conta, então X_t possui a causalidade de Granger em Z_t , tendo em vista que a causalidade não é necessariamente recíproca. Aqui a matriz de variância de erros é uma medida para indicar a significância na previsão.

A causalidade de Granger foi formulada para sistemas lineares e posteriormente para sistemas não lineares. Em neurociência surgiu o interesse de aplicar a causalidade de Granger com o objetivo de se entender as inter-relações funcionais entre distintas regiões do cérebro e como estas inter-relações podem mudar ao longo do tempo. Surgiram assim técnicas baseadas neste conceito de causalidade: i) DTF (Directed Transfer Function), função de transferência direcionada; ii) PC (Partial Coherence), coerência parcial; iii) causalidade de Granger, iv) PDC (Partial Directed Coherence), coerência parcial direcionada. Outra abordagem interessante que não se encontra limitado a métodos paramétricos, como as abordagens citadas anteriormente, e que também está sendo usada para descrever o fluxo de informação é utilizando a transformada de Wavelets que pode ser aplicada na análise de trens de spikes. O método denominado transferência de entropia é uma outra abordagem, e é mais robusto para detectar a correlação e o tamanho da mesma em condições de ruído [SHIVKUMAR et al., 2010], embora esses métodos resultem interessantes na sua aplicação. Em [MATHIAS et al., 2005] utilizando dados sintéticos simulados, medidas de causalidade são comparadas, mostrando que o PDC foi a técnica mais robusta na detecção de influências diretas e indiretas, assim como também na detecção de direção, comparadas com as outras técnicas citadas anteriormente. Também mostram que um frágil acoplamento não linear nas direções também pode ser detectado pelo PDC. O Aumento na ordem do modelo é requerido para descrever sistemas não lineares por um modelo MAR.

5.2 Coerência Parcial Direcionada (PDC)

A equação do PDC é a seguinte, Equação(1).

$$\pi_{i \leftarrow j}(f) = \frac{\frac{1}{\sigma_{ii}} \bar{a}_{ij}(f)}{\sqrt{\sum_{i=0}^k \frac{1}{\sigma_{ii}} |\bar{a}_{ij}(f)|^2}}$$

Equação(1).

onde f é a frequência de amostragem normalizada que é dada pela frequência de interesse com respeito à faixa de amostragem. $\pi_{i \leftarrow j}$ representa a causalidade das interações de uma variável j , considerando uma variável i , comparando todas as interações j , na outra variável, normalizada no intervalo $[0,1]$.

A função $\bar{a}_{ij}(f)$ contém as estimações dos coeficientes de regressão sobre a medição de X_i e X_j , $|\bar{a}_{ij}(f)|^2$ é a função que contém os coeficientes assintoticamente normalizados. A matriz de covariância dos resíduos do modelo estimado é Σ_m onde a anti diagonal σ_{ij} representa a variância da matriz de covariância e σ_{ii}^2 representa a covariância. A interdependência é capturada pela covariância da matriz Σ_m . A interdependência esta referida à causalidade instantânea.

No domínio da frequência o PDC é calculado a partir dos coeficientes autorregressivos multivariados obtidos através do VAR e levados ao domínio da frequência.

Uma característica importante do PDC é que a causalidade pode ser avaliada sobre faixas de frequências específicas [LUIZ and KOICHI, 2001].

A matriz de densidade espectral pode ser representada como, Equação(2).

$$S(f) = H(f)\Sigma^{-H}H(f)$$

Equação(2).

A matriz $S(f)$ contém o espectro cruzado fora da diagonal da matriz e o auto-espectro de $w(t)$ que se encontra na diagonal da matriz. O operador $-H$ representa a matriz conjugada transposta da inversa.

A Equação(1) expressa em termos de função de transferência é da seguinte forma, Equação (3).

$$H(f) = \bar{A}^{-1}(f) = (I - A(f))^{-1}$$

Equação(3).

onde I representa a matriz identidade, $\bar{A}^{-1}(f)$ é a matriz dos coeficientes autorregressivos. $\bar{A}^{-1}(f) = a_{11}(f)$

$$\bar{A}_{ij}(f) = \begin{bmatrix} 1 - \sum_{r=1}^{+\infty} a_{ij}(r)e^{-j2\pi fr}, i=j \\ -\sum_{r=1}^{+\infty} a_{ij}(r)e^{-j2\pi fr} \end{bmatrix}$$

Equação(4).

onde para o termo do expoente $j = \sqrt{-1}$ não deve ser confundido com o índice j da matriz A . $\bar{A}_{ij}(f)$ é o elemento da matriz $A(f)$ e Σ_w é a matriz de covariância da matriz de resíduos.

Os coeficientes $a_{ij}(r)$ descrevem as interações que ocorrem entre o presente da série temporal $X_i(n)$ e o passado de $X_j(n)$ quando se compara o efeito de $X_j(n)$ a outras séries.

Quando $i = j$ tem-se que $\bar{\pi}_{i \leftarrow j}(f)$ indica a densidade espectral do processo com inicio em j .

5.3 Interpretação geométrica da aplicação da coerência parcial direcionada

Como a pesquisa relativa à presente dissertação está orientada ao domínio da frequência, para entender como o PDC detecta a direção nas séries temporais, apresentamos a seguir brevemente alguns conceitos matemáticos relacionados ao PDC. O PDC é capaz de distinguir entre dois tipos de causalidade. O primeiro tipo se dá quando os passados de $X(n)$ contribuem significativamente na previsão de $Y(n)$, o segundo tipo de causalidade considera o presente de $X(n)$ que contribui significativamente na previsão de $Y(n)$, este último tipo é conhecido como causalidade instantânea ou direta.

Representação formal de um AR(2), Equação(5).

$$\begin{bmatrix} X_1(t) \\ X_2(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} H_{11} & H_{12} \\ H_{21} & H_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_1(t) \\ E_2(t) \end{bmatrix}$$

Equação(5).

Onde $H_{11}, H_{12}, H_{21}, H_{22}$ representam os coeficientes da função de transferência, $E_1(t)$ é o resíduo de X_1 e $E_2(t)$ é o resíduo de x_2 .

A representação espectral para o caso bivariado de H_{ij} é a seguinte, Equação(6).

$$\begin{bmatrix} H_{11}(f)H_{12}(f) \\ H_{21}(f)H_{22}(f) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 - \sum_{k=1}^L a_{11}(k)e^{-j2\pi fk} & - \sum_{k=1}^L a_{12}(k)e^{-j2\pi fk} \\ - \sum_{k=1}^L a_{21}(k)e^{-j2\pi fk} & 1 - \sum_{k=1}^L a_{22}(k)e^{-j2\pi fk} \end{bmatrix}$$

Equação(6).

$$\begin{aligned} S_1(f) &= \sigma_{11}^2 |H_{11}(f)|^2 + \sigma_{22}^2 |H_{12}(f)|^2 \\ S_2(f) &= \sigma_{11}^2 |H_{21}(f)|^2 + \sigma_{22}^2 |H_{22}(f)|^2 \end{aligned}$$

Equação(7).

onde $S_1(f)$ e $S_2(f)$ contêm os auto espectros de cada canal na diagonal da matriz.

5.4 Analisando as propriedades da rede usando teoria de redes complexas

Uma das propriedades básicas de uma rede é a sua não linearidade (aleatória e não controlada). Segundo [CASIO, 2003] a circulação de informação de forma não linear é capaz de produzir um processo circular de aprendizagem crescente que tem como consequência a reorganização dos próprios elementos da rede. Embora a maioria dos sistemas do mundo real sejam sistemas não lineares podem-se ajustar modelos estatísticos lineares com a finalidade de estudar este tipos de dinâmicas.. A importância de modelar a dinâmica de interação entre redes neurais, tendo em conta a conectividade estrutural é de suma importância pois a representação da variabilidade destas conexões ajudam a entender a plasticidade e reorganização de células neuronais no cérebro. Estas variações observadas em regiões do cérebro alteram a topologia da rede e isso pode estar originando diferenças no comportamento cognitivo ou na execução de alguma tarefa. Sporns [OLAF, 2011] também observa a importância das mesmas.

Quando representamos graficamente uma rede que possui centenas ou milhares de conexões é difícil encontrar algum tipo de significado destas conexões se não existisse medidas que nos ajudassem a avaliá-las. O trabalho de [CORNELIS and C, 2007] indica que usando-se este tipo de abordagem pode-se identificar padrões de conexão.

5.5 Trabalhos relacionados

Anakil [ANIL, 2010] desenvolveu um *toolbox* em matlab chamado GCCA que permite realizar uma análise de conectividade e fluxo de informação entre diferentes áreas do cérebro, usando conceitos de causalidade de Granger descrita através de um modelo autorregressivo bivariado. O toolbox foi desenvolvido para ser aplicado numa variedade de dados neurológicos como: Imagens de ressonância magnética (MRI), Eletroencefalograma (EEGC), BOLD , entre outros. Também sugere técnicas de pré-processamento antes de realizar a etapa de análise de conectividade.

Na etapa de pré-processamento ele mostra como a aplicação de algum tipo de filtro pode alterar os resultados na descoberta de conectividade bidirecional. Como sugestão para esta etapa de pré-processamento ele sugere o uso do filtro *multitapering* . Este método também está apoiado por outros pesquisadores, pois não altera significativamente o espectro do sinal e ajuda a reduzir o bias ou tendência das séries. Esta mesma consideração temos tido em nossa pesquisa na etapa de pré-processamento. No *toolbox* se observa uma análise feita tanto no domínio do tempo como da frequência. Uma das limitações em seguir esta abordagem com respeito à coerência parcial direcionada e a função de transferência direcionada, é devida ao algoritmo não poder computar variáveis com uma dimensão maior que 3 variáveis. Outra das limitações é que o *toobox* não

pode trabalhar especificamente com trens de pulsos.

Na pesquisa de Astolfi [Laura and F, 2008] os sinais foram gerados, com uma frequência de amostragem de 250 Hz, simulando conexões corticais de redes neuronais reais obtidas de EEG com 64, 2, 128 eletrodos e encaixados de tal forma a trabalhar com níveis de significância de ruído e um tamanho específico. Os dados gerados possuem um tamanho correspondente a [2500, 6750, 11250, 20000]s, sendo que o tamanho mínimo recomendado é correspondente a 190s de registro equivalente a 380 trials de 500ms cada um, e níveis de ruído de [1, 3, 5,10]; o tempo de atraso foi de $p-2$, onde p é a ordem do modelo autorregressivo, sendo este atraso variado para os diferentes testes. O modelo usado envolve cinco áreas unidas por caminhos diretos e indiretos. O modelo autorregressivo multivariado estimado usado na implementação dessa proposta usa o algoritmo *Nuttal Strand* [MARPLE, 1987], o mesmo que será usado em nossa pesquisa, por prover uma melhor estimativa nas séries temporais.

O objetivo da pesquisa ao trabalhar com dados gerados ao invés de dados reais, é poder avaliar estes três métodos: Função de transferência (DTF), Função de transferência direcionada (dDTF) e a Coerência parcial direcionada (PDC), a fim de determinar qual é o método que melhor detecta a conectividade. As conexões diretas e indiretas foram computadas para cada método. Como algumas das conclusões obtidas foram: i) o tamanho das gravações de EEG tem influência na precisão dos resultados na detecção de conectividade; ii) a variância do erro observado pelo estimador DTF foi maior do que com o dDTF e PDC, iii) o PDC se caracterizou por possuir um baixo viés ou tendência na estimativa de padrões de conectividade em comparação com os demais métodos, considerando as condições simuladas, ou seja, um nível específico de ruído e também um tamanho específico de dados, iv) tempos de atrasos distintos não afetaram significativamente os resultados de conectividade obtido pelos 3 métodos; v) apesar de métodos não lineares como: informação mútua, correlação não linear e sincronização generalizada serem mais aptos para o estudo de sinais de EEG por serem mais sensíveis a acoplamentos dinâmicos e interações não lineares sobre muitas frequências, medidas lineares como DTF, PDC, dDTF oferecem uma rápida e simples caracterização da conectividade.

Estudando regiões de ativação no cérebro e fluxo de informação entre estas regiões, Baccalá e Sameshima [JOÃO et al., 2007] trabalham com dados provenientes de fMRI, cujo objetivo era estudar 3 regiões do cérebro, identificando áreas de ativação quando uma tarefa era apresentada, avaliando a conectividade efetiva destas áreas. Foi usado para isso o PDC que foi aplicado para ajudar na distinção de conectividade estimulada/induzida, junto com o bootstrapping multivariado, este último foi aplicado devido ao número de participantes ser reduzido, portanto a distribuição de quantis não é adequado. A diferença da pesquisa desta dissertação de mestrado está baseada em registros de atividade espontânea onde não existem estímulos externos associados aos registros. Neste experimento de Baccalá e Sameshima foi introduzido um estímulo externo, também chamado de variável exógena, que seria a tarefa a desenvolver. O experimento consistia em

apresentar uma oração completa com uma palavra perdida, esta informação era visualizada pelos seis participantes, a palavra perdida era revelada depois de um intervalo pequeno de tempo de 700ms, permitindo que os participantes processassem a informação. Posteriormente perguntou-se aos participantes se a palavra perdida se encaixava na frase, eles respondiam usando um botão de sim ou não. Um total de oito frases foi apresentado, durante o experimento. Através de periodogramas nas regiões de interesse podiam se identificar 3 energias significativas que indicavam a existência de conectividade nestas áreas. Como etapas de pré-processamento dos dados foi aplicado um kernel gaussiano, as séries foram normalizadas com uma média zero e uma variância de 1. O interessante desta pesquisa é observar como o fluxo de informação se desloca através das regiões estudadas à medida que é desenvolvida a tarefa específica.

Outro trabalho interessante onde é usado o PDC na detecção de conectividade está na pesquisa de [BJORN et al., 2005] que fizeram uma análise ilustrando o problema de inferir causalidade utilizando a coerência parcial direcionada sem considerar nenhum tipo de nível de significância na detecção de conectividade. Indicam que o problema é maior quando a ordem do modelo é alta, enfatizando a importância de que se a ordem do modelo é alta o tamanho da amostra também deve ser grande e vice-versa. Desenvolveram um teste para validar o nível de significância para sistemas não lineares, e mostram que o nível de significância depende da frequência analisada. Onde existem picos o nível de significância é maior, mas só as influências causais são reveladas, baseadas no nível de significância do PDC. Outro experimento realizado foi estudar registros de pacientes com tremores. Os tremores são doenças neurológicas, e estão registrados numa faixa de 4 a 10 Hz. Os tremores na atividade cortical podem ser observados através de uma análise de coerência. Os registros foram de 250s, com uma frequência de amostragem de 1000 Hz. Para remover os artefatos, os registros EEG (eletroencefalograma) foram filtrados usando um filtro de passa baixa entre 0.5 e 200Hz, e nos registros EMG (magnetoencefalograma) utilizou-se o mesmo filtro mas numa frequência de 30 a 200Hz. No espectro dos dados EMG observou-se um pico na frequência de 5Hz, sendo que o PDC detectou direção da esquerda para a direita do EMG ao EEG, e da direita do EEG e a esquerda do EMG em todas as demais frequências o PDC é não significativo. Mas desde que os registros do EEG sejam mutuamente influenciados por ambos num intervalo de frequências, os resultados são considerados estatisticamente significantes.

[LUIZ and KOICHI, 2001] fazem uma comparativa entre o PDC e DC em diferentes cenários e as conclusões obtidas indicaram que o PDC é mais robusto na detecção de conectividade do que o DC. Semelhantes conclusões foram obtidas por Astolfi [Laura and F, 2008]. Também realizaram testes aplicando o PDC, em registros de ondas de sono, cujo registro analisado teve uma duração de 2s. Uma das conclusões obtidas é que a significância estatística da interação nos sinais depende do tamanho da amostra e também da quantidade de séries analisadas simultaneamente. Anos atrás os mesmos pesquisadores aplicando o PDC tinham realizado testes em registros de trens de pulsos mostrando que para diferentes tamanhos de segmento do sinal, o fluxo de

informação continuava consistente. O tamanho dos segmentos analisados foi de 1s, 2s e 4s.

Outro trabalho interessante e que tem grande relação com a nossa pesquisa, é o trabalho de [LUIS et al., 2007], cujo objetivo é mapear a estrutura de rede de neurônios, através das conexões entre eles e identificar como a informação é processada através da atividade neural. A diferença das pesquisas anteriormente mencionadas, cujos registros são obtidos de fMRI, BOLD e EEG, ele usa a matriz de microeletrodos para obter registros de potencial de ação de células corticais de embriões de rato in vitro . A diferença com a nossa proposta, é que ele usou a informação mútua que é uma medida estatística que provê informação de dependência estatística entre duas variáveis, mas que não é capaz de identificar o sentido desta dependência, como método para identificar a conectividade. A informação mútua em comparação com o PDC, não é capaz de identificar o sentido da interação. Os resultados obtidos indicaram que redes corticais in-vitro demonstraram ser fracamente dissortativas. As redes possuem um alto nível de agrupamento, apresentando características do pequeno mundo. Tais características do pequeno mundo estão em concordância com os resultados obtidos nos estudos do C. Elengan e de Shan Shan Yu [SHAN YU et al., 2008]. Como trabalho futuro propõe investigar as mudanças destas redes ao longo do tempo e sobre estimulações eletrofisiológicas. Já os resultados de Gerhad [Felipe Gerhad, 2011] indicam que redes de neurônios possuem uma estrutura de redes livres de escala, mas que apresentam uma pequena mas significativa estrutura do pequeno mundo.

Outro trabalho que vale a pena mencionar e que se aproxima mais com a nossa pesquisa é a proposta de [PURPURA and HEMANT, 2008]. Neste trabalho foram usados registros de ratos wistar com 18 dias de vida registrados por uma matriz de microeletrodos de 60 canais. O método usado foi a causalidade de Granger, o que difere de nossa proposta. Os experimentos foram realizados sobre 60 culturas com mais de 30 dias in vitro. O objetivo dessa proposta é determinar mudanças na taxa de spikes antes e depois de colocar tetanus. Usando as causalidades pretendiam obter mudanças na conectividade efetiva induzido pelo tetanus, e realizaram-se 10 testes por cada canal da MEA. Como uma etapa de pré-processamento foi usado um filtro de passa alta para reduzir a alta resolução, pois a frequência de amostragem era de 25kHz e colocando esse filtro a frequência de amostragem passou para 1kHz. Como conclusões obtidas indicam que em mais de 95 percento dos canais de teste correspondem a uma mudança de direção quando se compara a taxa de disparo e os gráficos de causalidade de respostas ao estímulos. Também enfatiza a ligação que existe entre os padrões de atividade espontânea e atividade induzida, apesar de que na atividade induzida exista maior quantidade de eventos de burst do que na atividade espontânea. O método não só se mostrou sensível ao detectar plasticidade, mas também ao prover informação sobre conectividade estrutural.

Experimentos

Neste capítulo será descrito o trabalho desenvolvido para a dissertação de mestrado, cujos objetivos foram apresentados no capítulo 1. Serão realizados dois experimentos que serão detalhados posteriormente, usando-se os registros de atividade espontânea de cultura de neurônios *in vitro* em MEA. O objetivo é verificar se através dos conceitos introduzidos nos capítulos anteriores e aplicando-se o método proposto é possível observar relações causais entre os sinais neurais obtidos através da MEA e que tipo de informação biológica é obtida através destes experimentos. Para a implementação do trabalho usando a metodologia proposta usou-se como ambiente de trabalho o Matlab. Também foi utilizado um toolkit para detecção do PDC. O toolkit PDC contém funções específicas para a estimação da série temporal, e detecção de causalidade. Para o cálculo das medidas estatísticas relacionadas a redes complexas, também foram usadas funções específicas já implementadas no Matlab. Desenvolveu-se um pequeno aplicativo para analisar de uma vez só os 59 canais do MEA, fazendo uso das funções próprias do PDC, como funções relacionadas a redes complexas.

6.1 Metodologia proposta

6.1.1 Obtenção do sinal MEA

Os registros de atividade espontânea foram obtidos pela Universidade de Gênova, Itália, usando embrião de rato Wistar com 18 dias de idade, usando-se o sistema MEA60 da Multichannel System com 60 eletrodos numa matriz de 8x8, excluindo os 4 eletrodos das esquinas. Cada registro contém uma duração de 20 minutos, com uma taxa de amostragem de 10kHz. O sistema

MEA60 usado para os registros de atividade espontânea apresenta uma distribuição matricial figura 6.1. Cada eletrodo corresponde a um registro de sinal de atividade espontânea. O número indica a notação da posição dentro da matriz. Os eletrodos serão chamados de nós nas descrições de redes complexas ao longo do capítulo. Nota-se na figura 6.1 que a posição de eletrodo 15 está vazia, pois a mesma é usada para controle, durante o registro.

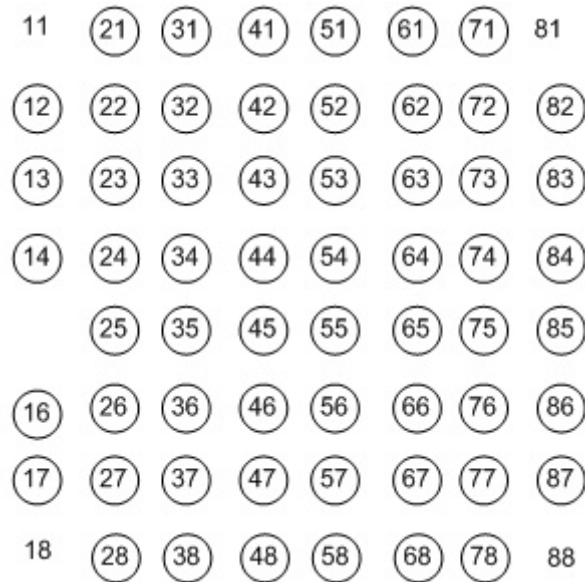


Figura 6.1: O gráfico mostra as posições de cada eletrodo no sistema MEA60

6.1.2 Pré-processamento do sinal

Nesta etapa de pré-processamento procura-se eliminar ou atenuar a quantidade de ruídos associados ao registro do sinal presente na MEA, que em sua maioria estão associados a ruídos de gravação, de instrumentação. Optou-se por aplicar um filtro no sinal. Em análise de causalidade, algumas limitações que podem interferir na análise, seria a escolha do tempo de amostragem. Se a taxa de amostragem é muito baixa, será muito difícil observar algum tipo de influência causal no sinal, porque os sistemas podem estar interagindo em escalas maiores do que a taxa de amostragem. Por outro lado se a taxa de amostragem é muito alta pode resultar, em ordens de estimação muito grande. Em vista desta dificuldade, aplica-se portanto um filtro multitapering. Posteriormente os sinais são normalizados.

A normalização consiste em subtrair as médias dos segmentos estacionários e dividi-los pelo desvio padrão. Este procedimento é recomendado em análise de série temporal, pois ajuda a reduzir a periodicidade ainda presente, sendo considerado também por [ANIL, 2010] na sua pesquisa de causalidade. A equação para normalizar o sinal é a seguinte, Equação(1).

$$z = \frac{x - \bar{x}}{S_x}$$

Equação(1).

onde S_x corresponde ao desvio padrão.

Na literatura existem alguns tipos de filtros específicos que são referenciados para o processamento de sinais biológicos, especificamente filtros usados em EEG, MEG e BOLD. Dentre alguns destes filtros podemos citar: *Filtro Wavelets*, *Filtro Multitapering* e Filtro de médias móveis. O filtro escolhido foi o *filtro multitapering*(MTM) pelas características seguintes:

- Permite controlar o grau de suavização no espectro, ajustando o tamanho da banda em cada janela;
- Reduz a variação de estimação, atenuando o sinal sem distorcê-la;
- Em comparação com outros tipos de filtros não modifica o espectro do sinal. Este é o ponto de maior importância, pois a adequada detecção do PDC está baseada no espectro;
- É muito usado em neurociência;
- O método também possui um teste estatístico (Teste F) que permite identificar a periodicidade no sinal, removendo picos não significativos e
- Também ajuda a reduzir a ordem de regressão da estimação do modelo, pois como reduz a variância também reduz a ordem. Em análise de séries temporais este aspecto é muito importante, pois se procura ter ordens menores de estimação.

O método *multitapering* foi formulado por Thomson [THOMSON, 1982] para o estudo da estimação espectral não paramétrica. No *multitapering* os dados são multiplicados por várias janelas, permitindo que as informações perdidas sejam recuperadas pelas janelas seguintes e assim sucessivamente. O *filtro multitapering* utiliza janelas ortogonais para se obter estimativas aproximadamente independentes do espectro de potência e combiná-las numa só estimativa, reduzindo a variação da estimação espectral. Quanto maior for a quantidade de *tapers* maior será a suavização mas com baixa resolução. Se a janela escolhida é grande, obtém-se melhor resolução, mas com perda de resolução no tempo. Para um adequado uso dos parâmetros se tem em consideração a seguinte equação(2) para o tamanho da banda.

$$W = (K + 1)/2T$$

Equação(2).

onde K é o número de tapers, T é o tempo expresso em segundos. Por exemplo, se $T=0.1$ s e $K=5$, então $W=30$ Hz.

O algoritmo multitapering inclui a análise de harmônicos (O sinal harmônico é uma onda caracterizada por um certo período ou frequência), usado para determinar componentes de linha nos picos do espectro de sinais periódicos ou quase periódicos. É capaz de detectar baixas amplitudes de oscilações dos harmônicos, de uma série de tempo, inclui internamente o teste estatístico F teste para remover picos não significativos, onde a hipótese nula indica que a série de tempo é um ruído branco. Posteriormente os picos significativos são isolados no espectro do sinal, o sinal é reconstruído tendo em vista os picos significativos. Foi realizado um estudo comparativo entre a janela de *Hamming* e o método *multitapering* [Sruthi and VadiveluČn, 2012], onde o método *multitapering* teve bons resultados reduzindo o bias e a variância do sinal.

A análise em sinais neurais pode ser feita especificamente em *spikes* ou em registros de potencial de ação local (Local Field Potential, LFP). Os *spikes* e potenciais de ação são dois tipos diferentes de séries de tempo. O potencial de ação local (LFP) é um processo contínuo de atividade e consiste de uma série de variação de voltagem contínua num tempo t . Os *spikes* são pontos específicos dentro desse processo. O processo é representado pela amplitude e fase de cada frequência. Para os experimentos que detalharemos em seguida serão usados registros de potenciais de ação de atividade espontânea dos neurônios usando a MEA. As razões consideradas pelas quais se escolheu realizar o estudo de causalidade sobre o sinal bruto (potencial de ação) e não sobre os trens de *spikes* são as seguintes:

- É mais fácil modelar os sinais coletados em forma contínua em tempos discretos, usando modelos lineares do que só analisando trens de pulsos, devido ao tipo de distribuição que possuem. Os *spikes* em sua maioria apresentam uma distribuição tipo Poisson, cujo tipo de distribuição não é adequado quando se trabalha com modelos lineares, onde o ideal é uma distribuição gaussiana; e
- A atividade espontânea diferente de atividade estimulada se caracteriza por apresentar menor quantidade de *bursts* e *spikes* por bin, por estar num estado de repouso. Considerou-se mais interessante analisar o sinal em sua totalidade por resultar ser a maior parte do registro comparando com só obter *spikes* ou *bursts*.

6.1.3 Estimar a ordem do modelo

O critério escolhido que ajudará a determinar a ordem do modelo será o critério Akaike Information Criteria (AIC). A ordem do modelo determinará a quantidade dos coeficientes autorregressivos para cada série modelada. O AIC é uma medida de qualidade de ajuste que estima o valor esperado. Este critério penaliza o modelo pela quantidade de parâmetros.

6.1.4 Verificação dos resíduos

Nesta sub-etapa, para verificar se os resíduos estão livres de correlação usar-se-á o teste de Portmanteau nos modelos estimados. Outro teste que será aplicado para verificar a normalidade das séries é o teste de Jarque Bera, que se baseia nos resíduos do método dos mínimos quadrados. Para sua realização o teste necessita dos cálculos da assimetria e da curtose. Em uma distribuição normal, o valor da assimetria é zero e o valor da curtose é 3. A equação(3) do valor do teste de Jarque Bera é a seguinte.

$$JB = n[(S^2/6) + (C - 3)^2/24]$$

Equação(3).

onde S representa a assimetria e C a curtose. Suas equações são as seguintes:

$$\hat{S} = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^3}{N}$$

Equação(4).

$$C = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^4}{N}$$

Equação(5).

O valor JB é comparado com um limiar estabelecido e caso JB for maior a série é considerada com resíduos.

6.1.5 Estimar o PDC

A estimação do PDC será feita de forma bivariada, ou seja, agrupando duas séries ou observações e realizando todas as combinações possíveis para que todos os eletrodos sejam avaliados com todos. Pela quantidade de combinações possíveis que se pode obter com 59 combinações de eletrodos, tornar-se-ia computacionalmente complexo se a análise considerasse os 59 eletrodos de forma simultânea. A estimação aplicando o PDC, pode ser resumida nos seguintes passos:

1. Os dados do par bivariado serão representados como uma matriz 2x2 chamada também matriz de conectividade, onde cada coluna corresponde aos dados de um eletrodo numa determinada posição dentro da MEA.
2. A diagonal na matriz de conectividade corresponde ao espectro do sinal e a antidiagonal corresponde aos valores de causalidade do par bivariado. O valor 1 na antidiagonal indica conectividade nesse par de eletrodos.

3. Posteriormente a partir da matriz de causalidade ou conectividade obter-se-á a matriz de adjacência, sendo seu tamanho de 64x64, pois serão inclusos os eletrodos 15,11,18,71 e 78 cujo valor dentro da matriz será de zero. Tal procedimento será feito para não perder a simetria da matriz. Cada matriz de adjacência é correspondente a um determinado dia in vitro(DIV). Como serão avaliados os dias 25 e 46 in vitro(DIV) obter-se-ão duas matrizes de adjacência correspondentes a cada dia in vitro; e
4. Representar-se-á graficamente a matriz de adjacência.

A figura 6.2 representa graficamente o processo descrito anteriormente.

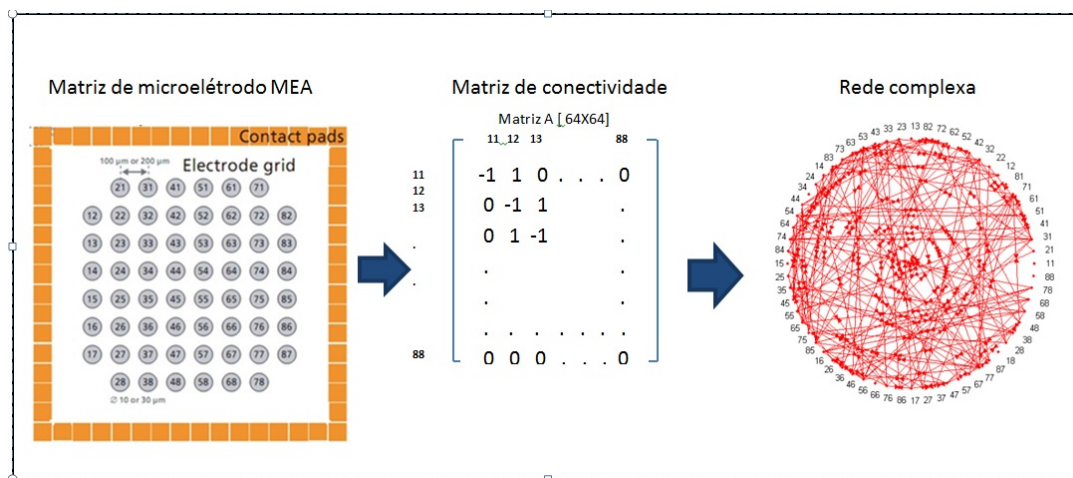


Figura 6.2: Gráfico onde se mostra as etapas da análise dos dados para a detecção de causalidade

Supondo que fosse escolhido o eletrodo na posição 16 e o eletrodo na posição 12. Os dados do eletrodo 16 correspondem à coluna 6 da matriz de conectividade e os dados do eletrodo 12 correspondem à coluna 2 da matriz de conectividade. A diagonal da matriz de conectividade representa o espectro do sinal. O valor 1 na antidiagonal indica que existe conectividade do eletrodo 16 até o eletrodo 12 e o valor 0 da antidiagonal indica que não existe conectividade do eletrodo 12 até o eletrodo 16.

A figura 6.3 representa graficamente o exemplo do item 1 no processo descrito anteriormente para a estimação do PDC.

6.1.6 Analisar a matriz de conectividade através de medidas estatísticas

Analisar a matriz de conectividade através de medidas estatísticas, permite entender as características topológicas das redes estimadas. As redes correspondem aos 25 e 46 dias in vitro, sendo estimadas a partir das matrizes de conectividade, tais matrizes serão obtidas das combinações bivariadas dos eletrodos da MEA. Posteriormente procederemos juntar tais matrizes

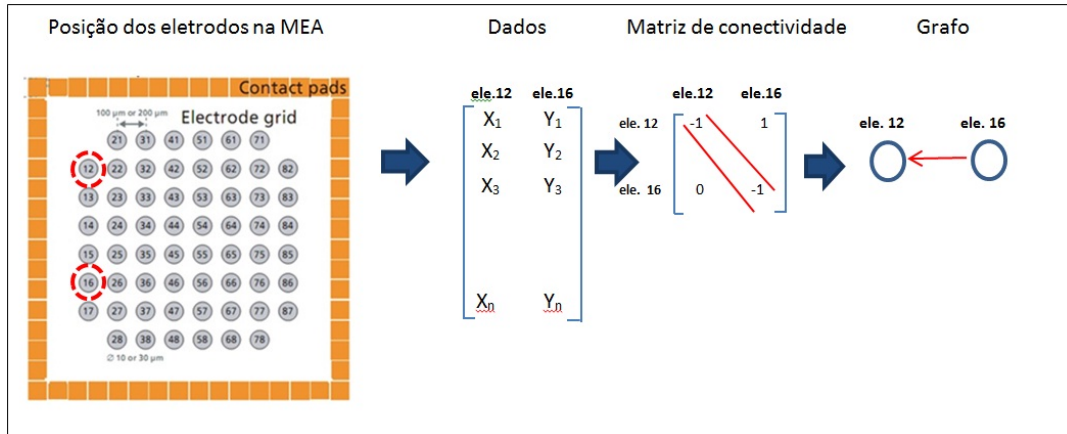


Figura 6.3: O gráfico representa o processo de estimação do PDC. 1) Cada eletrodo tem uma posição específica na MEA; 2) Agrupa-se os eletrodos por par bivariado até se analisar todas as combinações possíveis; 3) Obtém-se uma matriz de conectividade de 2x2 onde a diagonal representa o espectro do sinal e a anti-diagonal representa a causalidade no par bivariado. O valor 1 representa conectividade nesses eletrodos e o valor 0 representa não conectividade e 4) Através de um grafo se representa a matriz de conectividade.

de tais combinações numa só matriz, que denominaremos matriz de adjacência. A matriz de adjacência será obtida para cada dia in vitro, sendo esta uma matriz binária direcionada sem peso.

Dentre as medidas estatísticas para caracterizar a rede, que foram introduzidas no capítulo 3, só utilizaremos as seguintes:

- Grau de conectividade de entrada (K_{in});
- Grau de conectividade de saída (K_{out});
- Conectividade média e total (K);
- Ciclo de 3(3-CICLOS);
- Coeficiente de Clustering (C);
- Betweenness (B); e
- Densidade da rede (D).

Observa-se que no Apêndice 1 é apresentada uma explicação sobre essas medidas referente os tipos de redes complexas existentes.

Utilizando o toolbox do matlab chamado Brain Connectivity obteremos essas medidas, que são medidas referentes a distâncias, ciclos e densidade de conexões. São medidas básicas

porém permitem a interpretação das redes obtidas. Tais medidas são insuficientes para poder identificá-las como tipo específico de redes, mas podem nos dar uma aproximação de que tipo de rede representam.

Na figura 6.4 pode se observar um diagrama de fluxo contendo as atividades que serão feitas para a identificação de causalidade e posteriormente a caracterização das redes.

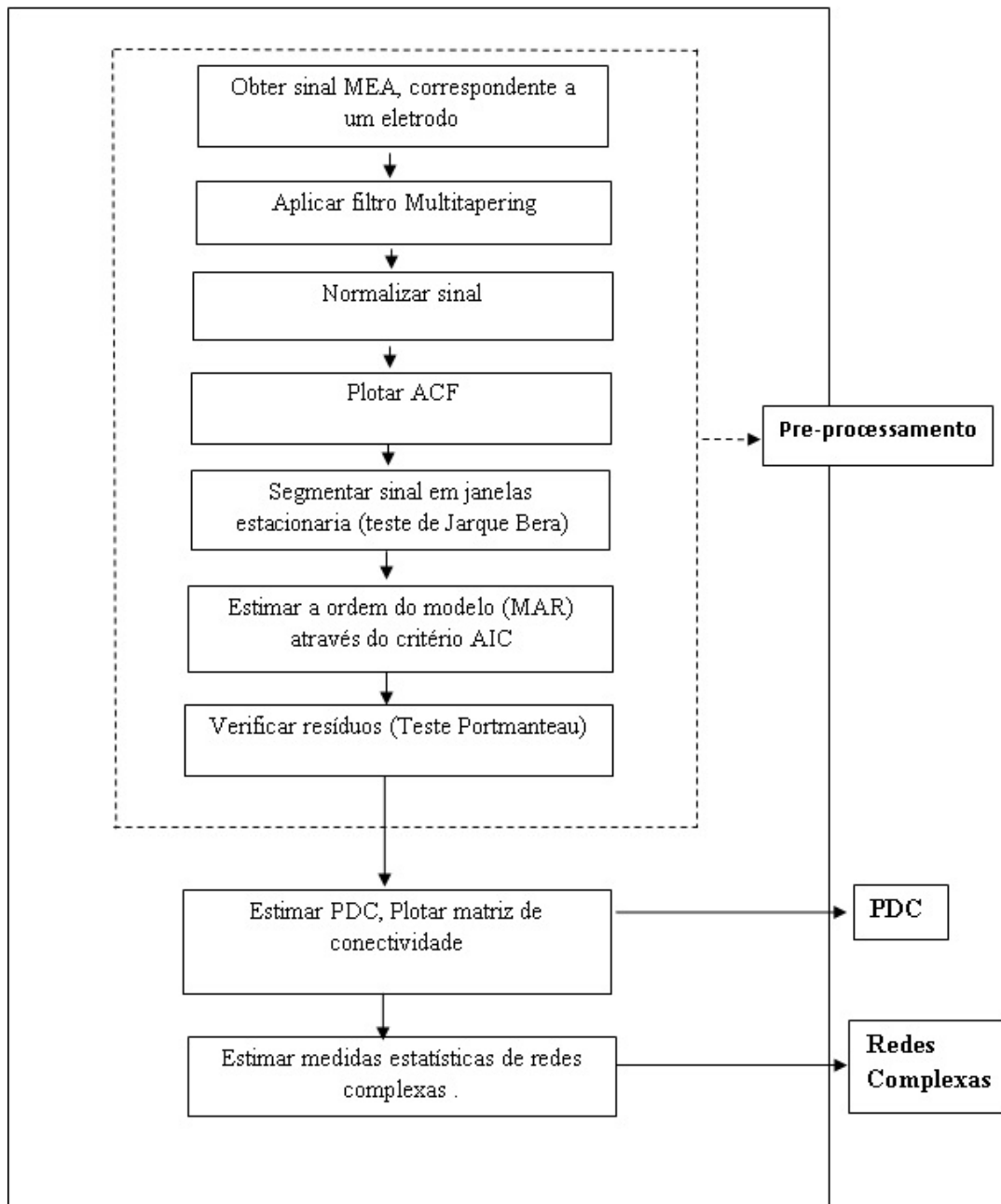


Figura 6.4: Diagrama de fluxo indicando as etapas a serem consideradas na identificação de conectividade.

6.2 Experimentos

6.2.1 Experimento 1

O primeiro experimento tem como objetivo observar a evolução da dinâmica de interação no 25 DIV e no 46 DIV, conhecer que novas conexões foram estabelecidas durante esse período de tempo, que conexões se perderam, e que conexões se mantiveram, assim como também o estado da rede em geral, para isso aplicaremos os conceitos de redes complexas. Escolheu-se um trecho de 500 pontos de dados correspondente ao primeiro registro de 1 segundo, para ambos: 25 DIV e 46 DIV. Para remover ou atenuar as tendências temporais nos dados que podem provocar correlação, assim como para se verificar a existência de correlação entre os dados, são construídos gráficos da função de autocorrelação. O gráfico da função de autocorrelação nos dá uma idéia de qual é o comportamento de cada registro de atividade. Procura-se que a quantidade de resíduos encontrados na série de dados estudada seja nula ou o menor possível nos diferentes tempos de atraso. O tamanho do lag considerado no cálculo dos resíduos deve ser igual a zero ou encontrando-se numa faixa entre $[-2n^{-1/2}, 2n^{1/2}]$, sendo que n é o número de observações.

Na figura 6.5 pode se observar a função de autocorrelação correspondente ao eletrodo 12. O eixo horizontal corresponde ao tempo do atraso e o eixo vertical corresponde ao valor da função de autocorrelação. O gráfico indica que a série de tempo possui um decaimento devagar até chegar em zero, isso é um claro exemplo de alta correlação existente na série. As duas linhas horizontais em torno do eixo horizontal indicam o intervalo de confiança.

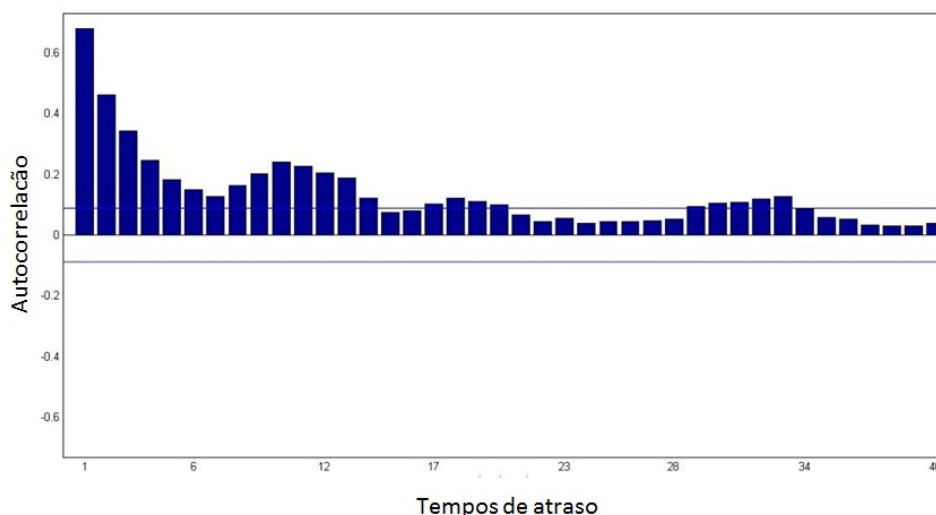


Figura 6.5: Função de autocorrelação correspondente ao eletrodo 12 no 46 DIV.

O gráfico 6.6 corresponde à função de autocorrelação correspondente ao eletrodo 13. Pode-se observar um comportamento quase parecido com a função do eletrodo 12, a diferença é que a função do eletrodo 13 tem um decaimento mais próximo de convergir a zero do que a anterior.

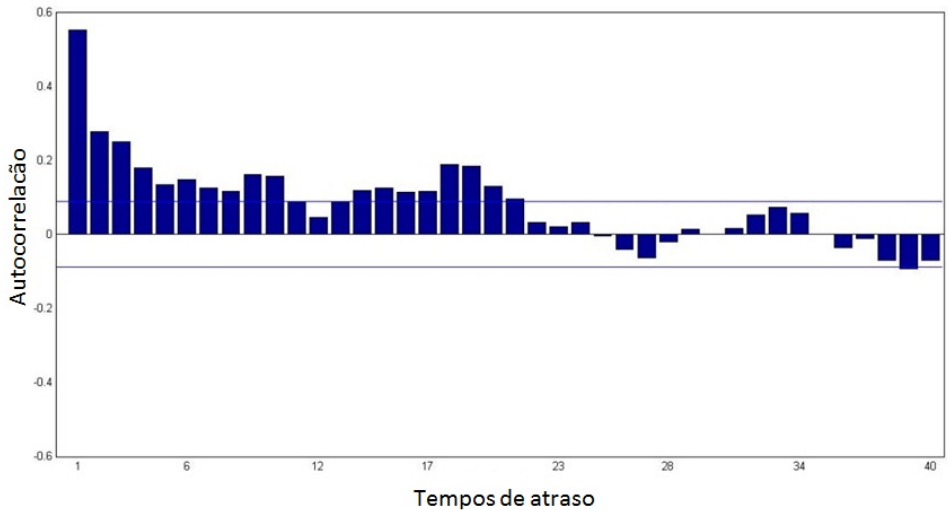


Figura 6.6: Função de autocorrelação correspondente ao eletrodo 13 no 46 DIV.

Uma vez que o modelo foi estimado, verificaremos se o modelo foi bem ajustado aplicando para isso o teste de Portmanteau. Graficamente também é possível observar os resíduos da estimação. No gráfico da figura 6.7 as linhas horizontais representam os limites dos intervalos de confiança. Uma forma de se observar que os resíduos sejam não correlacionados, é verificar se os resíduos se encontram dentro do intervalo de confiança.

O gráfico da figura 6.7 mostra que para quase todos os tempos de atraso com exceção do tempo de atraso 9 e 13, os resíduos mostram ser não correlacionados.

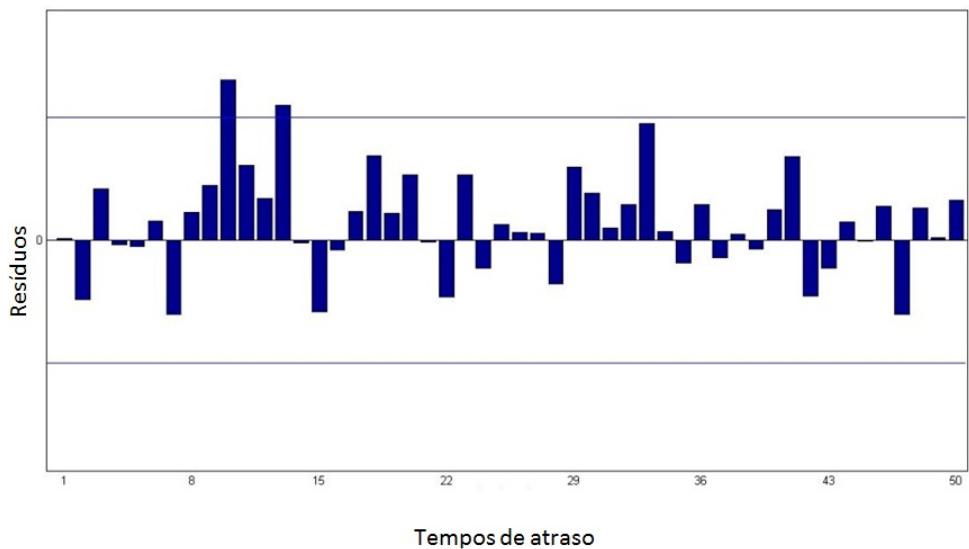


Figura 6.7: Gráfico dos resíduos correspondente ao eletrodo 12 no 46 DIV, após a estimação do modelo.

O mesmo pode ser observado no gráfico dos resíduos correspondente ao eletrodo 13 na figura 6.8, onde se mostra uma desc correlação quase em todos os tempos de atraso.

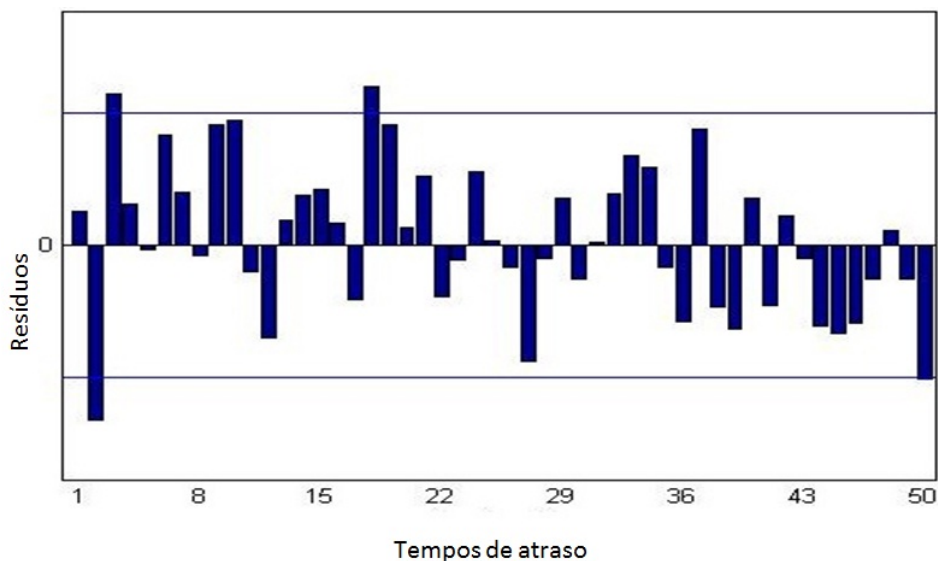


Figura 6.8: Gráfico dos resíduos correspondente ao eletrodo 13 no 46 DIV, após a estimação do modelo.

Após a estimação do modelo e verificação dos resíduos, são obtidas as conexões diretas e intermediárias ou indiretas aplicando o PDC no par bivariado que estamos analisando. Uma das características do PDC com respeito a outros métodos é a capacidade de poder separar esses tipos de conexões. Chama-se conexão direta aquela conexão na qual o eletrodo origem está conectado diretamente ao eletrodo destino. Uma conexão intermediária ou indireta é aquela na qual o eletrodo origem está conectado ao eletrodo destino através de outros nós, ou seja, não existe um caminho direto.

Na tabela 6.1 são mostradas as médias dos resultados estatísticos obtidos das conexões do 25 DIV e 46 DIV. A primeira coluna da tabela indica os dias in vitro analisados; a segunda coluna indica o tamanho do segmento analisado, a terceira coluna indica o número médio de conexões; a quarta, o número médio de clustering; a quinta coluna indica o número médio de *betweenness*; a sexta coluna indica o número médio de ciclos de 3; e a sétima coluna indica a densidade das redes.

Nos resultados obtidos observa-se que embora a rede no 25 DIV tenha menor quantidade de conexões que a rede no 46 DIV, a rede no 25 DIV desenvolveu mais conexões com os vizinhos próximos do que a rede no 46 DIV.

Médias dos resultados estatísticos das conexões no 25 e 46 DIV						
DIV	Tamanho do segmento	K_t	C	B	3-ciclos	Densidade
25 DIV	500	8.00	0.08	93.18	3131.2	0.063
46 DIV	500	8.06	0.14	78.18	122.75	0.08

Tabela 6.1: Tabela contendo as médias dos resultados estatísticos das medidas de redes complexas.

Na figura 6.9 observa-se as conexões diretas correspondentes ao 25 DIV, onde as linhas e colunas representam os eletrodos da MEA e os pontos indicam as conexões diretas obtidas para o par de eletrodos respectivo.

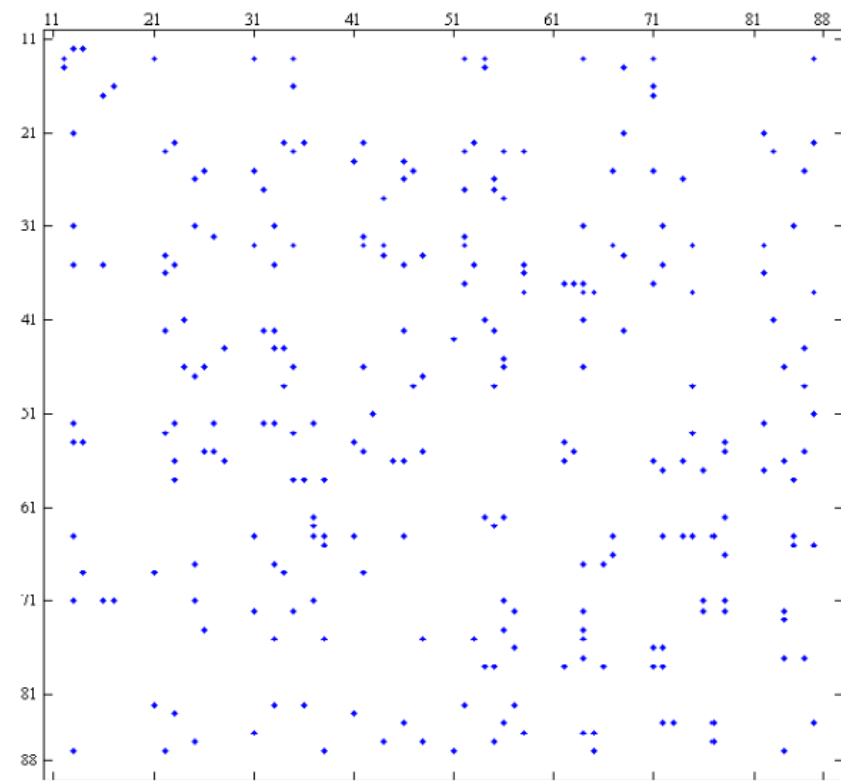


Figura 6.9: Conexões diretas totais detectadas no 25 DIV.

Na figura 6.10 observa-se as conexões diretas correspondentes ao 46 DIV.

Na figura 6.11 se observa tanto as conexões diretas e as conexões indiretas que tiveram em comum em ambas as redes. A figura 6.11A representa as conexões diretas em comum entre o 25 DIV e o 46 DIV. A figura 6.11B representa as conexões indiretas em comum entre o 25 DIV e o 46 DIV. Pode-se observar também que existem mais conexões indiretas em comum que conexões diretas. O fato de uma rede possuir uma grande quantidade de conexões indiretas, é um indicativo de que a rede está altamente conectada. O fato de ter encontrado mais quantidade de caminhos indiretos do que diretos, indica que a rede prefere estabelecer conexões com outros nós que podem estar mais distantes através de caminhos indiretos do que conexões diretas.

1. Analisando as conexões das redes obtidas no 25 DIV.

Uma vez obtidas as relações causais detectadas no 25 DIV, para um melhor entendimento da rede gerada será feita uma análise dos resultados obtidos tendo em vista as medidas de redes complexas. Conforme observado anteriormente, uma explanação sobre os tipos de redes

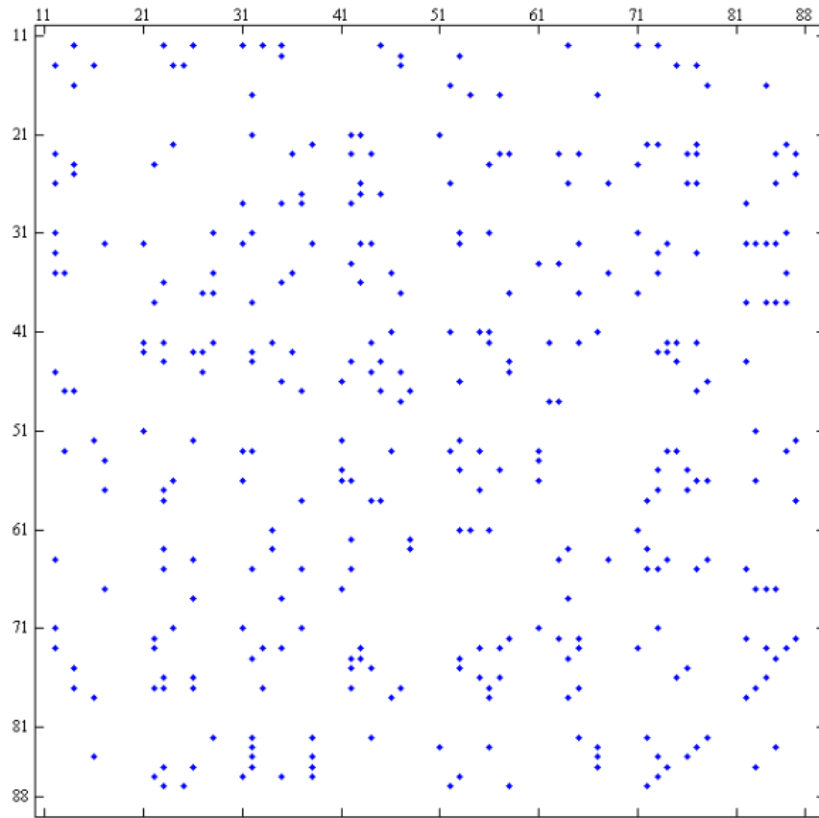


Figura 6.10: Conexões diretas totais detectadas no 46 DIV

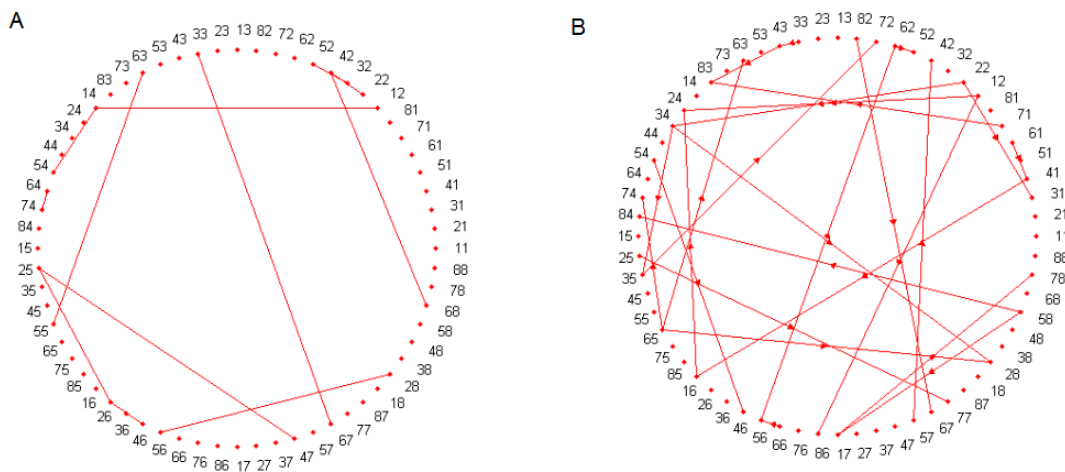


Figura 6.11: Na figura A se mostra as conexões diretas em comum entre 25 e 46 DIV. Na figura B mostra-se as conexões indiretas em comum entre 25 e 46 DIV.

complexas enquanto às propriedades estatísticas analisadas a seguir é apresentada no Apêndice 1.

Na tabela 6.2 se detalha o número de conexões detectadas nos dados do 25 DIV. A primeira coluna corresponde ao eletrodo que neste caso está referenciado pela sua posição na matriz

8x8; a segunda coluna mostra o grau de entrada do eletrodo (K_{in}); a terceira coluna o grau de saída (K_{out}); a quarta coluna o coeficiente de clustering (C); a quinta coluna o número de ciclos (3-ciclos); e a última coluna a $betweenness(B)$. A tabela mostra valor zero nas posições 11,18,81,88 e 15 porque estas posições não foram analisadas.

Na tabela 6.2 observa-se que a quantidade de conexões detectadas foi de 258 conexões. A densidade da rede é de 0.06, o número de ciclos também é baixo quase em todos os eletrodos analisados. A presença de ciclos indica caminhos alternativos que são criados na rede, essa medida indica que a rede se manterá conectada por mais tempo. O fato de ter se encontrado um número tão baixo de ciclos em toda a rede é um indicativo de que a rede não está altamente conectada. O eletrodo que obteve a maior quantidade de ciclos foi o eletrodo 64, esse mesmo eletrodo também possui maior conectividade em toda a rede, comparada com os demais eletrodos. Os eletrodos menos conectados foram os eletrodos 45, 43 e 73, com apenas duas conexões.

A densidade da rede também é outra medida de robustez e eficiência da rede. O fato do valor da densidade ser tão baixo, serve para corroborar que as conexões na rede no 25 DIV são conexões fracas e curtas. Outro aspecto importante que vale a pena mencionar é que mesmo tendo poucas conexões entre as redes pode se observar como só alguns eletrodos por exemplo o eletrodo 64,71 e 56 são os que têm mais conexões dentro da rede.

Procederemos a análise das conexões diretas obtidas no 46 DIV, considerando as medidas estatísticas de redes complexas.

A tabela 6.3, mostra as medidas estatísticas da rede da mesma forma que a tabela 6.2. A rede teve um total de 346 conexões. Pode se observar que o eletrodo que teve o maior grau de conexões foi o eletrodo 63 com um total de 16 conexões. Os eletrodos que tiveram o menor grau de conectividade foram os eletrodos 77,85,66 e 55 com um total de 1 conexão. O eletrodo 63 obteve o maior número de conexões de 3 ciclos, essa medida indica a capacidade que esse eletrodo teve de formar conexões de 3 nós com vizinhos mais próximos, tendo em vista que esse mesmo eletrodo também teve o maior grau de conectividade, poderia ser considerado como um eletrodo hub na rede, ou seja, através dele muitas conexões são estabelecidas. O fato da rede possuir um certa quantidade de hubs na rede é um indicativo claro de que a rede não tem um comportamento totalmente aleatório, mas organizado. A densidade da rede foi de 0.085, em redes altamente conectadas este valor costuma ser bem alto, pois tem a ver com a eficiência nas comunicações da rede.

6.2.2 Experimento2

Para este segundo experimento analisaremos os dados correspondentes ao 46 DIV em três trechos diferentes de tempo. A análise do primeiro trecho foi feito no primeiro segundo de registro (experimento 1), agora seguindo o mesmo procedimento escolhendo um trecho de 500 pontos após dois segundos e 120 segundos de registro.

Medidas estatísticas-Cultura 371-25											
Nó	K_{in}	K_{out}	C	3 ciclos	B	Nó	K_{in}	K_{out}	C	3 ciclos	B
11	0	0	0	0.00	0.00	51	2	2	0	0.00	112.00
12	2	2	0	0.00	18.87	52	7	7	168	0.10	198.75
13	9	9	288	0.03	445.32	53	3	3	0	0.00	13.50
14	3	3	0	0.00	26.17	54	5	5	80	0.10	114.54
15	0	0	0	0.00	0.00	55	7	7	168	0.05	188.25
16	3	3	24	0.33	24.43	56	8	8	224	0.04	316.44
17	2	2	8	1.00	0.00	57	3	3	24	0.33	22.72
18	0	0	0	0.00	0.00	58	5	5	80	0.10	63.84
21	3	3	0	0.00	41.46	61	0	0	0	0.00	0.00
22	6	6	0	0.00	180.48	62	4	4	48	0.17	40.48
23	2	2	120	0.07	173.12	63	2	2	0	0.00	5.86
24	2	2	0	0.00	6.97	64	12	12	528	0.06	465.58
25	6	6	0	0.00	136.32	65	3	3	24	0.33	8.53
26	4	4	0	0.00	46.26	66	2	2	0	0.00	5.07
27	3	3	24	0.33	19.11	67	4	4	0	0.00	71.01
28	2	2	0	0.00	21.25	68	4	4	0	0.00	67.33
31	6	6	120	0.20	98.78	71	8	8	224	0.04	296.56
32	3	3	24	0.33	8.11	72	7	7	168	0.10	190.25
33	8	8	224	0.04	221.12	73	1	1	0	0.00	0.00
34	4	4	0	0.00	74.90	74	3	3	0	0.00	25.92
35	8	8	224	0.04	224.94	75	5	5	80	0.10	102.70
36	3	3	0	0.00	20.37	76	3	3	24	0.33	14.91
37	5	5	0	0.00	121.80	77	3	3	0	0.00	47.08
38	5	5	80	0.20	76.20	78	6	6	120	0.07	154.43
41	4	4	0	0.00	76.22	81	0	0	0	0.00	0.00
42	6	6	0	0.00	190.30	82	5	5	80	0.10	82.70
43	1	1	0	0.00	0.00	83	2	2	0	0.00	11.28
44	4	4	0	0.00	72.35	84	6	6	120	0.07	235.02
45	1	1	0	0.00	0.00	85	4	4	48	0.17	42.94
46	7	7	168	0.05	230.69	86	5	5	80	0.10	69.58
47	2	2	0	0.00	6.52	87	6	6	120	0.07	340.96
48	5	5	80	0.10	93.64	88	0	0	0	0.00	0.00

Tabela 6.2: Tabela contendo medidas estatísticas de redes complexas correspondente à cultura 371 no 25 DIV.

Considerando que são muitos os eletrodos a serem analisados, realizaremos essa análise só no eletrodo 12, considerando as conexões referentes a esse eletrodo. Posteriormente se mostrará todas as relações de causalidade detectadas nesse intervalo de tempo. O objetivo deste segundo experimento é de verificar se as conexões diretas ou indiretas estabelecidas no primeiro segundo de registro persistem ao longo do tempo.

- Análise do eletrodo 12 no intervalo de tempo após um segundo do início do registro no 46 DIV.

Medidas estatísticas-Cultura 371-46												
Nó	K_{in}	K_{out}	C	3 ciclos	B		Nó	K_{in}	K_{out}	C	3 ciclos	B
11	0	0	0	0.00	0.00		51	10	10	360	0.18	136.44
12	8	8	224	0.11	106.61		52	6	6	120	0.07	117.12
13	5	5	80	0.20	53.88		53	8	8	224	0.11	118.83
14	9	9	288	0.08	253.40		54	5	5	0	0.00	143.95
15	0	0	0	0.00	0.00		55	2	2	0	0.00	5.95
16	6	6	120	0.33	33.45		56	5	5	80	0.30	26.10
17	5	5	80	0.40	41.93		57	5	5	80	0.10	66.22
18	0	0	0	0.00	0.00		58	7	7	0	0.00	102.66
21	3	3	24	0.67	3.33		61	11	11	440	0.16	204.17
22	9	9	288	0.06	180.03		62	3	3	24	0.33	3.75
23	5	5	80	0.10	36.19		63	17	17	1088	0.10	615.17
24	11	11	440	0.13	178.71		64	4	4	48	0.33	12.83
25	5	5	80	0.10	44.92		65	4	4	48	0.17	16.43
26	5	5	80	0.10	52.27		66	2	2	0	0.00	4.19
27	7	7	0	0.00	148.71		67	4	4	0	0.00	47.59
28	11	11	440	0.07	244.75		68	5	5	80	0.20	52.36
31	8	8	224	0.14	117.37		71	6	6	120	0.07	79.09
32	8	8	224	0.07	173.76		72	1	1	0	0.00	0.00
33	5	5	0	0.00	89.88		73	4	4	0	0.00	21.80
34	3	3	24	0.33	22.26		74	9	9	288	0.17	104.21
35	6	6	120	0.33	49.47		75	8	8	224	0.25	109.44
36	4	4	48	0.17	43.10		76	6	6	120	0.13	72.96
37	6	6	120	0.20	55.71		77	2	2	0	0.00	6.85
38	5	5	0	0.00	82.04		78	3	3	24	0.33	12.29
41	4	4	48	0.17	28.33		81	0	0	0	0.00	0.00
42	7	7	168	0.14	125.90		82	7	7	168	0.19	69.76
43	3	3	0	0.00	8.23		83	9	9	288	0.22	125.81
44	7	7	168	0.19	108.37		84	6	6	120	0.20	52.07
45	4	4	48	0.17	62.31		85	2	2	8	1.00	0.00
46	10	10	360	0.11	196.06		86	5	5	80	0.10	69.58
47	3	3	0	0.00	17.32		87	4	4	48	0.17	41.64
48	4	4	0	0.00	32.58		88	0	0	0	0.00	0.00

Tabela 6.3: Tabela contendo medidas estatísticas de redes complexas correspondente à cultura 371 no 46 DIV.

Repetindo o mesmo procedimento que foi realizado no Experimento 1, aplicou-se os mesmos testes que foram especificados anteriormente, para este novo trecho analisado.

As primeiras dificuldades já observadas são que os parâmetros do filtro multitapering como são: tamanho de janela, taper, tamanho de banda, que tinham sido considerados no primeiro experimento e que conseguiram reduzir o ruído, permitindo que as séries não apresentem correlação nos resíduos, agora neste novo experimento o filtro não conseguiu remover toda a presença de tendência. Poderia se considerar fazer um ajuste nos parâmetros do filtro, mas como também é importante saber se o PDC consegue detectar conectividade mesmo na presença de

algum tipo de tendência ou ruído, consideramos usar os mesmos parâmetros.

Também observou-se que colocando um tamanho maior de lag, não modificou o resultado de causalidade obtido, ou seja, fazendo o teste com um tempo de atraso igual a 5 e outro com um tempo de atraso igual a 20, embora os resíduos tenham melhorado para alguns dados, os resultados de causalidade foram os mesmos.

Fazendo uma análise só para as combinações do eletrodo 12 com os demais eletrodos da MEA, mostram que os resultados de conectividade obtidos no primeiro segundo de registro, comparados aos resultados de dados obtidos após dois segundos de registro que algumas conexões diretas se perderam, mas outras se mantiveram. Provavelmente o fato de ter se perdido algumas conexões pode ser devido ao modelo autorregressivo não conseguir estimar bem a série, pois algumas séries continuavam tendo resíduos correlacionados, ou também poderíamos considerar que as conexões perdidas estão relacionadas à conectividade fraca.

A tabela 6.4 indica as conexões em comum que foram encontradas no primeiro segundo de registro e após dois segundos em que novamente se realizam a detecção de causalidade. A tabela mostra a análise só para o canal 12 dessa rede.

Tabela comparativa de conexões da cultura 371-46DIV entre 2 segmentos, espaçados 1s referentes ao canal 12						
Segmento (1s)			Segmento (2s)			
Nó/ eletrodo avaliado	Conexões diretas detectadas	Conexões indiretas detectadas	Nós com conexões diretas mantidas	Nós com conexões indiretas mantidas	Conexões diretas detectadas	Nós com conexões indiretas detectadas
12	[14,23,26,31,33, 35,45,64,71,73]	Saída: [22,26,42,72] Entrada: [13,17,55]	[33,64,73]	Saída:[22] Entrada:[17]	[33,64,73]	Saída: [22,16,82] Entrada: [17,22,25,52]

Tabela 6.4: A tabela mostra as relações do eletrodo 12 na cultura 371 no 46 DIV.

Na tabela 6.5 mostra-se as medidas estatísticas totais das conexões diretas detectadas de dados após dois segundos do início do registro em 46 DIV, escolhendo para a análise um trecho de 500 pontos nesse período de tempo. Observa-se que o número total de conexões detectadas foi de 318 conexões, com uma densidade de 0.078. Se compararmos esse valor com a densidade obtida pelas outras redes, observamos que a diferença é insignificativa. O eletrodo que conseguiu a maior quantidade de conexões foi o eletrodo 77 com um total de 26 conexões tanto de saída como de entrada, enquanto que os eletrodos menos conectados foram os eletrodos 66 e 12 com um total de duas conexões tanto de saída como de entrada. O eletrodo 66 continua sendo o menos conectado após dois segundos passados. Porém a quantidade de conexões do eletrodo 63, abaixou do primeiro segundo após os dois segundos. Tendo em vista os valores da densidade,

betwenness, podemos afirmar que a rede não está altamente conectada.

Experimento 2: Medidas estatísticas-Cultura 371-46											
Nó	K_{in}	K_{out}	C	3 ciclos	B	Nó	K_{in}	K_{out}	C	3 ciclos	B
11	0	0	0	0.00	0.00	51	3	3	0	0.00	18.04
12	3	3	24	0.33	13.07	52	4	4	48	0.50	5.42
13	1	1	0	0.00	0.00	53	8	8	224	0.14	143.14
14	4	4	48	0.33	14.04	54	7	7	168	0.10	146.52
15	0	0	0	0.00	0.00	55	7	7	168	0.10	118.45
16	5	5	80	0.10	250.29	56	9	9	288	0.17	184.08
17	6	6	120	0.20	57.16	57	2	2	0	0.00	4.79
18	0	0	0	0.00	0.00	58	6	6	120	0.07	149.92
21	2	2	0	0.00	112.00	61	6	6	120	0.13	99.67
22	3	3	0	0.00	30.71	62	4	4	48	0.17	21.64
23	10	10	360	0.11	225.05	63	6	6	120	0.33	56.19
24	4	4	48	0.50	36.66	64	6	6	120	0.07	117.99
25	3	3	24	0.33	6.13	65	8	8	224	0.18	115.75
26	5	5	10	0.00	64.37	66	1	1	0	0.00	0.00
27	5	5	0	0.00	71.78	67	3	3	24	0.33	6.13
28	4	4	48	0.17	38.40	68	4	4	48	0.17	24.57
31	9	9	288	0.17	193.34	71	10	10	360	0.07	322.93
32	8	8	224	0.21	99.44	72	5	5	80	0.10	67.05
33	6	6	120	0.13	78.44	73	6	6	120	0.13	74.32
34	0	0	0	0.00	0.00	74	8	8	224	0.14	129.77
35	5	5	0	0.00	102.66	75	5	5	80	0.10	40.80
36	3	3	0	0.00	18.71	76	6	6	0	0.00	88.35
37	4	4	0	0.00	33.27	77	13	13	624	0.12	477.96
38	4	4	0	0.00	54.13	78	4	4	48	0.17	29.47
41	4	4	48	0.33	9.03	81	0	0	0	0.00	0.00
42	6	6	120	0.07	88.21	82	7	7	168	0.10	102.84
43	5	5	80	0.10	58.72	83	7	7	168	0.05	167.43
44	6	6	120	0.13	77.34	84	5	5	0	0.00	69.43
45	8	8	224	0.07	200.14	85	7	7	168	0.14	131.47
46	6	6	120	0.07	111.72	86	4	4	48	0.17	33.79
47	7	7	168	0.10	153.53	87	5	5	80	0.10	85.69
48	6	6	120	0.20	76.03	88	0	0	0	0.00	0.00

Tabela 6.5: Tabela contendo medidas estatísticas de redes complexas correspondente à cultura 371 no 46 DIV após 2 segundos de registro.

- Análise do trecho de 1000 pontos após 120 segundos de início do registro.

Na tabela 6.6 observa-se que o total de conexões nesta rede foi de 386 conexões. O eletrodo que teve o maior número de conexões foi o eletrodo 84 com um total de 15 conexões, sendo que este mesmo eletrodo teve mais conexões diretas. A densidade da rede foi de 0.1, não sendo

significativamente superior às outras redes analisadas até agora. Na tabela podem-se observar os dados citados anteriormente.

Experimento 2: Medidas estatísticas-Cultura 371-46												
Nó	K_{in}	K_{out}	C	3 ciclos	B		Nó	K_{in}	K_{out}	C	3 ciclos	B
11	0	0	0	0.00	0.00		51	5	5	80	0.10	30.14
12	3	3	24	0.33	5.96		52	5	5	80	0.10	30.14
13	12	12	528	0.15	160.63		53	6	6	120	0.20	41.34
14	7	7	168	0.14	55.20		54	3	3	0	0.00	11.15
15	0	0	0	0.00	0.00		55	5	5	80	0.30	14.14
16	3	3	0	0.00	17.25		56	4	4	48	0.33	12.03
17	6	6	0	0.00	63.18		57	7	7	168	0.05	8.86
18	0	0	0	0.00	0.00		58	5	5	80	0.20	33.18
21	8	8	224	0.14	68.11		61	11	11	440	0.07	200.77
22	8	8	224	0.04	147.52		62	6	6	120	0.13	52.95
23	11	11	440	0.11	168.10		63	8	8	224	0.04	214.23
24	7	7	168	0.05	78.32		64	12	12	528	0.14	197.70
25	6	6	120	0.07	47.58		65	10	10	360	0.11	145.96
26	8	8	224	0.18	77.64		66	6	6	120	0.20	39.85
27	4	4	48	0.17	12.62		67	7	7	168	0.05	63.02
28	7	7	168	0.14	58.88		68	2	2	0	0.00	6.38
31	5	5	80	0.10	24.33		71	6	6	120	0.07	38.06
32	5	5	0	0.00	42.35		72	9	9	288	0.08	113.10
33	0	0	0	0.00	0.00		73	8	8	224	0.11	92.31
34	3	3	0	0.00	8.87		74	11	11	440	0.15	157.65
35	5	5	80	0.10	60.54		75	6	6	120	0.07	53.48
36	5	5	80	0.10	23.54		76	6	6	120	0.27	53.48
37	6	6	120	0.07	57.54		77	7	7	168	0.10	79.27
38	7	7	168	0.10	68.93		78	4	4	48	0.17	32.21
41	5	5	80	0.30	15.39		81	0	0	0	0.00	0.00
42	1	1	0	0.00	0.00		82	5	5	80	0.30	28.68
43	5	5	80	0.20	18.34		83	8	8	224	0.25	113.99
44	14	14	728	0.10	289.24		84	15	15	840	0.12	113.99
45	6	6	120	0.27	22.61		85	8	8	224	0.25	111.72
46	10	10	360	0.09	157.70		86	4	4	0	0.00	23.76
47	3	3	24	0.33	2.87		87	10	10	360	0.22	136.07
48	7	7	168	0.10	7.80		88	0	0	0	0.00	0.00

Tabela 6.6: Tabela contendo medidas estatísticas de redes complexas correspondente à cultura 371 no 46 DIV após 120 segundos de registro.

6.3 Verificação e Análise dos resultados

6.3.1 Verificação

Nos dois experimentos realizados, aplicou-se 2 tipos de testes: Teste de Portmanteau e Teste de Jarque Bera. Esses testes permitem medir se os dados cumpriram com certos critérios estatísticos para que a detecção de conectividade pelo PDC possa ser realizada.

Um exemplo desses valores correspondentes aos testes aplicados podem se observar na tabela 6.7 que tem 14 colunas. A primeira coluna corresponde ao nome do par bivariado; a segunda e quarta coluna correspondem ao valor da hipótese nula do teste de normalidade para os dois eletrodos analisados. Este valor pode ser 1 ou 0, onde 0 indica normalidade e 1 indica a rejeição da hipótese nula de normalidade; a terceira e quinta coluna correspondem ao valor obtido pelos eletrodos avaliados no teste de normalidade; a sexta coluna corresponde à ordem do modelo estimado; a sétima e a décima segunda coluna correspondem ao valor do teste de Portmanteau, sendo que o valor 1 indica que se rejeita a hipótese nula de resíduos correlacionados; a oitava coluna corresponde ao tempo de atraso; a nona e décima terceira coluna correspondem ao valor do teste de Portmanteau em cada eletrodo; a décima e décima quarta coluna correspondem ao limiar do valor de aceitação do teste; Como se especificou-se anteriormente, pode se considerar válido um tempo de atraso menor ao tamanho do eletrodo avaliado. Neste caso colocamos como tempo de atraso máximo igual a cinco; a oitava coluna corresponde ao valor do teste de Portmanteau,; e a décima coluna corresponde ao limiar do valor de aceitação do teste de Portmanteau. A tabela 6.7 mostra que tiveram 9 canais que não foram bem estimados por possuir ainda resíduos correlacionados. Os campos grifados indicam que embora o tempo de atraso melhorou a estimação dos resíduos, isso não alterou ou influenciou os resultados de causalidade que foram encontrados nessa rede.

6.3.2 Análise dos resultados

Como resultados obtidos ao utilizar o método de Coerência Parcial Direcionada, verificou-se que o método é capaz de detectar conectividade neuronal nas culturas de neurônios da MEA, mesmo com sinais com presença de ruído. Também verificou-se que tempos de atraso diferentes na aplicação do PDC não tem uma influência direta nos resultados de causalidade. O PDC permitiu mostrar que na MEA a quantidade de conexões diretas estabelecidas foi sempre em menor quantidade do que as conexões indiretas, através de caminhos. Isso pode ser um indicativo de que os neurônios preferem estabelecer comunicação usando caminhos já existentes do que criando novas conexões. Também, observou-se que com o passar do tempo é mais fácil se perderem conexões diretas do que conexões intermediárias entre neurônios. Através dos experimentos realizados pode-se observar que a cultura no 25 DIV desenvolveu maior quantidade

de conexões com nós vizinhos, possuindo menos conexões no total, do que a rede no 46 DIV que teve maior quantidade de conexões mas menor quantidade de conexões com nós vizinhos.

Como uma das características do PDC é a detecção da direcionalidade nas conexões, observou-se mudanças no sentido das conexões ao longo do registro, embora não saibamos ainda o significado fisiológico dessas mudanças em processos cognoscitivos. Também observou-se que as conexões estabelecidas não seguiam um padrão aleatório, encontrando-se um indicativo de um comportamento de redes livres de escala, embora não possamos afirmar isso por ter utilizado poucas medidas estatísticas para caracterizar as redes.

Os conceitos de redes complexas deram um significado maior às conexões detectadas pelo PDC, pois permitiu conhecer quais eram os nós com maior grau de conectividade, os nós menos conectados, o nível de eficiência da rede baseada em medidas como o coeficiente de clustering e *betweenness*. Os dados estatísticos nos permitiu observar a mudança na topologia da rede ao longo do tempo.

CULTURA 371-46 DIV													
Node	H0-Nula	JB-E1	H0-Nula	JB-E2	Ordem	H0-Nula	Lag	Port	THS	Lag	H0-Nula	Port	THS
13	1	0,001	0	0,500	1	1	5	24,76	26,30	20	1	96,8	97,35
14	1	0,001	1	0,003	1	1	5	16,66	26,30	20	1	66,53	97,35
16	1	0,001	1	0,001	1	0	5	33,79	26,30	20	1	74,56	97,35
17	1	0,001	0	0,500	1	1	5	20,07	26,30	20	1	79,67	97,35
21	1	0,001	0	0,500	1	1	5	22,97	26,30	20	1	94,86	97,35
22	1	0,001	0	0,500	1	1	5	15,36	26,30	20	1	85,25	97,35
23	1	0,001	0	0,500	1	0	5	33,44	26,30	20	1	90,7	97,35
24	1	0,001	0	0,500	1	0	5	28,94	26,30	20	1	78,21	97,35
25	1	0,001	0	0,169	2	1	5	9,53	21,03	20	1	68,97	92,81
26	1	0,001	0	0,114	1	1	5	15,70	26,30	20	1	69,39	97,35
27	1	0,001	0	0,500	3	1	5	10,27	15,51	20	1	74,87	88,25
28	1	0,001	0	0,101	1	1	5	16,95	26,30	20	1	59,58	97,35
31	1	0,001	0	0,500	1	1	5	19,73	26,30	20	1	81,04	97,35
32	1	0,001	0	0,500	3	1	5	3,21	15,51	20	1	85,95	97,35
33	1	0,001	0	0,500	1	1	5	16,54	26,30	20	1	72,17	97,35
34	1	0,001	0	0,500	1	1	5	24,64	26,30	20	1	83,47	97,35
35	1	0,001	0	0,235	1	1	5	25,26	26,30	20	0	108,6	97,35
36	1	0,001	0	0,073	3	1	5	7,47	15,51	20	1	72,08	88,25
37	1	0,001	0	0,036	1	1	5	24,85	26,30	20	1	73,86	97,35
38	1	0,001	0	0,115	1	1	5	24,82	26,30	20	1	84,77	97,35
41	1	0,001	0	0,350	1	1	5	14,51	26,30	20	1	78,05	97,35
42	1	0,001	0	0,500	1	1	5	22,53	26,30	20	1	88,14	97,35
43	1	0,001	0	0,500	2	1	5	16,58	21,03	20	1	67,48	92,81
44	1	0,001	0	0,500	1	0	5	27,68	26,30	20	0	108,5	97,35
45	1	0,001	0	0,500	1	1	5	16,65	26,30	20	1	72,91	97,35
46	1	0,001	0	0,197	1	1	5	24,46	26,30	20	1	87,56	97,35
47	1	0,001	0	0,500	1	1	5	15,93	26,30	20	1	73,1	97,35
48	1	0,001	0	0,014	1	0	5	26,85	26,30	20	1	75,37	97,35
51	1	0,001	0	0,152	1	1	5	20,96	26,30	20	1	77,97	97,35
52	1	0,001	0	0,046	5	0	5	7,72		20	1	63,33	79,08
53	1	0,001	0	0,313	1	1	5	24,74	26,30	20	1	77,05	97,35
54	1	0,001	0	0,056	2	1	5	8,81	21,03	20	1	80,84	92,81
55	1	0,001	0	0,416	1	1	5	17,42	26,30	20	1	61,58	97,35
56	1	0,001	0	0,500	1	0	5	33,31	26,30	20	1	89,39	97,35
57	1	0,001	0	0,453	4	1	5	5,09	9,49	20	1	65,29	83,68
58	1	0,001	0	0,418	1	1	5	16,40	26,30	20	0	106,1	97,35
61	1	0,001	0	0,500	1	0	5	30,63	26,30	20	1	93,44	97,35
62	1	0,001	0	0,167	1	1	5	15,83	26,30	20	1	78,58	97,35
63	1	0,001	0	0,258	1	1	5	21,15	26,30	20	1	75,47	97,35
64	1	0,001	0	0,500	1	1	5	24,16	26,30	20	1	89,08	97,35
65	1	0,001	0	0,500	2	1	5	10,23	21,03	20	0	97,48	97,35
66	1	0,001	0	0,452	1	1	5	15,05	26,30	20	1	87,21	97,35
67	1	0,001	0	0,209	1	1	5	21,99	26,30	20	1	69,46	97,35
68	1	0,001	0	0,414	1	1	5	18,42	26,30	20	1	67,31	97,35
71	1	0,001	0	0,195	1	1	5	21,93	26,30	20	1	84,13	97,35
72	1	0,001	0	0,140	3	1	5	13,05	15,51	20	1	58,3	88,25
73	1	0,001	0	0,188	1	1	5	17,86	26,30	20	1	67,99	97,35
74	1	0,001	1	0,002	1	1	5	25,35	26,30	20	1	87,98	97,35
75	1	0,001	0	0,311	1	1	5	24,16	26,30	20	1	80,65	97,35
76	1	0,001	0	0,036	1	1	5	13,55	26,30	20	1	91,47	97,35
77	1	0,001	0	0,392	3	1	5	6,17	15,51	20	1	81,08	88,25
78	1	0,001	0	0,500	1	1	5	16,70	26,30	20	1	78,34	97,35
82	1	0,001	0	0,369	1	0	5	36,07	26,30	20	0	101,4	97,35
83	1	0,001	0	0,500	1	1	5	16,81	26,30	20	1	96,23	97,35
84	1	0,001	0	0,029	1	1	5	17,13	26,30	20	1	79,56	97,35
85	1	0,001	0	0,500	1	1	5	21,17	26,30	20	1	94,48	97,35
86	1	0,001	0	0,032	1	1	5	20,58	26,30	20	1	87,45	97,35
87	1	0,001	0	0,444	2	1	5	10,78	21,03	20	1	84,11	92,81

Conclusões

Este capítulo tem como objetivo concluir sobre os resultados obtidos no capítulo anterior e relacionar os resultados com pesquisas anteriores baseados na literatura. Objetiva também propor trabalhos ou pesquisas que podem ser realizados no futuro procurando melhorar a técnica empregada com o objetivo de ter melhores resultados.

7.1 Conclusões

Os resultados obtidos podem ajudar a corroborar a idéia de que as redes neurais estão constantemente ocupadas, pois mesmo no estado de repouso, onde a atividade elétrica é espontânea por não estar associado a nenhum tipo de estímulo externo, as redes continuam trabalhando, continua existindo comunicações internas entre neurônios. A dinâmica foi obtida pela utilização do PDC como método para identificar a interação entre os neurônios associados aos eletrodos. Também foi possível conhecer as propriedades topológicas das redes formadas, a partir do uso de medidas estatísticas de redes complexas, ajudando assim a entender melhor as dinâmicas observadas nas redes. Portanto podemos concluir que estudar redes neurais só é possível tendo em vista dois aspectos importantes: a dinâmica e a estrutura topológica, pois a dinâmica é melhor compreendida através da estrutura topológica, e a estrutura topológica não pode ser representada sem a dinâmica de interação que nos permita modelar as interações que acontecem nos sistemas estudados.

7.1.1 Conclusões específicas

O algoritmo PDC se mostrou como um método capaz de identificar as relações causais entre os neurônios pertencentes aos registros de atividades espontâneas, identificando a direcionalidade de cada série de tempo com respeito à outra, podendo dar um esclarecimento de como mudam as relações neuronais ao longo do tempo. Nas diferentes redes modeladas observamos que mesmo a atividade sendo espontânea, esta não é aleatória, pois através de medidas estatísticas podemos contabilizar que as redes modeladas tenham uma aproximação a redes livres de escala. Não podemos afirmar em definitivo esta conclusão pois utilizamos poucas medidas, que nos permitissem identificar verdadeiramente a que tipo de classe de rede pertencem. Mas vale a pena indicar que esta conclusão está em sintonia com pesquisas semelhantes apontadas na literatura. A compreensão das relações de causalidade não teria sido entendida se não fosse por medidas estatísticas associadas a conceitos de redes complexas. Na dinâmica modelada observou-se relações de conectividade que se mantiveram constantes ao longo do tempo, podendo ser um indicativo de que esses neurônios podem estar associados a áreas que tem um tipo de comunicação constante. Poder-se-ia fazer mais estudos que nos permitissem afirmar tal observação.

Mesmo o PDC ter demonstrado ser uma técnica que ajuda na detecção de interação entre séries temporais, encontra-se um pouco limitado pelo uso de modelos lineares como forma de identificação de causalidade, considerando-se que sinais biológicos são sistemas não lineares. Implica que a aplicação do PDC nos registros da MEA, resulte ser um pouco complexo pela quantidade de considerações a levar em conta, especificações que foram introduzidas no capítulo 3. Pelo elevado custo computacional que exige o PDC, não foi possível explorar as características do PDC num ambiente multivariado, tornando também difícil analisar amostras de maior tamanho, pois o algoritmo demanda de muita memória do computador.

O algoritmo Nuttal Stand mostrou-se inadequado na estimação dos registros da MEA, pois em muitos casos não conseguiu estimar uma ordem adequada sem presença de resíduos, acontecendo geralmente quando o tamanho da amostra era grande. O tamanho dos segmentos das séries temporais influenciou na detecção de causalidade.

A escolha de um bom kernel na etapa de pré-processamento é fundamental e necessário, pois o sinal registrado MEA possui muito ruído, periodicidade e volatilidade. Tais características fazem difícil estimar corretamente os registros da MEA através de métodos autorregressivos. O filtro *multitapering* como técnica aplicada na etapa de pré-processamento foi de grande ajuda, pois permitiu que os resíduos das séries temporais estimadas não fossem em sua maioria não correlacionados para os diferentes canais. Sem a aplicação deste filtro na etapa de pré-processamento mesmo a série sendo estimada numa ordem baixa, apresentava resíduos correlacionados.

7.1.2 Recomendações

Para se verificar se essas relações de conectividade encontradas pelo PDC, são realmente corretas, poder-se-ia gerar dados sintéticos, tendo em vista todas as considerações anteriormente citadas: como ruído, ordem do modelo, etc, podendo assim se comparar os dados reais com os dados sintéticos. Antes de iniciar a etapa de pré-processamento dos sinais para posteriormente aplicar o PDC, recomenda-se reduzir a dimensionalidade dos dados, obtendo-se os dados mais representativos da série a ser estimada. Uma forma de se obter essa redução da dimensionalidade é usando variáveis canônicas ou PCA. Para obter-se bons resultados com o filtro multitapering o ideal é escolher janelas de tamanho pequeno, mas não demasiado pois se pode distorcer o sinal.

7.1.3 Dificuldades encontradas

Devido à quantidade de canais a serem trabalhados de forma simultânea, foi difícil encontrar amostras maiores a 2000 pontos que sejam estacionárias no mesmo intervalo de tempo para os diferentes dias *in vitro*. Uma forma de lidar ou minimizar essa dificuldade foi pegar trechos de menor tamanho. O algoritmo Nuttall Strand em alguns casos não conseguiu estimar adequadamente a série, pois algumas das séries tinham resíduos correlacionados. Outra das dificuldades foi definir os parâmetros do filtro que melhor se adequa a todos os sinais da MEA.

7.1.4 Trabalhos futuros

Como trabalhos futuros pode-se considerar uma maior quantidade de medidas estatísticas de redes complexas, como por exemplo: os motivos, nível de hierarquia, etc, com a finalidade de se extrair maior informação da matriz de conectividade obtida pela dinâmica modelada. Poderia se completar o estudo aprofundando-se na análise espectral dos sinais, considerando-se mais aspectos que não se tiveram em conta nesta pesquisa. Aprofundando nos conceitos de redes complexas, poder-se-ia analisar a sincronização dos neurônios. Para aprofundar num melhor entendimento da dinâmica das redes avaliadas, poderia considerar introduzir outras medidas estatísticas como por exemplo as medidas hierárquicas e detecção de comunidades. Tais medidas nos permitem ter uma visão mais ampla da rede de forma global e local.

Referências Bibliográficas

- L. ASTOLFI and F. BABILONI. Estimation of cortical connection in human: Advanced signal processing techniques, chapter 2: Estimation of the functional, connectivity from stationary data by multivariate autoregressive models. *Morgan and Claypool Publishers*, 1(10):1–95, 2008. [46](#), [47](#)
- L. A. BACCALÁ and K. SHAMESHIMA. Partial directed coherence: A new concept in neural structure determination. *Biological Cybernetics*, 84(6):463–474, 2001. [43](#), [47](#)
- A. LAZLO BARABÁSI. *Linked: how everything is connected to everything else and what it means for business, science, and everyday life*. Plume, 1 edition, 2003. [18](#), [19](#), [20](#)
- G. BETTENCOURT, S. MICHAEL, and W.G. GUNTER. Functional structure of cortical neuronal networks grown in vitro. *Physical Review*, 75(2):021915, 2007. [6](#), [27](#), [28](#), [48](#)
- S. BJORN, W. MATHIAS M., M. E., P MARTIN, H. BERNHARD, and G. BRIGITTE. Testing for directed in-fluences among neural signals using partial directed coherence. *Journal of Neurocience, Elseiver*, 152(1-2):210–219, 2005. [47](#)
- M. CASIO. *Uma introdução as dinâmicas da conectividade e da auto-organização*. WWF - Brasil, Brasilia, 1 edition, 2003. [45](#)
- E. CLAVEROL-T, M. GHIRARDI, F. FIUMARA., X. ROSELL, and J. CABESTANY. Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons. *Journal of Neural Engineering*, 2(2):10, 2005. [12](#)
- S. CORNELIS and C. JAPP. Graph theoretical analysis of complex network in the brain. *Nonlinear Biomedical Physics*, 1(3):1–19, 2007. [45](#)
- P. DARBON, L. SCICLUNA, A. TSCHERTER, and J. STREIT. Mechanisms controlling bursting activity induced by disinhibition in spinal cord networks. *European Journal of Neuroscience*, 15(4):671–683, 2002. [12](#)

- P DAYAN. and L.F.Abbott. *Theoretical Neuroscience: Computational and Mathematical Modeling of Neural Systems*. The MIT Press, 1 edition, 2001. [5](#), [11](#)
- S. DOROGOVTSSEV and J. MENDES. *Evolution of Networks: From Biological Nets to the Internet and WWW*. Oxford University Press, New York, 1 edition, 2003. [24](#), [25](#)
- F. Gerhad, G.PIPA, B. LIMA, and W. GERSTNERW. Extraction of network topology from multielectrode recordings: Is there a small world. *Frontiers in computational neuroscience*, 5 (4):1–13, 2011. [28](#), [29](#), [48](#)
- C. GRANGER. Investigating causal relation by econometric models and across spectral methods. *Econometrica*, 30(3):442–438, 1987. [42](#)
- A. GUYTON, A. HALL, and E. JOHN. *Tratado de Fisiologia Medica*. Elseiver/Medicina Nacionais, 2 edition, 2006. [11](#)
- D.A. ISRAEL, BARRY. W, EDELL. D., and R MARK. An array of microelectrode to stimulate and record from cardiac cells in culture. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 247(4):669–674, 1984. [5](#)
- W. JAMES, K. DON, S. KEN, and T MAKOTO. Multi-elektrode arrays: Enhancing traditional methods and enabling network physiology. 1(1):52–82, 2006. [xi](#), [10](#), [14](#)
- E. KANDEL, J. SCHWARTZ, and T. JESSEL. *Fundamentos da neurociência e do comportamento*. Rio de Janeiro. [11](#)
- P. KEITH and B. HEMANT. *Neural Signal Processing: Quantitative Analysis of Neural Activity*. Cold Spring Harbor New York, Washington, DC, 1 edition, 2008. [48](#)
- C. KLISCH, A. INYUSHKIN, J. MORDEL, D. KARNAS, P. PEVET, and H. MEISSIL. Orexin a modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 30(1):65–75, 2009. [13](#)
- J. KOWALSKI, L. ALBERT, B. RHOADES, and G. GROSS. Original contribution: Neuronal networks with spontaneous, correlated bursting activity: Theory and simulations. 5(18): 805–822, 1992. [13](#)
- B. LJUNG. A measure of lack of fit in time series models. *Biometrika*, 65(2):297–303, 1978. [38](#)
- P; KAWANA A MAEDA, E; ROBINSON. The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 15(10):6834–6845, 1995. [13](#)

- S. MARPLE. *Digital Spectral Analysis with application*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1 edition, 1987. [37](#), [46](#)
- P. A. MORETTIN and M. CLELIA. *Análise de Series Temporais*. Edgard Blucher, São Paulo, 2 edition, 2004. [33](#)
- A. NELDER and R. WEDDERBURN. Generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A*, 135(1):370–384, 1972. [29](#)
- E. NEWMAN. The structure and function of complex networks. *SIAM review*, 45(2):167–256, 2003. [20](#), [23](#)
- N. PEIXOTO. *Desenvolvimento de Matrizes neuroeletronicas*. Tese de doutorado, Escola Politecnica Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2001. [13](#)
- J. VAN PELT, P. WOLTERS, W. RUTTEN, and G. RAMAKERS. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 51(2):2051–2062, 2004. [13](#)
- J. PINE. Recording action potentials from cultured neurons with extracell microcircuit electrodes. *J Neurosci Methods*, 2(1):19–31, 1980. [5](#)
- J. PINE. A history of mea development. In *Advances in Network Electrophysiology*, pages 3–23. New York: Springer, 2006. [9](#), [10](#)
- S. POTTER and B. THOMAS DEMARSE. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 110(1-2):17 – 24, 2001. [9](#), [12](#)
- M. B. PRIESLEY. *Spectral Analysis and Time Series*. London, U.K. Academic, New York, 2 edition, 1981. [34](#)
- W. RUTTEN. *Selective Electrical Interfaces With The Nervous System*. ANNUAL REVIEWS, 4139 EL CAMINO WAY, PO BOX 10139, PALO ALTO, CA 94303-0139 USA, California, 2002. ISBN 1523-9829. [12](#)
- S. S. BJORN, H. WOLFRAM, S. KARIN, L., and LUTZ. Comparison of linear signal processing techniques to infer directed in-teractions in multivariate neural systems. *Signal Processing - Neuronal coordination in the brain*, 85(11):2137–2160, 2005. [42](#)
- D. SATO, S. TAKAHASHI, K. SHAMESHIMA, M. P, and L.BACCALÁ. Frequency domain connectivity identification: An application of partial directed coherence in fmri. *Hum Brain Mapp*, 30(2):452–461, 2007. [46](#)

- S. SENS, S. PER JESPER, R. MARKUS, S. NELSON, and B. DIMITRI. Highly nonrandom features of synaptic connectivity in local cortical circuits. *Plos Biology*, 1(1):65–75, 2005. [28](#)
- A.K. SETH. A matlab toolbox for granger causal connectivity analysis, journal of neuroscience methods, elseiver. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(2):262–273, 2010. [45](#), [50](#)
- Y. SHAND, S. WOLF, and N.DAKO. A small world of neuronal synchrony. *Cerebral Cortex*, 18(12):2891–2901, 2008. [29](#), [48](#)
- S. SHIVKUMAR, T. KONSTANTINOS, S. ANDREAS, and I. LEON. A robust estimation of information flow in coupled non linear system. *Computacional Neurociencia*, 38(15):271–284, 2010. [42](#)
- W. SOUSSOU, G. GHOLMIEH, M. HAN, A. AHUJA, D. SONG, and M. HSIAO. Mapping spatio-temporal electrophysiological activity in hippocampal slices with conformal planar multi-electrode arrays. In Makoto Taketani and Michel Baudry, editors, *Advances in Network Electrophysiology*, pages 127–152. Springer USA, 2006. [xi](#), [10](#), [11](#)
- O. SPORNS. *Networks of the brain*. The Mit Press Cambridge, Massachusetts, 2011. [41](#), [45](#)
- K. SRUTHI and R. VADIVELU. Improvement of spectrum estimation using multi-tapering method (mtm) in cognitive radio. *Bonfring International Journal of Research in Communication Engineering*, 2(1):79–82, 2012. [52](#)
- A. STETT, U. EGERT, E. GUENTHER, F. HOLFMANN, T. MEYER, and W. NISCH. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3):486–495, 2003. [xi](#), [5](#), [12](#), [13](#), [16](#)
- C A. THOMAS, P A. SPRINGER, G E. LOEB, Y. BERWARLD-NETTER, and L. OKUM. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental Cell Research*, 74(1):61 – 66, 1972. [5](#), [6](#), [9](#)
- J. THOMSON. Spectrum estimation and harmonic analysis. *Proceedings of the IEEE*, 70(1):1055–1096, 1982. [51](#)
- G. WULFRAM and M. WERNER. *Spyking Neuron Models: Single Neurons, Populations, Plasticity*. Cambridge University Press, United Kingdom, 1 edition, 2002. ISBN 0-521-89079-9. [11](#)
- C. ZIEGLER. Cell-based biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366(2):552–559, 2000. [13](#)

Apendice

A tabela A.1 mostra algumas medidas de redes complexas utilizadas para mostrar as diferenças estatísticas na rede Aleatória, rede Livre de escala, rede mundo pequeno, rede do experimento1 no 25DIV e 46 DIV. Tais redes são redes não direcionadas, possuem a mesma quantidade de nós e probabilidade de conexão como configuração inicial, mas que ao longo do tempo evoluíram de forma diferente refletindo-se tais resultados nas medidas estatísticas.

A tabela A.1 esta dividida em cinco colunas. A primeira coluna da tabela indica o nível de assortatividade da rede(A); a segunda coluna indica o diâmetro(Di); a terceira coluna a densidade(D); a quarta coluna o coeficiente de clustering(C); a sexta coluna indica a média do caminho mínimo médio. Cada uma destas medidas foi explicada no Capítulo3.

Na tabela A.1 pode-se observar que a rede mundo pequeno apresenta um alto valor na densidade da rede e esse valor continua a ser igual, mesmo considerando diferentes probabilidades de conexão (Tabela A.2 e A.3). O fato da rede do pequeno mundo ter apresentado um alto valor na densidade em comparação com as outras redes, tendo em vista a mesma configuração inicial é devido a ser uma característica própria dela. A rede do mundo pequeno tem uma preferência por desenvolver conexões com os vizinhos mais próximos do que conexões distantes. Isso origina que a rede se torne mais densa do que as demais. Outro aspecto importante a mencionar, é o valor do diâmetro da rede, que está relacionado com o caminho geodésico mais longo. Pode-se observar na tabela A.1 que o valor maior foi obtido pela rede livre de escala, isso também é um comportamento próprio dessa rede. Considerando tais medidas dessas redes bem conhecidas e comparando com as medidas obtidas por nossa rede do Experimento1 no 25 e 46 DIV. Podemos observar que topologicamente a rede Exp1-25 apresenta medidas que poderiam categorizá-la como uma rede do mundo pequeno com tendência aleatória. Como a diferença estatística entre a rede Exp1-25 e Expe1-46 não é perceptível, também a segunda rede pode entrar nesta categoria.

A tabela A.2 e tabela A.3 mostram as medidas anteriormente citadas aplicadas à rede aleatória e rede mundo pequeno, mas considerando probabilidades de conexão diferentes: $p=0.1, 0.01$.

As figuras 7.1,7.2,7.3, 7.4 representam graficamente a estrutura topologia das redes cujas me-

Medidas estatísticas-Rede Aleatória, Rede Mundo Pequeno, Livre de escala					
Rede	<i>A</i>	<i>Di</i>	<i>D</i>	<i>C</i>	<i>l</i>
Aleatória-Erdos Renyi	0.0382	8	0.0406	0.081	3.7725
Livre de Escala-Barabasi	-0.1954	10	0.03125	0.000	4.0034
Mundo Pequeno-Watts Strogatz	-0.05342	4	0.15873	0.521	2.4201
Exp1371-25 DIV	-0.01163	6	0.06398	0.065	2.8039
Aleatória-Erdos Renyi	-0.16034	5	0.08581	0.133	2.4623

Tabela 7.1: Tabela A.1: O cálculo das medidas foi realizado considerando que todas são redes contem 64 nós e uma probabilidade de conexão de $p=0.05$.

Medidas estatísticas-Rede Aleatória			
Rede	$p = 0.05$	$p = 0.1$	$p = 0.01$
<i>A</i>	0.0381	-0.0080	-0.1103
<i>Di</i>	8	5	5
<i>D</i>	0.0406	0.0942	0.0114
<i>C</i>	0.0810	0.1130	0.0000
<i>l</i>	3.7725	2.508	2.1147

Tabela 7.2: Tabela A.2: Medidas estatísticas de redes complexas com probabilidade de conexão $p=0.05$, $p=0.1$, $p=0.01$.

Medidas estatísticas-Rede Mundo Pequeno			
Rede	$p = 0.05$	$p = 0.1$	$p = 0.01$
<i>A</i>	-0.0534	-0.0260	-0.0416
<i>Di</i>	4	4	5
<i>D</i>	0.1587	0.1587	0.1587
<i>C</i>	0.5210	0.4354	0.6353
<i>l</i>	2.4201	2.2827	2.8194

Tabela 7.3: Tabela A.3: Medidas estatísticas de redes complexas com probabilidade de conexão $p=0.05$, $p=0.1$, $p=0.01$.

didatísticas foram explicadas anteriormente. Pode-se observar claramente que a topologia das redes apresentadas muda dependendo da probabilidade de conexão e ao tipo da rede à qual pertence. Se a rede mundo pequeno que mantém uma estrutura muito similar para diferentes probabilidade de conexão, para as demais redes a mudança é mais visível.

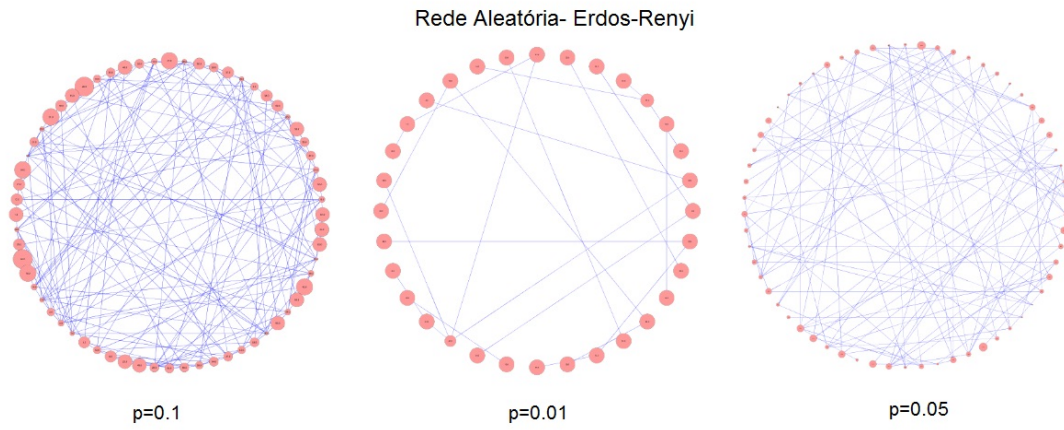


Figura 7.1: Rede Aleatória contendo 64 nós com probabilidade de conexão de $p=0.1$, $p=0.05$, $p=0.01$.

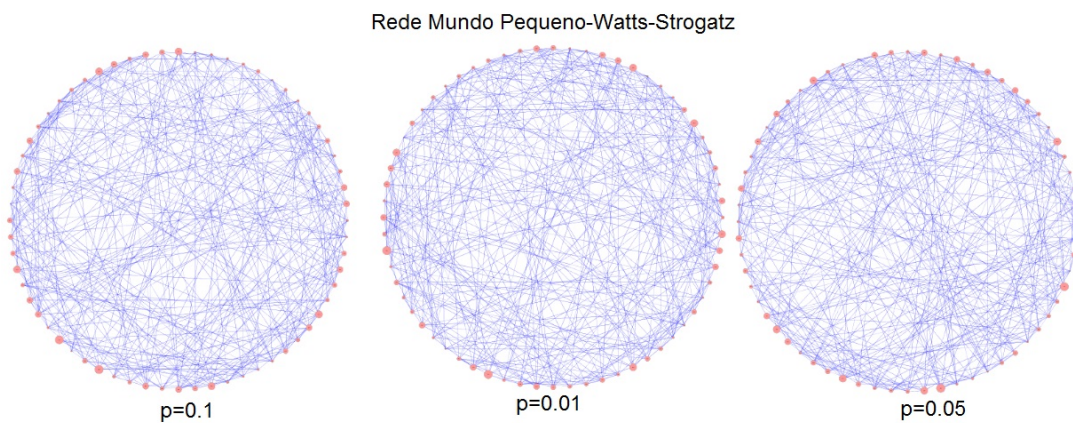


Figura 7.2: Rede do mundo pequeno contendo 64 nós e uma probabilidade de conexão de $p=0.1$, $p=0.05$, $p=0.01$.

Rede Livre de Escala-Modelo de Barabási

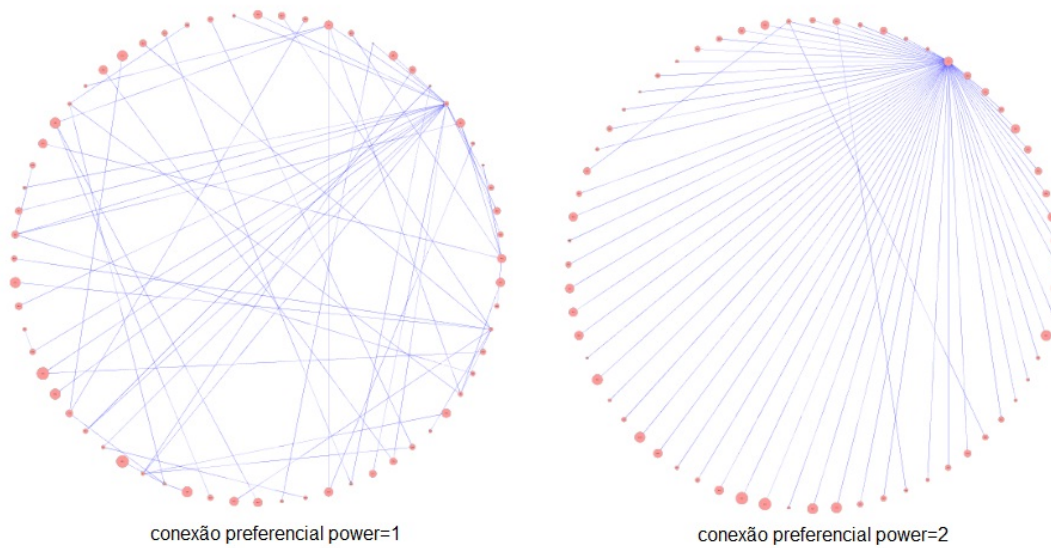


Figura 7.3: Rede livre de escala contendo 64 nós e uma probabilidade de conexão preferencial de $\alpha = 1$ e $\alpha = 2$.

Redes geradas no experimento1

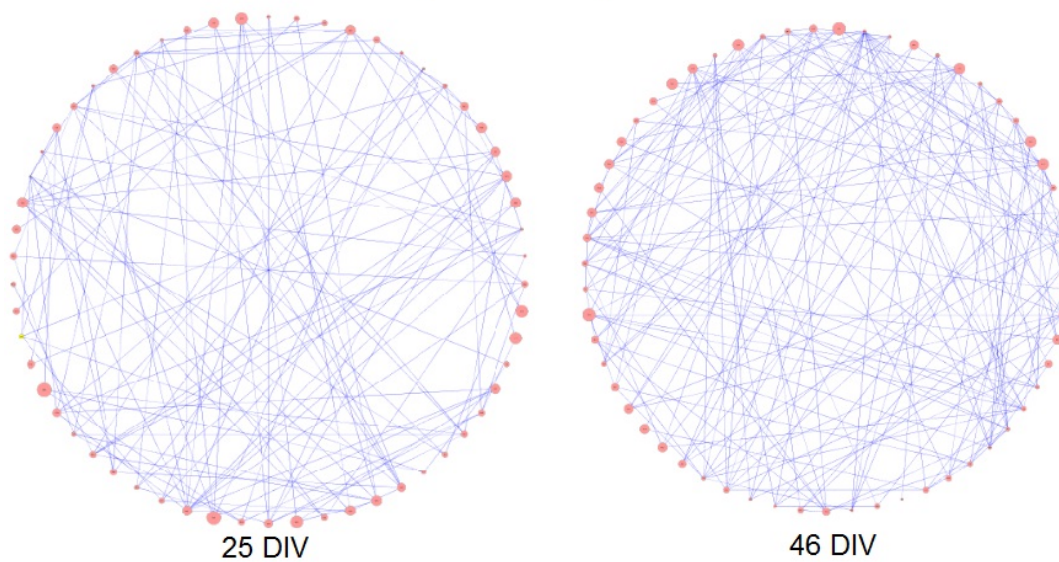


Figura 7.4: Rede gerada no Experimento 1 correspondente no 25 e 46 DIV.